

## تأثیر تنش خشکی و کودهای زیستی بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیک، بیوشیمیایی و رنگدانه‌های فتوسنتزی گل همیشه بهار

مهدی صاحب حسن<sup>۱</sup>، یحیی سلاح ورزی<sup>۱\*</sup>، جعفر نباتی<sup>۲</sup> و مجید عزیزی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup>گروه علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۷/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۰۷/۱۳)

### چکیده

بهره گیری از رابطه هم زیستی گیاه با قارچ میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد یکی از راهکارهای کاهش تنش خشکی است. به این منظور آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا شد. تیمارهای آزمایش شامل ۲ سطح تنش رطوبتی (۱۰۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب به عنوان تیمار آبیاری کامل و تنش خشکی) و ۸ سطح کود زیستی (باکتری *Pseudomonas fluorescens* (Ps)، باکتری *Azotobactore chroococcum* (Az)، قارچ میکوریزا (M)، باکتری Ps همراه با قارچ میکوریزا، باکتری Az همراه با قارچ میکوریزا، باکتری Ps همراه با باکتری Az در ترکیب با باکتری Ps و قارچ میکوریزا و تیمار شاهد (عدم استفاده از باکتری و قارچ) بود. نتایج نشان داد با ورود به شرایط تنش، صفات مورفولوژیک و هدایت روزنه‌ای در گیاه نسبت به تیمار آبیاری کامل کاهش و مقدار پرولین، کربوهیدرات کل و محتوای کلروفیل گیاه افزایش داشت. کاربرد باکتری‌های محرک رشد در اکثر صفات منجر به بهبود صفات اندازه گیری شده در گیاه در شرایط تنش و غیر تنش گردید. بیشترین وزن خشک کاسه گل (۳/۸۱ گرم) با کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* (۴/۵۲ گرم) در شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی و پس از آن در تیمار کاربرد توام قارچ میکوریزا و باکتری *Pseudomonas fluorescens* در شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک ثبت شد. کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* در خاک به تنهایی یا توام با قارچ میکوریزا در همیشه بهار در شرایط تنش خشکی قابلیت بهبود رشد گیاه را داشته و منجر به افزایش کارایی گیاه در شرایط تنش خشکی شد.

کلمات کلیدی: پرولین، فنول، قطر گل، کلروفیل کل، کربوهیدرات

### مقدمه:

عنوان مواد اولیه تولیدات صنایع مذکور، کشت گیاهان دارویی در کشور ایران نیز در حال گسترش می‌باشد (Omidbaigi et al., 2003). همیشه بهار با نام علمی *Calendula officinalis* L. گیاهی یک ساله و متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) و یکی از گیاهان دارویی شناخته شده می‌باشد که امروزه از گل و اسانس آن در داروسازی و صنایع آرایشی و بهداشتی استفاده

افزایش جمعیت و نیاز صنایع داروسازی به گیاهان دارویی به عنوان مواد اولیه تولید دارو و اهمیت مواد مؤثره آن‌ها در صنایع مختلف، سبب کشت و تولید گیاهان دارویی شده است (Abdullaev and Espinosa-Aguirre, 2004). با توجه به نیاز صنایع دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی به گیاهان دارویی به

شرایط تنش و بدون تنش اثر بگذارند (Ague, 2001) و حتی تأثیر آنها در شرایط تنش افزایش یابد (Abo-Ghalia and Khalafallah, 2008). Song (۲۰۰۵) همبستگی بالایی را بین وضعیت تغذیه‌ای گیاه و مقاومت به خشکی آن در حضور میکوریزا گزارش کرد. نتایج تحقیقات نیز نشان می‌دهد که اصلاح روابط آبی گیاه توسط قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار می‌تواند به واسطه افزایش هدایت روزنه‌ای و تعرق، اثرات هورمونی و تعادل هورمونی، افزایش سریع جذب آب و رساندن پتانسیل گیاه به حد تعادل، جذب بیشتر آب به واسطه هیف‌ها و خاکدانه سازی تحت تأثیر قرار گیرد (منافی، ۱۳۸۹). از مکانیسم‌های احتمالی افزایش تحمل به خشکی در گیاهان میکوریزایی می‌توان به افزایش هدایت هیدرولیکی ریشه‌ها (Tian et al., 2013)، افزایش جذب آب در شرایط رطوبتی کم به دلیل گسترش ریشه‌های قارچی، ایجاد تعادل اسمزی و حفظ فشار آماس (مقدسان و همکاران، ۱۳۹۴)، افزایش فعالیت فتوسنتزی، تجمع کربوهیدرات‌ها، پرولین و افزایش جذب عناصر غذایی (Deepika and Kothamasi, 2015) اشاره کرد. همزیستی ریشه گیاهان با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار یکی از قدیمی‌ترین و رایج‌ترین راهکارهای افزایش جذب عناصر غذایی برای سازگاری با تنش‌های محیطی است. تیمارهایی که با هر دو قارچ ریشه و باکتری مایه کوبی می‌شوند، زیست توده گیاه و تجمع نیتروژن و فسفر در بافت‌های گیاهی را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش می‌دهند (خندان میکوهی و همکاران، ۱۳۹۵). از طرفی ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه از مهمترین کودهای زیستی بوده و با محلول کردن و افزایش فراهمی زیستی عناصر معدنی، بطور مستقیم با تثبیت نیتروژن و تولید هورمون‌های رشد و بطور غیر مستقیم با کاهش یا پیشگیری از اثرات زیان آور بیماری‌های ریزجانداران دیگر، از طریق تولید انواع مواد آنتی بیوتیک و سیدروفورها سبب افزایش رشد گیاهان شده و عملکرد گیاهان زراعی را بهبود می‌بخشند (Han and Lee, 2005; Turan, 2006). این باکتری‌ها می‌توانند به طور مستقیم (تثبیت نیتروژن، تولید مواد تنظیم کننده رشد گیاه، افزایش قابلیت جذب عناصر

فراوانی می‌شود (Arora et al., 2013). مطالعات داروشناسی تأیید کرده است که گل همیشه بهار اثرات گسترده بیولوژیکی و فعالیت‌های داروشناختی محافظ کبدی و ضد اسپاسم دارد (Arora et al., 2013). از طرفی مقدار آب قابل دسترس برای گیاهان از مهمترین عوامل اکولوژیکی توزیع و پراکندگی گونه‌های مختلف گیاهی در سطح کره زمین است. زمانی که از دست دادن آب به صورت تعرق بر میزان آب جذب شده از خاک پیشی می‌گیرد، تنش آب رخ می‌دهد. تنش طولانی مدت بر تمام فرآیندهای متابولیک گیاه اثر می‌گذارد و در نتیجه اغلب موجب کاهش تولید گیاه می‌شود (موحدی‌دهنوی و همکاران، ۱۳۸۳). بقاء گیاه در شرایط تنش، مستلزم توانایی آن در برابر شرایط اسمزی شدید حاصل از خشکی است. هزینه کودهای شیمیایی از یک سو و مسائل زیست محیطی مرتبط با مصرف غیراصولی آن‌ها از سوی دیگر، تفکر استفاده از شیوه‌های زیستی تثبیت عناصر برای تقویت رشد محصولات مخصوصاً در شرایط تنش را قوت بخشید (غلامی و کوچکی، ۱۳۸۱). یکی از شیوه‌های زیستی برای بهبود شرایط رشد گیاهان در شرایط تنش استفاده از کودهای زیستی است. کودهای زیستی شامل مواد نگهدارنده‌ای با جمعیت متراکم یک یا چند نوع ارگانسیم مفید خاکزی و یا به صورت فرآورده متابولیکی این موجودات می‌باشند که به منظور تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه در یک اکوسیستم زراعی بکار می‌رود (Darzi et al., 2006). قارچ‌های میکوریزابه عنوان یک کود زیستی قادر هستند که اثرات نامطلوب تنش خشکی را در گیاهان تعدیل نمایند و به میزان قابل توجهی رشد و جذب عناصر غذایی گیاه را افزایش دهند (Ague, 2001). رابطه هم‌زیستی بین قارچ میکوریزا آربوسکولار و ریشه‌های گیاه میزبان به میزان قابل توجهی رشد و جذب عناصر غذایی گیاه را افزایش می‌دهد. گیاه میزبان منابع کربن مورد نیاز قارچ را فراهم می‌کند و قارچ نیز سبب افزایش جذب آب و عناصر غذایی گیاه میزبان می‌شود. بخش عمده‌ای از گیاهان دارای توانایی ایجاد هم‌زیستی با قارچ‌های میکوریزایی هستند. همچنین این قارچ‌ها می‌توانند بر تعادل آبی گیاه در هر دو

سطح خشکی ۱۰۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی و هشت سطح کود زیستی بود که با کاربرد دو باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobactore chroococcum* و قارچ میکوریزا در خاک بدست آمد. تیمار کودهای زیستی شامل باکتری *Pseudomonas fluorescens* (Ps)، باکتری *Azotobactore chroococcum* (Az)، قارچ میکوریزا (M)، باکتری Ps همراه با قارچ میکوریزا، باکتری Az همراه با قارچ میکوریزا، باکتری Ps همراه با باکتری Az، باکتری Az در ترکیب با باکتری Ps و قارچ میکوریزا و همچنین تیمار شاهد (عدم استفاده از باکتری و قارچ) بود. کودهای زیستی استفاده شده در این پژوهش شامل قارچ میکوریزا و دو باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobactore chroococcum* از موسسه تحقیقات خاک و آب، بخش تحقیقات بیولوژی خاک تهران تهیه شد.

به منظور آماده سازی بستر کاشت، ترکیب خاکی شامل خاک زراعی و ماسه با نسبت ۱:۲ آماده و جهت پر کردن گلدانها توسط اتوکلاو ضدعفونی گردید. سپس به منظور اعمال تنش خشکی به روش وزنی، مقدار مساوی از خاک، در گلدانها ریخته شد. پس از آن تعداد سه عدد نشاء گل همیشه بهار، در گلدانها کشت گردید. نشاء گل همیشه بهار پس از کشت بذر گیاه در سینیهای کشت و قراردادن در گلخانه آماده گردید. پیش از نشاء گل همیشه بهار در گلدان با ایجاد حفره در خاک گلدان، مقدار ۶۰ گرم قارچ میکوریزا به خاک اضافه گردید (ایجاد سه حفره در خاک، هر حفره مقدار ۲۰ گرم قارچ میکوریزا). به منظور تلقیح باکتری به خاک نیز، پس از ایجاد حفره در داخل خاک گلدان مقدار ۲۰ گرم از باکتری به خاک و در نزدیکی محدوده رشد ریشه افزوده شد. در تیمار تلفیقی دو باکتری در خاک از هر باکتری مقدار ۱۰ گرم (جمعا ۲۰ گرم) به خاک اضافه گردید. به منظور اعمال تنش خشکی، وزن خاک در حالت ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی اندازه گیری و ثبت شد؛ سپس خاک گلدان به منظور خشک شدن در داخل آون قرار داده شد. بر این اساس وزن گلدان در حالت ۵۰ درصد ظرفیت زراعی نیز محاسبه گردید. در طول اعمال تنش وزن

غذایی مختلف برای گیاه، تولید ویتامینها و دیگر مواد محرک رشد گیاه) و یا غیر مستقیم (تولید آنزیمهای هضمکننده دیواره سلولی قارچهای بیماریزای گیاهی، ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه و افزایش مقاومت گیاه به تنشهای غیر زنده) موجب افزایش رشد گیاه شوند (Naseem and Bano, 2014). برخی نژادهای باکتریهای محرک رشد (PGPR) نظیر *Pseudomonas aeruginosa* با تولید آگروپلی ساکاریدها، توانایی باکتریها را جهت حفظ محتوای رطوبت خاک و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش خشکی افزایش می دهند (Naseem and Bano, 2014). بعضی ترکیبات آلی فرار باکتریایی نظیر استیک اسید که جزء اصلی آگروپلی ساکاریدها است قادر به القاء تشکیل بیوفیلم در خاک هستند (Chen et al., 2015). بنابراین این امکان وجود دارد که برخی باکتریهای محرک رشد با تولید آگروپلی ساکاریدها، تحمل گیاه را در برابر تنش خشکی افزایش دهند (Liu and Zhang, 2015). اگرچه مطالعات زیادی برای ارزیابی تحمل به تنش خشکی در گونههای دارویی مختلف انجام شده است، تاکنون برای ارزیابی اثر برهمکنش خشکی و تأثیر کودهای زیستی و قارچ میکوریزا و نحوه اعمال آن بر گیاه دارویی همیشه بهار مطالعاتی صورت نگرفته است. با توجه به اهمیت گیاه دارویی همیشه بهار و نقش آن در کاهش وابستگی کشور به واردات، هدف از این تحقیق، بررسی اثر باکتریهای محرک رشد و قارچ میکوریزا تحت تأثیر خشکی بر صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی همیشه بهار می باشد.

#### مواد و روشها

این تحقیق به منظور بررسی اثر کاربرد باکتریهای محرک رشد و قارچ میکوریزا بر رشد و صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی گل همیشه بهار رقم Pacific beauty orange تحت شرایط تنش خشکی در زمستان و بهار سالهای ۱۳۹۶-۱۳۹۷ در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل دو

گلدان‌ها با توزین روزانه و بسته به نوع تیمار ثابت نگه داشته شد. نشاء گل همیشه بهار سه هفته بعد از کشت، در مرحله چهار برگی به گلدان‌های با قطر دهانه ۲۵ سانتیمتر و با تراکم ۳ نشاء در هر گلدان منتقل شد و سه هفته پس از استقرار کامل نشاء در گلدان تنش خشکی اعمال گردید.

**صفات اندازه گیری شده:** در انتهای آزمایش یعنی پس از ورود گیاه به فاز زایشی صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد نظر در گیاه اندازه گیری شد. تعداد گل شمارش شد. قطر گل توسط کولیس دیجیتالی و سطح برگ در گیاه با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج (Li-cor, Li-3100C) (Area meter, USA) اندازه گیری شد. گیاهان پس از خروج از گلدان و شستشوی ریشه، در آون ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند و وزن خشک اندام هوایی و ریشه، وزن خشک کل گل و کاسه گل در آزمایشگاه با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ بدست آمد. هدایت روزنه‌ای توسط دستگاه پرومتر (OSL-FL) اندازه گیری شد. همچنین محتوای کلروفیل گیاه شامل کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید (Dere et al., 1998) و میزان پرولین برگ (Bates et al., 1973) مورد استخراج قرار گرفت. جهت اندازه گیری میزان کربوهیدرات محلول برگ، ۵۰۰ میلی گرم از نمونه برگی آسیاب شد و با ۵ میلی لیتر متانول ۹۵ درصد استخراج عصاره انجام گرفت. عصاره به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۴۵۰۰ سانتریفیوژ شد و به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره روشن‌آور ۳ میلی لیتر آنترون اضافه گردید. سپس لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در حمام داغ ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و در نهایت پس از سرد شدن، نمونه‌ها در طول موج ۶۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. به منظور استخراج فنل برگ نیز ۱ گرم از نمونه گیاهی با ۱۰ میلی لیتر حلال عصاره گیری شد. عصاره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از عصاره شفاف روشن‌آور با ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مخلوط شد. به هر نمونه ۵۰ میکرولیتر فولین سیکالتو و ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم اضافه شد. تمامی نمونه‌ها به مدت نیم ساعت در دمای ۴۰ درجه

سانتیگراد قرار داده شدند و قرائت نمونه‌ها در طول موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. محتوای فلاونوئید عصاره با روش رنگ سنجی ارزیابی شد (Change et al., 2002).

**تجزیه و تحلیل داده‌ها:** تجزیه آماری داده‌های آزمایش و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال خطای ۵ درصد توسط نرم افزار آماری JMP-8 و ترسیم نمودارها با نرم افزار Excel-2010 صورت گرفت.

### نتایج و بحث

**صفات مورفولوژیک همیشه بهار:** با توجه به نتایج جدول ۱، اثر ساده تنش خشکی در تمامی صفات مورفولوژیک اندازه گیری شده در آزمایش معنی‌دار شد. اثر ساده کاربرد کود زیستی به جز وزن خشک کل گل بر سایر صفات ذکر شده در جدول ۱ اثر معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد داشت. همچنین اثر متقابل کاربرد کودهای زیستی و تنش خشکی بر وزن خشک ریشه، وزن خشک کل گل و سطح برگ معنی‌دار نشد و در صفات وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک کاسه گل و قطر گل در سطح احتمال ۱ درصد و در تعداد گل در سطح احتمال ۵ درصد اثر معنی‌دار داشت.

**وزن خشک اندام هوایی و ریشه، وزن خشک گل و کاسه گل، سطح برگ:** با توجه به نتایج جدول ۱، کاربرد کود زیستی در شرایط تنش خشکی بر وزن خشک اندام هوایی تاثیرگذار بود. به این ترتیب بیشترین وزن خشک اندام هوایی در شرایط آبیاری کامل با کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* (۸/۰۵ گرم) در خاک نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد کود زیستی) حاصل شد. همچنین بدون اختلاف معنی‌دار با تیمار ذکر شده، در تیمار کاربرد توام مایکوریزا به همراه باکتری *Pseudomonas fluorescens* در شرایط اعمال تنش خشکی وزن خشک اندام هوایی (۶/۶۶ گرم) نسبت به تیمار شاهد (عدم کاربرد کود زیستی) مقدار بیشتری داشت. بیشترین وزن خشک ریشه در شرایط کاربرد ترکیبی باکتری *Pseudomonas fluorescens*، باکتری *Azotobactore*

جدول ۱- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات مورفولوژیک اندازه گیری شده در گیاه همیشه بهار

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک گل	وزن خشک کاسه گل	سطح برگ	تعداد گل	قطر گل
تنش خشکی	۱	۵۱/۸۲۱**	۵۲/۰۹۲**	۰/۷۳۸**	۲۸/۰۶۳**	۸۳۸۹۳۰۰**	۳۷۰/۵۶۲**	۷/۵۶۲**
کود زیستی	۷	۱۵/۸۰۲**	۲۰/۹۲۹**	۰/۱۸۵ <sup>ns</sup>	۴/۱۸۶**	۱۹۵۴۲۹۴**	۱۳۴/۹۵۵**	۲/۷۵۸**
تنش خشکی × کود زیستی	۷	۹/۷۲۲۳**	۲/۱۷۹ <sup>ns</sup>	۰/۱۵۰ <sup>ns</sup>	۲/۸۰۷**	۵۴۹۱۱۲ <sup>ns</sup>	۵۰/۴۵۵*	۱/۳۸۳**
خطا	۴۸	۲/۲۱۶	۳/۹۴	۰/۰۸	۰/۸۶	۵/۱۶	۱۸/۷۲	۰/۲۶

ns, \*, \*\* به ترتیب نشان دهنده اختلاف غیر معنی دار و وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

جدول ۲- اثر ساده تنش خشکی و کاربرد کود زیستی بر صفات مورفولوژیک اندازه گیری شده در گیاه همیشه بهار

تیمارها	تنش خشکی (FC%)	سطح برگ (سانتیمتر مربع)	وزن خشک گل (گرم)	وزن خشک ریشه
100	۲۴۲۳/۲۵ <sup>a</sup>	۰/۷۳ <sup>a</sup>	۵/۵۵ <sup>۶a</sup>	
50	۱۶۹۹/۱۴ <sup>b</sup>	۰/۵۲ <sup>b</sup>	۳/۷۹ <sup>b</sup>	
کود زیستی				
Control	۱۴۰۹/۵۲ <sup>c</sup>	-	۲/۳۷ <sup>c</sup>	
Ps	۲۰۶۶/۸۵ <sup>bc</sup>	-	۴/۷۷ <sup>bcd</sup>	
Az	۲۸۱۶/۴۸ <sup>a</sup>	-	۳/۲۷ <sup>de</sup>	
M	۱۷۱۰/۵۵ <sup>c</sup>	-	۳/۸۵ <sup>cde</sup>	
M Ps+	۱۷۸۹/۹۳ <sup>bc</sup>	-	۶/۲۴ <sup>ab</sup>	
Az +M	۲۵۰۶/۹۰ <sup>ab</sup>	-	۵/۸۲ <sup>abc</sup>	
Ps + Az	۱۹۹۶/۳۰ <sup>c</sup>	-	۳/۸۳ <sup>de</sup>	
M+Ps + Az	۲۴۹۳/۰۵ <sup>ab</sup>	-	۷/۰۹ <sup>a</sup>	

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، اختلاف معنی داری ندارند

ترکیباتی که در شرایط تنش تولید می‌کنند (سیتوکینین و آنتی اکسیدانت) از تجمع آبسزیک اسید ممانعت و موجب تخریب گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردند. همچنین گزارش شده، باکتری‌های محرک رشد سبب بهبود رشد گوجه فرنگی، لفل، منداب، لوبیا و کاهو تحت شرایط شوری شدند (Barassi et al., 2006; Glick et al., 1997; Yildirim and Taylor, 2005) باکتری‌های محرک رشد همچنین با افزایش ساخت ترکیبات قندی، رشد گیاهان را در گیاهانی مثل بابونه شیرازی و کدو حلوايي تحت تأثیر خود قرار می‌دهند (Illmer and Schinner, 1992). کوچکی و همکاران (۱۳۸۷) گزارش کرده‌اند که کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* منجر به افزایش قطر و

*chroococcum* و قارچ مایکوریزا (۷/۰۹ گرم) و پس از آن بدون اختلاف معنی دار در تیمار کاربرد ترکیبی قارچ مایکوریزا و باکتری (۶/۲۴ گرم) *Pseudomonas fluorescens* و تیمار کاربرد ترکیبی قارچ مایکوریزا و باکتری *Azotobactore* *chroococcum* (۵/۸۲ گرم)، نسبت به تیمار شاهد (۲/۳۷ گرم) حاصل شد (جدول ۲). همچنین استفاده از تیمارهای مختلف کود زیستی و تنش خشکی بر وزن خشک ریشه اثر داشت. کاهش مشاهده شده در رشد اندام هوایی و ریشه گیاه در شرایط تنش کم آبی را می‌توان در نتیجه کاهش استقرار ریشه و کاهش جذب عناصر کانی دانست (Al-Karaki, 1998; Al-Karaki, 2000). برخی ریز باکتری‌های تحریک کننده رشد گیاهان با

فسفر توسط گیاه، تثبیت نیتروژن و سنتز آنزیم‌هایی که مقدار اتیلن را در گیاه تنظیم می‌کنند، سبب تحریک رشد گیاه می‌شوند (Stajkovic et al., 2011). Shaalan (۲۰۰۵) گزارش داد که افزایش حاصلخیزی خاک با کودهای بیولوژیک، نظیر ازتوباکتر و سودوموناس، باعث بهبود خصوصیات رشدی گیاه دارویی سیاه دانه (*Nigella sativa*) شده است.

تنش خشکی منجر به کاهش وزن خشک گل در گیاه دارویی همیشه بهار شد (جدول ۲). به طوریکه وزن خشک گل در آبیاری کامل برابر با ۷۳ گرم بود و در تنش خشکی به ۵۲ گرم رسید. به نظر می‌رسد که کاهش مواد فتوسنتزی به علت کاهش سطح برگ و انتقال مواد آسمیلاتی به سمت گل‌ها سبب کاهش وزن و عملکرد آن‌ها شده است (Shubhra et al., 2004). بیشترین مقدار وزن خشک کاسه گل در تیمار کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* (۴/۵۲ گرم) در شرایط آبیاری کامل و پس از آن و بدون اختلاف معنی‌دار در تیمار کاربرد توام قارچ میکوریزا و باکتری *Pseudomonas fluorescens* در شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی خاک (۳/۸۱ گرم) ثبت شد. همچنین سطح برگ در گیاه همیشه بهار تحت تاثیر تنش خشکی و کودهای زیستی قرار گرفت و با کاهش مقدار آب در خاک، سطح برگ گیاه نیز کاهش یافت (جدول ۲). این محدودیت سطح برگ می‌تواند اولین خط دفاعی برای مقابله با خشکی باشد، بنابراین کاهش پتانسیل آب در مدت دوره کم آبی، سبب کاهش آب بافت‌های گیاه شده که نتیجه آن کاهش سطح برگ، کوچک شدن برگ و کاهش طول ساقه است (جزی زاده و مرتضایی نژاد، ۱۳۹۶). بیشترین سطح برگ در اثر کاربرد باکتری *Azotobactore chroococcum* (۲۸۱۶/۴۸ میلی‌متر مربع)، گیاهان تیمار شده با کاربرد توام باکتری *Azotobactore chroococcum* و قارچ میکوریزا (۲۵۰۶/۹۰ میلی‌متر مربع) و کاربرد توام باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobactore chroococcum* و قارچ میکوریزا (۲۴۹۳/۰۵ میلی‌متر مربع) در مقایسه با تیمار شاهد (۱۴۰۹/۵۲ میلی‌متر مربع) ثبت شد. سایر تیمارهای آزمایش

وزن ساقه گردیده است. در پژوهش مشابه تلقیح این گیاهان با باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش غلظت برخی از عناصر پرمصرف در گیاهان مورد نظر شده و در نهایت رشد رویشی و وزن تر اندام هوایی روند افزایشی نشان داد (Barassi et al., 2006). کاهش عملکرد گیاه با افزایش خشکی ممکن است به علت افزایش تولید اتیلن در شرایط تنش خشکی باشد. در شرایط کمبود آب، افزایش میزان آبسبزیک اسید از راه کاهش، میزان افزایش سلولی در مریستم برگ و کاهش فعالیت‌های حل‌کنندگی دیواره یاخته ای که لازمه طویل شدن برگ است از توسعه سطح برگ جلوگیری می‌کند. علاوه بر این افزایش مقاومت لایه میان برگی (مزوفیلی) و روزنه‌ای در شرایط تنش خشکی باعث کاهش ورود دی‌اکسید کربن به درون گیاه و کاهش نورساخت (فتوسنتز) ظاهری گیاه می‌شود و در نتیجه وزن خشک اندام‌های گیاه در اثر پایین آمدن سطح مواد نورساختی کاهش می‌یابد (Ghourchiani et al., 2012). تاثیر تنش خشکی بر کاهش ماده خشک گیاهان را می‌توان این گونه بیان داشت که به طور کلی، کمبود آب در هر مرحله از رشد گیاه، جذب، انتقال و مصرف عناصر غذایی را کاهش می‌دهد که پیامد آن کم شدن ذخیره کربن و کاهش ماده خشک می‌باشد (Hu and Schmidhalter, 2005). اثر مثبت کاربرد باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های میکوریزی بر افزایش عملکرد تر و خشک اندام هوایی گیاهان مختلف توسط بسیاری از پژوهشگران گزارش گردیده است (انصاری و همکاران، ۱۳۹۳؛ حق بهاری و سید شریف، ۱۳۹۳؛ حمزه‌ئی و صادقی می‌آبادی، ۱۳۹۳). قارچ میکوریزا از طریق گسترش هیف و توسعه سیستم ریشه، سطح جذب آب بیشتری برای گیاه فراهم کرده و به دنبال جذب آب بیشتر، مواد غذایی بیشتری نیز جذب شده که منجر به تولید و تجمع ماده خشک بیشتری در گیاه می‌گردد (Auge, 2001; Casson and Lindsey, 2003). در رابطه با اثر تحریکی باکتری‌های محرک رشد نیز می‌توان بیان داشت که باکتری‌های محرک رشد از طریق سازوکارهای مختلف، از جمله تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، تولید سیدروفور، افزایش جذب

تفاوت آماری با تیمار شاهد نداشتند. هیف‌های قارچ میکوریزا می‌توانند موجب افزایش سطح جذب کننده ریشه و افزایش در جذب آب که این امر موجب کاهش تاثیرات تنش می‌گردد (Baon et al., 1994). محرک‌های رشد با تاثیر مستقیم در تثبیت زیستی نیتروژن و افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی مختلف برای گیاه باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که بین قارچ میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد اثر متقابل وجود دارد (Antunes et al., 2005). تأثیر باکتری‌های ازتوباکتر، *Azospirillum* و *Pseudomonas* به عنوان محرک‌های رشد رویشی در افزایش تعداد برگ در بوته و افزایش سطح برگ توسط Gelder و Van Gelder (۱۹۸۸) و Niakan و همکاران (۲۰۰۴) در گیاه دارویی نعنای فلفلی گزارش شده است. با توجه به این واقعیت که باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا از یک طرف از طریق تأثیر بر جذب عناصر غذایی پرمصرف مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم (James et al., 2008; Sundara et al., 2001) و از طرف دیگر از طریق تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند جیبرلین (تأثیر در رشد طولی سلول‌ها، به ویژه میانگره‌های ساقه)، اکسین و سیتوکینین (تأثیر در تقسیم سلولی) سبب افزایش صفات رویشی گیاه می‌گردند (Gutierrez-Manero et al., 2001). گزارش‌های متعددی به تأثیر مثبت باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا بر صفات رویشی گیاهانی مانند برزک، بابونه شیرازی و کدو حلوائی اشاره کرده‌اند (انصاری و همکاران، ۱۳۹۳؛ دهقانی مشکانی و همکاران، ۱۳۸۹؛ ال-یزید و همکاران، ۲۰۰۷).

تفاوت آماری با تیمار شاهد نداشتند. هیف‌های قارچ میکوریزا می‌توانند موجب افزایش سطح جذب کننده ریشه و افزایش در جذب آب که این امر موجب کاهش تاثیرات تنش می‌گردد (Baon et al., 1994). محرک‌های رشد با تاثیر مستقیم در تثبیت زیستی نیتروژن و افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی مختلف برای گیاه باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. تحقیقات نشان داده است که بین قارچ میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد اثر متقابل وجود دارد (Antunes et al., 2005). تأثیر باکتری‌های ازتوباکتر، *Azospirillum* و *Pseudomonas* به عنوان محرک‌های رشد رویشی در افزایش تعداد برگ در بوته و افزایش سطح برگ توسط Gelder و Van Gelder (۱۹۸۸) و Niakan و همکاران (۲۰۰۴) در گیاه دارویی نعنای فلفلی گزارش شده است. با توجه به این واقعیت که باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا از یک طرف از طریق تأثیر بر جذب عناصر غذایی پرمصرف مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم (James et al., 2008; Sundara et al., 2001) و از طرف دیگر از طریق تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند جیبرلین (تأثیر در رشد طولی سلول‌ها، به ویژه میانگره‌های ساقه)، اکسین و سیتوکینین (تأثیر در تقسیم سلولی) سبب افزایش صفات رویشی گیاه می‌گردند (Gutierrez-Manero et al., 2001). گزارش‌های متعددی به تأثیر مثبت باکتری‌های محرک رشد و قارچ‌های آربوسکولار میکوریزا بر صفات رویشی گیاهانی مانند برزک، بابونه شیرازی و کدو حلوائی اشاره کرده‌اند (انصاری و همکاران، ۱۳۹۳؛ دهقانی مشکانی و همکاران، ۱۳۸۹؛ ال-یزید و همکاران، ۲۰۰۷).

**تعداد گل، قطر گل:** کاربرد کود زیستی در شرایط تنش خشکی بر تعداد گل و قطر گل در گیاه همیشه بهار موثر بود. به این ترتیب استفاده از کود زیستی سبب افزایش تعداد گل و قطر گل در سطوح مختلف تنش خشکی نسبت به تیمار شاهد شد. تعداد گل در تیمار کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* در شرایط آبیاری کامل (۱۸/۵۰ عدد) نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. همچنین کاربرد توام باکتری

**صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی:** میانگین مربعات حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد اثرات ساده و متقابل تنش خشکی و کود زیستی بر مقدار رنگدانه های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) معنی‌دار بود. این در حالی است که تیمارهای فوق در هیچ یک از سطوح بر مقدار کاروتنوئید موجود در برگ همیشه بهار معنی‌دار نشد. همچنین اثر ساده خشکی بر تمام صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده (هدایت روزنه ای، پرولین، فلاونوئید گلبرگ و کربوهیدرات کل) اختلاف معنی‌دار نشان داد. اثر ساده کود زیستی بر مقدار پرولین، هدایت روزنه‌ای و

جدول ۳- اثر متقابل تنش خشکی و کود زیستی بر صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده در گیاه همیشه بهار

خشکی (FC %)	کود زیستی	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	وزن خشک کاسه گل (گرم)	تعداد گل	قطر گل (سانتیمتر)
	شاهد	۲/۰۹ <sup>fg</sup>	۱/۳۱ <sup>gh</sup>	۴/۲۵ <sup>d</sup>	۵/۶۲ <sup>g</sup>
	Ps	۸/۰۵ <sup>a</sup>	۴/۵۲ <sup>a</sup>	۱۸/۵۰ <sup>a</sup>	۷/۱۲ <sup>b</sup>
	Az	۳/۷۵ <sup>def</sup>	۱/۹۶ <sup>defgh</sup>	۸/۷۵ <sup>cd</sup>	۷/۷۵ <sup>b</sup>
	M	۴/۴۶ <sup>cde</sup>	۲/۹۵ <sup>bcde</sup>	۱۰/۷۵ <sup>bc</sup>	۶/۰۰ <sup>fg</sup>
۱۰۰	M+Ps	۵/۷۳ <sup>bcd</sup>	۳/۸۱ <sup>ab</sup>	۱۷/۵ <sup>a</sup>	۷/۰۰ <sup>cde</sup>
	M+Az	۶/۶۴ <sup>abc</sup>	۳/۲۶ <sup>abcd</sup>	۱۶/۷۵ <sup>ab</sup>	۷/۲۵ <sup>bc</sup>
	Ps + Az	۳/۱۵ <sup>efg</sup>	۲/۸۷ <sup>bcdef</sup>	۸/۷۵ <sup>cd</sup>	۷/۰۰ <sup>cde</sup>
	M+Ps+Az	۴/۴۶ <sup>cde</sup>	۲/۹۵ <sup>bcde</sup>	۱۰/۵۰ <sup>c</sup>	۸/۷۵ <sup>a</sup>
	شاهد	۱/۸ <sup>fg</sup>	۱/۲۳ <sup>gh</sup>	۵/۰۰ <sup>cd</sup>	۶/۱۲ <sup>fg</sup>
	Ps	۱/۸۹ <sup>fg</sup>	۱ <sup>gh</sup>	۵/۷۵ <sup>cd</sup>	۶/۵۰ <sup>def</sup>
	Az	۲/۸۷ <sup>efg</sup>	۱/۷۴ <sup>efgh</sup>	۷/۲۵ <sup>cd</sup>	۶/۳۷ <sup>ef</sup>
	M	۱/۶۱ <sup>g</sup>	۰/۷۸ <sup>h</sup>	۳/۷۵ <sup>d</sup>	۶/۰۰ <sup>fg</sup>
۵۰	M+Ps	۶/۶۶ <sup>ab</sup>	۳/۴۴ <sup>abc</sup>	۱۷/۷۵ <sup>a</sup>	۶/۸۷ <sup>cde</sup>
	M+Az	۳/۲۶ <sup>efg</sup>	۱/۵۲ <sup>efgh</sup>	۵/۷۵ <sup>cd</sup>	۶/۵۰ <sup>def</sup>
	Ps + Az	۲/۱۳ <sup>fg</sup>	۱/۰۴ <sup>gh</sup>	۴/۲۵ <sup>d</sup>	۶/۰۰ <sup>fg</sup>
	M+Ps + Az	۳/۵۱ <sup>efg</sup>	۲/۱۹ <sup>efg</sup>	۸/۰۰ <sup>cd</sup>	۶/۶۲ <sup>cdef</sup>

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، اختلاف معنی‌داری ندارند

جدول ۴- میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در گیاه همیشه بهار

منابع تغییر	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتونوئید	هدایت روزنه ای	پروکلین	فلانوئوئید گل	کربوهیدرات کل
تنش خشکی	۱	۹/۱۵ <sup>**</sup>	۰/۹۰۷ <sup>**</sup>	۱۶/۹۲۱ <sup>**</sup>	۰/۱۷۳ <sup>ns</sup>	۱۰۳/۱۷۴ <sup>**</sup>	۳/۷۷۳ <sup>*</sup>	۶۹/۹۶۹ <sup>**</sup>	۵۹۸۲/۳۸۴ <sup>**</sup>
کود زیستی	۷	۶/۵۱۱ <sup>**</sup>	۰/۶۵۸ <sup>**</sup>	۶/۸۰۳ <sup>**</sup>	۰/۱۳۱ <sup>ns</sup>	۳/۹۲۶ <sup>ns</sup>	۰/۴۳۳ <sup>ns</sup>	۱۰/۸۳۱ <sup>**</sup>	۳۹۴/۳۷۷ <sup>ns</sup>
تنش خشکی × کود زیستی	۷	۲/۶۲۹ <sup>**</sup>	۱/۰۶۷ <sup>*</sup>	۱۲/۴۲۳ <sup>**</sup>	۰/۰۶۰ <sup>ns</sup>	۷/۴۵۸ <sup>*</sup>	۱/۲۴۹ <sup>ns</sup>	۱۱/۱۱۸ <sup>**</sup>	۶۳۷/۱۴۱ <sup>ns</sup>
خطا	۴۸	۱/۱۵۰	۰/۱۳۳	۰/۷۱۳	۰/۰۶۴	۲/۳۱۶	۰/۹۱۰	۰/۱۵۸	۴۷۵/۶۰۶

ns، \*، \*\* به ترتیب نشان دهنده اختلاف غیر معنی‌دار و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد است.

تیمار شاهد کود زیستی افزایش یافت. همچنین در تیمار کاربرد توام باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobactore* *chroococcum* مقدار کلروفیل a در شرایط تنش خشکی نسبت به حالت شاهد (آبیاری کامل) افزایش یافت (جدول ۵). به نظر می‌رسد این باکتری‌ها با افزایش میزان جذب نیتروژن، آهن و منگنز سبب افزایش محتوای کلروفیل برگ در گیاه می‌شوند (Hosseinzadah et al., 2011). مقدار کلروفیل b

کربوهیدرات کل بی‌تاثیر بود و بر مقدار فلانوئوئید گلبرگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد. اثر متقابل تنش خشکی و کود زیستی بر دو صفت هدایت روزنه‌ای و فلانوئوئید گلبرگ به ترتیب در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد اثر معنی‌دار داشت (جدول ۴).

کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتونوئید: با ورود به شرایط تنش کلروفیل a، b و کلروفیل کل برگ همیشه بهار در



جدول ۵- اثر متقابل تنش خشکی و کود زیستی بر صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در گیاه همیشه بهار

تنش خشکی (FC %)	کود زیستی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	فلاونوئید گل	هدایت روزنه ای	هدایت روزنه ای
		(میلی گرم برگرم)		(مول دی اکسید کربن بر مترمربع در ثانیه)			
۱۰۰	Control	۱/۷۹ <sup>e</sup>	۱/۸۵ <sup>def</sup>	۳/۲۸ <sup>g</sup>	۰/۳۹ <sup>d</sup>	۲۳/۸۲ <sup>bcd</sup>	۲۳/۸۲ <sup>bcd</sup>
	Ps	۲/۱۴ <sup>cde</sup>	۲/۴۴ <sup>bc</sup>	۴/۵۹ <sup>cde</sup>	۴/۴۹۹ <sup>b</sup>	۲۲/۴۷ <sup>d</sup>	۲۲/۴۷ <sup>d</sup>
	Az	۲/۸۳ <sup>bc</sup>	۲/۲۶ <sup>bcd</sup>	۵/۰۹ <sup>bc</sup>	۰/۳۳۵ <sup>d</sup>	۲۳/۱۷ <sup>d</sup>	۲۳/۱۷ <sup>d</sup>
	M	۱/۸۶ <sup>de</sup>	۱/۹۰ <sup>def</sup>	۳/۷۶ <sup>defg</sup>	۰/۴۰۱ <sup>d</sup>	۲۳/۱۷ <sup>d</sup>	۲۳/۱۷ <sup>d</sup>
	M+Ps	۲/۸۶ <sup>bcd</sup>	۱/۸۳ <sup>def</sup>	۴/۵۲ <sup>cdef</sup>	۴/۹۷ <sup>ab</sup>	۲۵/۸۱ <sup>ab</sup>	۲۵/۸۱ <sup>ab</sup>
	M+Az	۱/۸۲ <sup>de</sup>	۱/۹۴ <sup>cdef</sup>	۳/۷۷ <sup>defg</sup>	۵/۴۳ <sup>a</sup>	۲۵/۶ <sup>abc</sup>	۲۵/۶ <sup>abc</sup>
	Ps + Az	۱/۵۲ <sup>e</sup>	۱/۸۵ <sup>def</sup>	۳/۳۸ <sup>fg</sup>	۳/۵۳ <sup>c</sup>	۲۶/۲۷ <sup>a</sup>	۲۶/۲۷ <sup>a</sup>
	M+Ps+ Az	۱/۴۳ <sup>bcd</sup>	۲/۳۴ <sup>bcd</sup>	۴/۹۲ <sup>bcd</sup>	۰/۲۶ <sup>d</sup>	۲۶/۲۴ <sup>a</sup>	۲۶/۲۴ <sup>a</sup>
۵۰	Control	۶/۴۰ <sup>a</sup>	۳/۵۳ <sup>a</sup>	۹/۹۳ <sup>a</sup>	۰/۳۵۱ <sup>d</sup>	۲۲/۷۷ <sup>de</sup>	۲۲/۷۷ <sup>de</sup>
	Ps	۲/۰۲ <sup>cde</sup>	۲/۲۴ <sup>bcd</sup>	۴/۲۶ <sup>cdefg</sup>	۰/۴۱۱ <sup>d</sup>	۲۲/۷۷ <sup>de</sup>	۲۲/۷۷ <sup>de</sup>
	Az	۲/۴۹ <sup>bcd</sup>	۲/۲۷ <sup>bcd</sup>	۴/۷۶ <sup>bcd</sup>	۰/۵۶۸ <sup>d</sup>	۲۲/۰۷ <sup>de</sup>	۲۲/۰۷ <sup>de</sup>
	M	۲/۲۷ <sup>cde</sup>	۱/۵۸ <sup>f</sup>	۳/۸۵ <sup>defg</sup>	۰/۴۹۳ <sup>d</sup>	۲۲/۹۲ <sup>d</sup>	۲۲/۹۲ <sup>d</sup>
	M+Ps	۳/۴۱ <sup>b</sup>	۲/۵۰ <sup>b</sup>	۵/۹۱ <sup>b</sup>	۰/۳۵۰ <sup>d</sup>	۲۱/۸۹ <sup>de</sup>	۲۱/۸۹ <sup>de</sup>
	M+Az	۱/۹۲ <sup>cde</sup>	۱/۸۷ <sup>def</sup>	۳/۷۹ <sup>defg</sup>	۰/۳۲۲ <sup>d</sup>	۲۳/۱۷ <sup>d</sup>	۲۳/۱۷ <sup>d</sup>
	Ps + Az	۲/۸۲ <sup>bc</sup>	۲/۸۳ <sup>abcd</sup>	۵/۳۷ <sup>bc</sup>	۰/۴۳۵ <sup>d</sup>	۲۳/۶۵ <sup>cd</sup>	۲۳/۶۵ <sup>cd</sup>
	M+Ps + Az	۱/۸۶ <sup>de</sup>	۱/۸۰ <sup>ef</sup>	۳/۶۶ <sup>efg</sup>	۰/۱۷۶ <sup>d</sup>	۲۰/۶۲ <sup>e</sup>	۲۰/۶۲ <sup>e</sup>

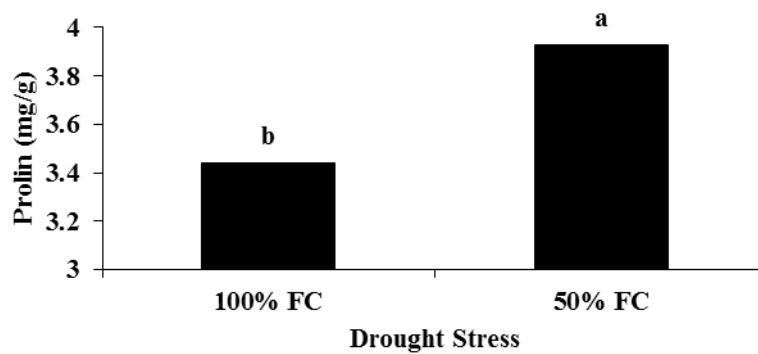
میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، اختلاف معنی‌داری ندارند.

فیزیولوژیکی مقاومت به تنش است. تغییر میزان کلروفیل برگ تحت شرایط تنش خشکی با توجه به نوع گیاه، مرحله رشدی، طول دوره رشد و شدت تنش متفاوت است (بلوم، ۱۳۹۱). در بابونه آلمانی گزارش شده است که تنش‌های خشکی ملایم میزان کلروفیل را افزایش داد و با ادامه تنش‌های شدید خشکی این مقادیر به حداقل میزان خود رسید (Pirzad et al., 2009). افزایش غلظت کلروفیل کل گیاه با افزایش شدت تنش خشکی می‌تواند دلالت بر افزایش ظرفیت گیاه جهت به دام انداختن نور و نوعی خود تنظیمی گیاه در برابر تنش خشکی باشد، چرا که با کاهش محتوای کلروفیل گیاه و افزایش جذب نور توسط اجزای فتوسنتزی منجر به تولید گونه‌هایی از اکسیژن فعال شده که خود منجر به تجزیه

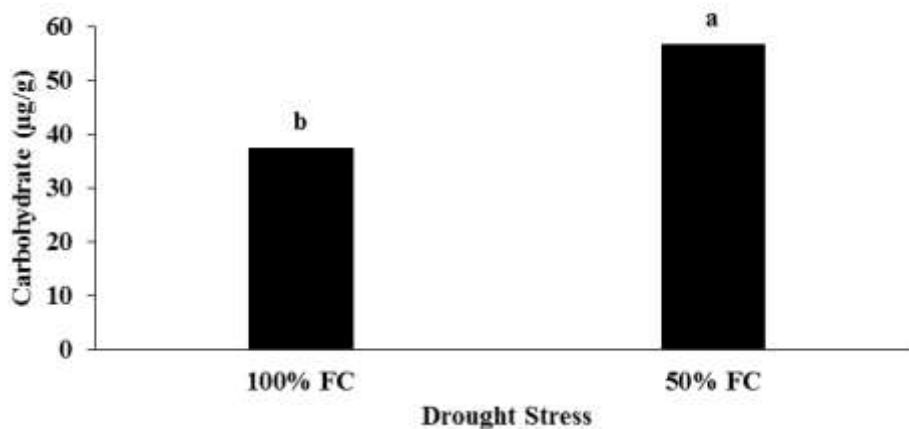
در تیمار شاهد (عدم کاربرد کود زیستی)، تیمار کاربرد توام باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobactore chroococcum* در شرایط تنش خشکی نسبت به آبیاری کامل افزایش داشت. کلروفیل کل نیز تحت تاثیر تنش خشکی و کاربرد کود زیستی قرار گرفت. مقدار کلروفیل کل در شرایط تنش خشکی در تیمار شاهد، کاربرد توام باکتری *Azotobactore chroococcum* و *Pseudomonas fluorescens* و تیمار کاربرد توام فارچ میکوریزا و باکتری *Pseudomonas fluorescens* نسبت به حالت آبیاری کامل افزایش داشت. میزان کلروفیل یک ویژگی مهم برای فهم چگونگی پاسخ گیاه است به محیطی که در آن به سر می‌برد. در واقع دوام فتوسنتز و حفظ کلروفیل برگ تحت شرایط تنش از جمله شاخص‌های

هدایت روزنه ای، میزان پرولین، فلاونوئید موجود در برگ و کربوهیدرات کل: تنش خشکی منجر به کاهش هدایت روزنه ای شد. همچنین در تیمار کاربرد باکتری *Azotobactore chroococcum* به تنهایی، تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و باکتری *Pseudomonas fluorescens*، تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و باکتری *Azotobactore chroococcum*، تیمار ترکیبی دو باکتری و تیمار ترکیبی قارچ میکوریزا و دو باکتری، هدایت روزنه ای در شرایط تنش خشکی، نسبت به شرایط آبیاری کامل کاهش یافت. در تیمار کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* به تنهایی و تیمار شاهد از لحاظ آماری تفاوت معنی داری در شرایط رطوبتی ۵۰٪ و ۱۰۰٪ ظرفیت زراعی خاک مشاهده نشد (جدول ۵). در تنش ۵۰٪ ظرفیت زراعی و در شرایط شاهد کود زیستی هدایت روزنه ای برابر ۲۲/۷ مول بر متر مربع بر ثانیه بود در تیمار تلفیقی *Azotobactore chroococcum* و *Pseudomonas fluorescens*، به ۲۳/۶ مول بر متر مربع بر ثانیه رسید. تنش رطوبتی موجب بسته شدن روزنه ها و کاهش هدایت روزنه ای برگ می شود (مرادی مرجانه و گلدانی، ۱۳۹۰). تحقیقات Silva و همکاران (۲۰۱۰) روی آلونه ورا ثابت کرد که در نهایت سلول های نگهدار روزنه در پی تنش آبی و محدودیت آبیاری، کوچک تر شده و نهایتا میزان فتوسنتز کاهش می یابد. همچنین با توجه به نتایج جدول ۵ مقدار فلاونوئید گلبرگ در گیاه همیشه بهار تحت تاثیر کودهای زیستی مورد استفاده در آزمایش در شرایط تنش قرار گرفت. بدین صورت که مقدار فلاونوئید گل تحت تاثیر تنش خشکی (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) نسبت شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) در تیمار کاربرد ترکیبی باکتری *Azotobactore chroococcum* و قارچ میکوریزا و تیمار باکتری *Pseudomonas fluorescens* به تنهایی، تیمار کاربرد توام دو باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Azotobactore chroococcum* و تیمار ترکیبی میکوریزا و باکتری *Pseudomonas fluorescens* کاهش یافت. سایر تیمارهای آزمایش از لحاظ آماری با یکدیگر تفاوت معنی داری نداشتند.

رنگیزه های دخیل در جذب نور می شوند (Herbingr *et al.*, 2002). در این تحقیق میکوریزا در ترکیب با باکتری سودوموناس در شرایط تنش خشکی توانست مقدار کلروفیل را افزایش دهد. این تیمار ترکیبی مقدار کلروفیل را در هر دو سطح تنش نسبت به تیمار شاهد در شرایط آبیاری کامل افزایش داد. میکوریزا از طریق ایجاد روابط همزیستی با گیاه در جذب کارآمد برخی عناصر مانند فسفر که به عنوان عنصر کلیدی در انتقال انرژی طی فرآیند فتوسنتز مطرح است، افزایش محتوای کلروفیل و به دنبال آن فتوسنتز را به دنبال دارد (Zarea *et al.*, 2012). همچنین، گزارش شده است که میکوریزا با تسهیل روند جذب عناصری مانند نیتروژن و منیزیم (جزء اصلی ساختار مولکول کلروفیل) به افزایش محتوای کلروفیل کمک می کند (Munoz *et al.*, 2011). قارچ های میکوریزایی و باکتری های حل کننده فسفر با افزایش مقدار جذب فسفر روی کلروفیل a, b و کل تاثیر مثبتی داشتند. قارچ های میکوریزی با افزایش محتوای قند، افزایش سطح هورمون های گیاهی مانند سیتوکینین و جبریلین در گیاهان را به همراه دارند (Demir, 2004). افزایش میزان این هورمون ها به ویژه سیتوکینین با انتقال یون های مؤثر در تنظیم سطح کلروفیل مؤثر واقع شده است (Demir, 2004). در کاهو گزارش شده است که مصرف میکوریزا و باکتری، هدایت روزنه ای و میزان کل کلروفیل را افزایش داد (Vivas *et al.*, 2003). تفاوت میزان کلروفیل بین تیمارهای مختلف به تولید سیتوکینین های سنتز شده توسط باکتری ها و قارچ ها نسبت داده شده است، زیرا که این هورمون واکنش زیادی به فسفر جذب شده دارد (Vivas *et al.*, 2003). استفاده از مایه تلقیح باکتری سودوموناس فلورسنس میزان کلروفیل برگ گندم را افزایش داد (سادات، ۱۳۸۶). باکتری های ریزوسفری می توانند از افزایش غلظت اتیلن در گیاهان در هنگام بروز تنش جلوگیری نموده و سبب کاهش اثرات منفی این هورمون در رشد و توسعه اندام های گیاه از طریق تولید آنزیم ACC-دآمیناز شوند. این آنزیم به صورت غیر مستقیم و بیشتر از طریق کاهش سطح اتیلن تنشی در گیاه باعث تداوم رشد گیاه می گردد (Grichko and Glick, 2001).



شکل ۱- اثر تنش خشکی بر غلظت پرولین برگ گیاه همیشه بهار. میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، اختلاف معنی‌داری ندارند.



شکل ۲- اثر تنش خشکی بر مقدار کربوهیدرات کل برگ گیاه همیشه بهار. میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند، اختلاف معنی‌داری ندارند.

نیز می‌شود (Peng *et al.*, 2008). همچنین پرولین مانند یک آنتی‌اکسیدان قوی این توانایی را دارد که از مرگ سلول‌ها در برابر تنش‌های محیطی جلوگیری کند (Chen and Dickman, 2005). سطوح بالای پرولین، گیاه را قادر می‌سازد تا پتانسیل اسمزی خود را در حد پایین نگه دارد (Valliyodan and Nguyen, 2006). افزایش مقدار پرولین تحت تنش خشکی در گیاه گشنیز، زنیان و آویشن ثبت شده است (نورزاد و همکاران، ۱۳۹۴؛ رضوی زاده و همکاران، ۱۳۹۳؛ بابایی و همکاران، ۱۳۸۹؛ باهرنیک و همکاران، ۱۳۸۶). از طرفی یکی از سازوکارهای کارآمدی که گیاه به هنگام مواجهه با خشکی، برای حفظ تورژسانس و آماس سلولی به خدمت می‌گیرد، تنظیم اسمزی است. در طی این پدیده فیزیولوژیکی، پتانسیل اسمزی

تنش خشکی منجر به افزایش غلظت پرولین و کربوهیدرات محلول در گیاه همیشه بهار شد (شکل ۱ و ۲). به طوریکه مقدار اسیدآمین پرولین در شرایط عدم اعمال تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) ۳/۴۴ میکروگرم بر گرم وزن خشک بود و پس از اعمال تنش خشکی به ۳/۹۳ میکروگرم بر گرم وزن تر رسید. همچنین در تنش ۵۰ درصد ظرفیت زراعی مقدار کربوهیدرات محلول ۶۰ درصد نسبت به تیمار عدم اعمال تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) افزایش داشت. اسیدآمین پرولین از ترکیبات تنظیم کننده اسمزی است که غلظت آن تحت شرایط تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی افزایش می‌یابد (Peng *et al.*, 2008) این ماده به عنوان آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی باعث حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن

گل، قطر گل، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، وزن خشک گلبرگ و هدایت روزنه‌ای در گیاه نسبت به تیمار شاهد کاهش نشان داد. همچنین مقدار پرولین، کربوهیدرات کل و محتوای کلروفیل گیاه تحت تاثیر کاهش ظرفیت زراعی خاک از ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی به نصف آن افزایش داشت. کاربرد باکتری‌های محرک رشد در اکثر صفات منجر به بهبود صفات اندازه گیری شده در گیاه در شرایط تنش و غیر تنش گردید. در اغلب موارد کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* به تنهایی و در ترکیب با قارچ میکوریزا در شرایط اعمال تنش (۵۰ درصد ظرفیت زراعی) منجر به بهبود صفات رشدی در گیاه همیشه بهار شد. تعداد گل، قطر گل، وزن خشک اندام هوایی و ریشه و محتوی کلروفیل گیاه در اثر کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* به تنهایی در خاک یا کاربرد توام آن با قارچ میکوریزا در شرایط تنش بهبود یافتند. ریزوباکتری‌های محرک رشد علاوه بر کاهش اثرات تنش، احتمالاً انحلال پذیری و یا جذب فسفر را نیز افزایش می‌دهند. در انتها می‌توان بیان کرد کاربرد باکتری *Pseudomonas fluorescens* در خاک به تنهایی یا توام با قارچ میکوریزا در گیاه همیشه بهار در شرایط تنش خشکی قابلیت بهبود رشد گیاه را داشته و منجر به افزایش کارایی گیاه در شرایط تنش خشکی می‌شود.

### سپاسگزاری

بدینوسله از واحد ویژه خدمات تخصصی علوم باغبانی و مهندسی فضای سبز دانشگاه فردوسی مشهد بابت تامین بخشی از هزینه‌های این پژوهش قدردانی می‌گردد.

بافت‌های تحت تنش، در اثر انباشت یک سری مواد اسمزی در سلول‌ها کاهش می‌یابد، بنابراین فشار آماس سلول‌ها در حد مطلوب نگهداری می‌شود (Omidi, 2010). این مواد اسمزی به طور عمده شامل عناصر (پتاسیم، سدیم و کلسیم) و برخی متابولیت‌ها نظیر قندها (مونوساکاریدها)، اسیدهای آمینه (پرولین) و اسیدهای آلی می‌باشد (حسینی و همکاران، ۱۳۸۲). این ترکیب‌های انباشته شده حتی در غلظت‌های بالا نیز با متابولیسم طبیعی سلول سازگاری دارند، به همین دلیل به متابولیت‌های سازگار نیز معروف هستند (Zhu, 2001; Apse and Blumwald, 2002). تنش خشکی باعث تجزیه نشاسته و مصرف تدریجی آن می‌شود. کاهش مقدار نشاسته در نتیجه فعالیت آمیلاز، منجر به افزایش مقدار قندهای محلول می‌گردد (Omidi, 2010) که این افزایش قندهای محلول در نتایج فوق نیز مشاهده گردید. Sanchez و همکاران (۱۹۹۸) نیز با بررسی تنش خشکی روی ارقام مختلف نخود تجمع کربوهیدرات‌های محلول را مشاهده کردند. در گیاه دارویی زنیان و وایول (*Parthenium argentatum* Gray) افزایش در مقدار کربوهیدرات محلول برگ، در اثر تنش خشکی گزارش شده است (رضوی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳؛ باهرنیک و همکاران، ۱۳۸۶).

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده از آزمایش مشخص گردید که اعمال تنش خشکی در گیاه دارویی همیشه بهار منجر به کاهش رشد در گیاه شده و شاخص‌های رشدی گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. بدین صورت که با کاهش ظرفیت زراعی خاک از ۱۰۰ درصد به ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، سطح برگ، تعداد

### منابع

- احمدی، ع. و بیکر، د.آ. ۱۳۷۹. عوامل روزنه ای و غیر روزنه ای محدود کننده فتوسنتز در گندم در شرایط خشکی. مجله علوم کشاورزی ایران، ۳۱ (۴): ۸۱۳-۸۲۵.
- انصاری، ا.، رزمجو، ج.، کریم مجنی، ح. و زارعی، م. (۱۳۹۳) تأثیر تلقیح با میکوریز و پیش تیمار با سالیسیلیک اسید در سطوح مختلف خشکی بر خصوصیات مورفولوژیکی و عملکرد بزرک. تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی: ۱۵-۲۶.

- بابایی، ک.، امینی، م.، مدرس ثانوی، ع. و جبّاری، ر. (۱۳۸۹) اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و درصد تیمول در آویشن. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲: ۲۳۹-۲۵۱.
- بهرنیک، ز.، میرزا، م.، عباس زاده، ب. و نادری، م. (۱۳۸۶) تأثیر تنش خشکی بر برخی فرآیندهای متابولسمی گیاه وایول. فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۳: ۳۱۵-۳۲۳.
- بلوم، الف. (۱۳۹۱) ترجمه گلکار. پ.، امیری پور، م. اصلاح گیاهان زراعی برای تحمل به تنش خشکی انتشارات کنکاش. اصفهان. ۴۲۱.
- جزی زاده، الف. و مرتضایی نژاد، ف. (۱۳۹۶) اثرات تنش خشکی بر شاخص های فیزیولوژیک و مورفولوژیک گیاه کاسنی جهت معرفی در فضای سبز. فرایند و کارکرد گیاهی ۶(۲۱): ۲۸۰-۲۹۰.
- حاجی نیا، س. و زارع، م.ج. (۱۳۹۳) تأثیر تلقیح دو جانبه قارچ *Piriformospora indica* و باکتری *Azospirillum spp.* بر برخی صفات فیزیولوژیک، جذب عناصر و عملکرد دانه گندم تحت تنش شوری. فن آوری تولیدات گیاهی ۱۴: ۱۴۹-۱۶۱.
- حسنی، ع.، امیدبگی، ر. و حیدری شریف آباد، ح. (۱۳۸۲) بررسی برخی از شاخص های مقاومت به خشکی در گیاه ریحان. علوم کشاورزی و منابع طبیعی ۱۰(۴): ۶۵-۷۴.
- حق بهاری، م. و سید شریفی، ر. (۱۳۹۳) مطالعه عملکرد کمی و کیفی، محتوای کلروفیل و برخی شاخص های رشدی گندم در پاسخ به پیش تیمار بذر با باکتری PGPR در سطوح مختلف شوری خاک. علوم و فنون کشت های گلخانه ای ۵: ۵۱-۶۴.
- حمزه ئی، ج. و صادقی می آبادی، ف. (۱۳۹۳) اثر دور آبیاری و قارچ مایکوریزا آربوسکولار بر شاخص کلروفیل، عملکرد و اجزای عملکرد سورگوم دانه ای. تولید و فرآوری محصولات زراعی و باغی. ۴: ۲۱۱-۲۲۰.
- خندان میرکوهی، ع.، طاهری، م.ر.، ظفرفرخی، ف.ف. و رجالی، ف. (۱۳۹۵) ارزیابی تأثیر قارچ ریشه آرباسکولار و باکتری های محرک رشد در شرایط تنش کم آبی بر عملکرد گیاه زینتی استئوسپرموم (*Osteospermum hybrida* 'Passion Mix'). علوم باغبانی ایران ۴۷: ۱۷۷-۱۹۱.
- دهقانی مشکانی، م.ر.، نقدی بادی، ح.، درزی، م.، مهرآفرین، ع.، رضازاده، ش. و کدخدای، ز. (۱۳۸۹) تأثیر کودهای زیستی بر عملکرد کمی و کیفی گیاه بابونه شیرازی. فصلنامه گیاهان دارویی ۱۰: ۳۵-۴۷.
- روضوی زاده، ر.، شفقت، م. و نجفی، ش. (۱۳۹۳) اثر تنش کمبود آب بر شاخص های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه زینان. زیست شناسایی گیاهی ایران. ۲۲: ۲۵-۳۸.
- سادات، ع. (۱۳۸۶) تأثیر مایکوریزا و محرک های رشد گیاهان بر رشد مواد مغذی و عملکرد گندم تحت شرایط شوری. کارشناسی ارشد پایان نامه، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
- غلامی، آ. و کوچکی، آ. (۱۳۸۰) مایکوریزا در کشاورزی پایدار. انتشارات دانشگاه شاهرود. سمنان. ایران. ۲۱۲ صفحه.
- کوچکی، ع.ر.، تبریزی، ل. و قربانی، ل. (۱۳۸۷) ارزیابی اثر کودهای بیولوژیک بر ویژگی های رشد، عملکرد و خصوصیات کیفی گیاه دارویی زوفا (*Hyssopus officinalis*). مجله پژوهش های زراعی ایران ۶: ۲۷۰-۲۸۳.
- مرادی مرجانه، الف. و گلدانی، م. (۱۳۹۰) ارزیابی سطوح مختلف سالیسیلیک اسید بر تعدادی شاخص های رشد گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت شرایط کم آبیاری. مجله تنش های محیطی در علوم زراعی ۴(۱): ۳۳-۴۵.
- مقدسان، ش.، صفی پور افشار، الف. و نعمت پور، ف.س. (۱۳۹۴) نقش مایکوریزا در تحمل به خشکی همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.). نشریه علمی - پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی ۴: ۵۲۱-۵۳۲.

منافی، ح. (۱۳۸۹) تأثیر مایکوریزا بر خواص هیدرولیک خاک و تحمل گوجه فرنگی در برابر تنش کمبود آب. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تبریز، ایران.

نورزاد، س.ف.، احمدیان، الف. و مقدم، م. (۱۳۹۴) بررسی میزان پرولین، شاخص کلروفیل، کربوهیدرات و مقدار جذب عناصر غذای در گیاه دارویی گشنیز تحت تاثیر تنش خشکی و تیمار کودی. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران ۱: ۱۳۱-۱۳۹.

- Abdullaev, F.I. and Espinosa-Aguirre, J.J. (2004) Biochemical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and Prevention* 28: 426-432.
- Abo-Ghaila, H.H. and Khalafallah, A. A. (2008) Responses of wheat plants associated with arbuscular mycorrhizal fungi to short-term water stress followed by recovery at three growth stages. *Journal of Applied Sciences Research* 4: 570-580.
- Al-Karaki, G. N. (1998) Benefit, cost and water-use efficiency of arbuscular mycorrhizal durum wheat grown under drought stress. *Mycorrhiza* 8: 41-45.
- Al-Karaki, G. N. (2000) Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10(2), 51-54.
- 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. *Mycorrhizae* Issue: Online First, Published online: 16 December 2005.
- Apse, M.P. and Blumwald, E. (2002) Engineering salt tolerance in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 146-150.
- Arora, D., Rani, A. and Sharma, A. (2013) A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Reviews* 7: 179-187.
- Auge, R. M. (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhizae* 11: 3-42.
- 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.
- Barassi, C.A., Ayrault, G., Creus, C.M., Sueldo, R.J. and Sobero, M.T. (2006) Seed inoculation with *Azospirillum* mitigates NaCl effects on lettuce. *Scientia Horticulturae (Amsterdam)*. 109: 8-14.
- Bates, L.S., Waldran, R.P. and Teare, I.D. (1973) Rapid determination of free proline for water studies. *Plant Soil* 39: 205-208.
- Casson, S.A. and Lindsey, K. (2003) Genes and signalling in root development. *New Phytology* 158: 11-38.
- Chang, Y.L., Kim, D.O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50: 3713-3717.
- Cgandra, S., Khan, S., Avula, B., Lata, H., Yang, M., Elshohly, M.A. and Khan. I.A. (2014) Assessment of Total Phenolic and Flavonoid Content, Antioxidant Properties, and Yield of Aeroponically and Conventionally Grown Leafy Vegetables and Fruit Crops: A Comparative Study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 1-9.
- Chen, C. and Dickman, M.B. 2005. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Colletotrichum trifolii*. *PNAS*. 102: 3459-3464.
- Chen, W. P., Li, P. H. and Chen, T. H. (2015) Glycine betaine increase chilling tolerance and reduce chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment* 23: 609- 618.
- Darzi, M.T., Ghalavand, A., Rejali, F. and Sefidkon, F. (2006) Effects of Biofertilizers Application on Yield and Yield Components in Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 22(4): 276-292.
- Deepika, S. and Kothamasi, D. (2015) Soil moisture--a regulator of arbuscular mycorrhizal fungal community assembly and symbiotic phosphorus uptake. *Mycorrhiza* 25:67-75.
- Demin, I. N., Deryabin, A. N., Sinkevich, M. S. and Trunova, T. I. (2008) Insertion of cyanobacterial desA gene coding for  $\Delta 12$ -acyl-lipid desaturase increases potato plant resistance to oxidative stress induced by hypothermia. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 710-720.
- Dere, S., Gines, T. and Sivaci, R. (1998) Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid content of some algae species using different solvent. *Turkish Journal of Botany* 22: 13-17.
- El-Yazeid, A. A., Abou-Aly, H. E., Mady, M. A. and Moussa, S. A. M. (2007) Enhancing growth, productivity and quality of squash plants using phosphate dissolving microorganisms (bio phosphor) combined with boron foliar spray. *Research Journal of Agriculture and Biological* 22: 274-286.
- Gelder H. V. and Van Gelder H. H. M. (1988) Influence of nitrogen fertilizer application level on oil production and quality in *Mentha piperita* L. *Applied Plant Science* 2: 68-71.

- Ghourchiani, M., Alikhani, H., Akbari, Gh., Zareie, M. and Dadi I. (2012) Effect of phosphate solubilizing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi and chemical P fertilizer on yield and yield characters of *Zea mays* under normal and water stress conditions in Karaj. *Field Crops Research* 10(1): 214-224.
- Glick, B., Karaturovic, M. and Newell, P.C. (1995) A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *pseudomonads*. *Canadian Journal of Microbiology* 41:533-536.
- Glick, B.R., Liu, C., Ghosh, S. and Dumbrof, E.B. (1997) Early development of canola seedlings in the presence of plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR 12-2. *Soil Biology and Biochemistry* 29:1233-1239.
- Grichko, VP. And Glick, BR. (2001) Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 11-17.
- Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R. and Talon, M. (2001) The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Plant Physiology* 111: 206-211.
- Han, H. S. and Lee, K. D. (2005) Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Agriculture and Biological Sciences* 1: 210-215.
- Herbingr, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G. and Sorger, A. (2002) Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defense system of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 691- 696.
- Hosseinzadah, F., Satei, A. and Ramezanpour, M.R. (2011) Effects of Mycorrhiza and Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Growth, Nutrients Uptake and Physiological Characteristics in *Calendula officinalis* L. *Middle-East Journal of Scientific Research* 8: 947-953.
- Hu, Y. and Schmidhalter, U. (2005) Drought and salinity: A comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Plant Nutrition* 168: 541-549.
- Illmer, P. and Schinner, F. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biology Biochemistry* 24: 389-95.
- Illmer, P. and Schinner, F. (1992) Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biology Biochemistry* 24: 389-95.
- James, B., Rodel, D., Lorettue, U., Reynaldo, E. and Tariq, H. (2008) Effect of vesicular arbuscular mycorrhizal (VAM) fungi inoculation on coppicing ability and drought resistance of *Senna spectabilis*. *Pakistan Journal of Botany* 40: 2217- 2224.
- Kramer, P. J. (1983) Water relation of plant. *Agronomy Juornal* 70: 630-634.
- Munoz, I.E., Garcia de Salamone, R., Aroca, J.M., and Ruiz Lozano, R., A. (2011) Azospirillum and *arbuscular mycorrhizal* colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology* 168: 1031-1037.
- Naseem, H. and Bano, A. (2014) Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interaction* 9: 689-701.
- Niakan, M., Khavarynejad, R.A. and Rezaee, M.B. (2004) Effect of different rates of NP-K fertilizers on leaf fresh weight, dry weight, leaf area and oil content in *Mentha piperita* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants* 20(2): 131-148.
- Omidbaigi, R., Hassani, A. and Sefidkon, F. (2003) Essential oil content and composition of sweet Basil (*Ocimum basilicum*) at different irrigation regimes. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 6: 104-108.
- Omidi, H. (2010) Changes of proline content and activity of antioxidative enzymes in two canola genotypes under drought stress. *American Journal of Plant Physiology* 5(6): 338-349.
- Peng, Y. L., Gao, Z. W., Gao, Y., Liu, G. F., Sheng, L. X. and Wang, D. L. (2008) Ecophysiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt alkaline stresses. *Journal of Plant Biology* 50 (1): 29-39.
- Pirzad, A., Alyari, H., Shakiba, M.R., Zehtab-Salmasi, S. and Mohammad, A. (2009) Effect of water stress on chlorophyll amounts in german chamomile (*Matrica chamomilla* L.). *Annals of Applied Biology* 6: 315-317.
- Sanchez, F.J., Manzanares M., De Andres E.F., Tenorio J.L. and Ayerbe L. (1998) Turgor maintenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. *Field Crops Reserch* 59: 225-232.
- Shaalán, M.N. (2005) Influence of biofertilizers and chicken manure on growth, yield and seeds quality (*Nigella sativa* L.) plants. *Egyptian Journal Agriculture Reserch* 83: 18-28.
- Silva, H., Sagardia, S., Seguel, O., Torres, C., Franck, N., Tapia, C. and Cardemil, L. (2010) Effect of water availability on growth and water use efficiency for biomass and jel production in aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller). *Industrial Crops Production* 31: 20-27.
- Song, H. (2005) Effects of VAM on host plant in the condition of drought stress and its Mechanisms. *Electronic Journal of Biology* 1: 44-48.
- Stajkovic, O., Delic, D., Josic, D., Kuzmanovic, D., Rasulic, N. and Knezevic Vukcevic, J. (2011) Improvement of common bean growth-promoting bacteria. *Romanian Biotechnological Letters* 16: 5919-5926.

- Sundara, B., Natarajan, V. and Hari, K. (2001) Influence of phosphorus solubilizing bacteria on soil available P- status and sugarcane development on a tropical Vertisol. Proc. Interaction Soc. Sugarcane Technology 24: 47-51.
- Tian, M., Chen, Y. L., Li, M. and Liu, R. L. (2013) Structure and function of *arbuscular mycorrhiza*: a review. Chinese Journal of Applied Ecology 24: 2369-2376.
- Turan, M., Ataoglu, N. and Sahin, F. (2006) Evaluation of the capacity of phosphate solubilizing bacteria and fungi on different forms of Phosphorus in liquid culture. Sustainable Agriculture 28: 99-108.
- Valliyodan, B. and Nguyen, H.T. (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. Current Opinion in Plant Biology 9: 1-7.
- Velmurugan, M., Chezhiyan, N. and Jawaharlal, M. (2008) Influence of organic manures and inorganic fertilizers on cured rhizome yield and quality of turmeric (*Curcuma longa* L.) cv. BSR-2. International Journal of Agricultural Science 4: 142-145.
- Vivas, A., Marulanda, A., Ruiz-Lozano, J. M., Barea, J. M. and Azcon, R. (2003) Influence of a *Bacillus* sp. On physiological activities of two *arbuscular mycorrhizal* fungi and plant responses two PEG induced drought stress. Mycorrhizae 13: 249-256.
- Yildirim, E. and Taylor, A. G. (2005) Effect of biological treatments on growth of bean plants under salt stress. Annual Rep. Bean Improve Coop 48: 176-177.
- Zarea, M. J., Hajinia, S., Karimi, N., Mohammadi Goltapeh, E., Rejali, F. and Varma, A. (2012) Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum strains* from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. Soil Biology and Biochemistry 45: 139-146.
- Zhu, J. K. (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. Plant Biology 4: 401-406.



## Effects of drought stress and bio-fertilizers on some growth, photosynthetic pigments, morphophysiological and biochemical traits of *Calendula officinalis*

Mahdi Sahib Hasan<sup>1</sup>, Yahya Selahvarzi<sup>1</sup> \*, Jafar Nabati<sup>2</sup> and Majid Azizi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticultural Science and Landscape Engineering, College of Agriculture, University of Ferdousi Mashhad

<sup>2</sup>Center of plant sciences, University of Ferdousi Mashhad

(Received: 18/10/2018, Accepted: 05/10/2019)

### Abstract

The use of plant symbiosis with mycorrhizal fungi and growth promoting bacteria is one of the ways to reduce drought stress that has recently been used in agriculture. A factorial experiment based on a completely randomized design with four replications was designed and conducted in winter and spring of 1396-1397 in research greenhouse of the Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad. Experimental treatments consisted of 2 levels of water regimes (100 and 50% Field Capacity as normal and drought stress conditions, respectively) and 8 levels of bio fertilizer (*Pseudomonas fluorescens* (Ps), *Azotobactore chroococcum* (Az), mycorrhiza fungi (M), Ps with M, Az with M, Ps with AZ, AZ in combination with Ps and M and the control (no bacteria and fungi). The results showed that drought stress in *Calendula* led to decrease in plant growth, leaf area, flower number, flower diameter, shoot and root dry weight, petal dry weight and stomata conduction significantly compared to the control treatment (100% FC), and also the amount of proline, total carbohydrate and chlorophyll content of the plant increased in drought stress. Application of growth stimulating bacteria in most traits led to improved traits measured in plant under stress and non-stress conditions. The highest leaf area was obtained by application of *Azotobactore chroococcum* (286.88 mm<sup>2</sup>). The highest flower dry weight was in *Pseudomonas fluorescens* treatment (4.22 g) under non-stress and after that without significant difference; in combination of mycorrhizal fungus and *Pseudomonas fluorescens* at non-stress (3.18 g) was recorded. As a result, the application of *Pseudomonas fluorescens* in soil alone or in combination with mycorrhizal fungi under drought stress conditions had the ability to improve plant growth and leading to increased plant efficiency under drought stress conditions.

**Keywords:** Carbohydrates, Flower diameter, Proline, Phenol, Total chlorophyll