

تغییرات عناصر غذایی و زیست‌توده همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) تحت تنش کمبود آب و منابع شیمیایی و زیستی فسفر

سجاد رحیمی، علیرضا پیرزاد^{*}، جلال جلیلیان و مهدی تاجبخش

گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۰۳/۰۵)

چکیده:

کودهای زیستی شامل موادی هستند جامد، مایع یا نیمه جامد که حاوی یک و یا چند گونه میکروارگانیسم بوده و باعث گسترش سیستم ریشه‌ای شده و موجب جذب بهتر آب و عناصر غذایی و در نتیجه رشد بیشتر گیاه می‌شود. به منظور بررسی اثر تنش کمبود آب و کود فسفره زیستی و شیمیایی بر تجمع عناصر غذایی در برگ و تولید زیست‌توده گیاهی همیشه بهار، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در سال ۱۳۹۳ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ارومیه اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل آبیاری (در ۰٪ و ۸۰٪ ظرفیت زراعی) و نوع کود فسفره (شاهد، سوپر فسفات تریپل به میزان ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار، باکتری‌های حل کننده فسفات و گونه‌های قارچ میکوریزا از جنس گلوموس (*Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. hoi*) بودند. نتایج نشان داد که در شرایط تنش کمبود آب میزان فسفر برگ به صورت معنی‌داری در مقایسه با شرایط طبیعی کاهش یافت، همچنین تأثیر نوع کود بر درصد کلینیزاسیون ریشه، و اثر متقابل بین آبیاری و کود بر میزان پروتئین برگ و عملکرد زیستی معنی‌دار بود. بیشترین افزایش کلینیزاسیون ریشه همیشه بهار نسبت به شاهد در گیاهان تیمار شده با گونه *G. hoi* مشاهده گردید. بهطور کلی در شرایط تنش کمبود آب، تولید زیست‌توده کاهش یافت که می‌تواند ناشی از کاهش دسترسی ریشه گیاه به عناصر غذایی در این شرایط باشد. اما عملکرد پروتئین برگ در شرایط تنش کمبود آب نسبت به شرایط طبیعی بیشتر بود.

کلمات کلیدی: باکتری حل کننده فسفر، سوپر فسفات تریپل، کلینیزاسیون، میکوریزا

مقدمه:

شریعت، ۱۳۸۳). همچنین این گیاه حاوی تریترپن‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، کارتنوئیدها، روتین، فارادیول، کالندیک اسید، فنولیک اسیدها، کافئیک اسید و کلروژنیک اسید می‌باشد (Re et al., 2009). خشکی رشد گیاهان، توسعه و عملکرد آنها را در سرتاسر جهان محدود می‌سازد (Pei et al., 2013). به طوری که در اثر خشکی میانگین تولید گیاهی بیش از ۵۰ درصد کاهش می‌یابد

همیشه بهار (*Calendula officinalis* L.) گیاهی علفی و یکساله است که متعلق به تیره Asteraceae بوده و منشأ این گیاه ناحیه مدیترانه می‌باشد. همیشه بهار حاوی مقادیر کم اسانس، روغن، ساپونین، رزین‌ها، مواد تلخ، اسیدهای آلی، کالندولین، صمغ، آلبومین، سالیسلیک اسید، لوریک اسید، پالمیتیک اسید، کلسترول و اینزولین در ریشه می‌باشد (صمصام

^{*}تویینده مسؤول، نشانی پست الکترونیکی: a.pirzad@urmia.ac.ir

همزیستی موجب بهبود رشد گیاه از طریق افزایش جذب مواد غذایی، تحریک سنتز مواد تنظیم کننده رشد داخلی و افزایش راندمان فتوسنتزی می‌شود (Rekha *et al.*, 2009). علت افزایش عملکرد محصول در گیاهان تلخیق شده با میکوریزا تعادل آبی آنها در شرایط تنفس خشکی و در نتیجه جذب بیشتر آب و عناصر غذایی معدنی می‌باشد (حبيب‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱). برای همزیستی سودمند میکوریزا، سطح فسفر خاک کمتر از ۵۰ ppm توصیه می‌شود و قارچ‌های میکوریزا زمانی که میزان $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ در یک کیلوگرم خاک یک گرم یا بیشتر باشد، از بین می‌روند (Mosse, 1973). نتایج تحقیقات Norris و همکاران (۱۹۹۴) نشان می‌دهد که همزیستی و آводگی میکوریزایی ریشه‌ها در سطوح بالاتر از این مقدار کاهش یافته و تلخیق گیاهان در این شرایط کمکی به گیاه نخواهد کرد. همزیستی با قارچ‌های میکوریزا میزان رشد، تولید زیست‌توده و جذب عناصر غذایی در گندم (AL-Karaki *et al.*, 2004) زیست‌توده در نعناع (باقری و همکاران، ۱۳۹۲) و میزان فتوسنتز در فلفل (Demir, 2004) را نسبت به گیاهان شاهد بهبود می‌بخشد. افزایش میزان فتوسنتز در گیاهان میکوریزایی به علت بهبود جذب فسفر و افزایش محتوای کلروفیل می‌باشد (Demir, 2004).

با توجه به تأثیر فسفر در رشد و توسعه گیاهان، همچنین محدودیت و مخاطرات منابع فسفر شیمیایی، بررسی تأثیر منابع فسفر شیمیایی و زیستی بر میزان تجمع برخی عناصر غذایی و تولید پروتئین برگ‌های گیاه دارویی همیشه بهار، در سطوح مختلف تأمین آب (تنفس و بدون تنفس) ضروری بوده و از اهداف اصلی این تحقیق می‌باشد.

مواد و روش‌ها:

این مطالعه در سال ۱۳۹۳ در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه (۴۵/۰۸ درجه شرقی، ۳۷/۵۳ درجه شمالی و ارتفاع ۱۳۲۰ متر بالاتر از سطح دریا) بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوك‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. ویژگی‌های خاک محل آزمایش در جدول ۱

(Wang *et al.*, 2003) بهار نشان می‌دهد که افزایش فاصله آبیاری عملکرد زیست‌توده این گیاه را کاهش می‌دهد (Shokrani *et al.*, 2012). همچنین با افزایش شدت تنفس خشکی، عملکرد گل و اسانس همیشه بهار نیز کاهش یافت، ولی درصد روغن افزایش نشان داد (Azimi *et al.*, 2012). در یک مطالعه دیگر (Shubhra *et al.*, 2004) درصد عملکرد (دانه و روغن) و اجزای تشکیل دهنده عملکرد در شرایط تنفس خشکی به شدت کاهش یافت، در حالی که درصد روغن افزایش داشت. سازگاری گیاهان به شرایط محیطی متفاوت مثل خشکی از طریق جذب یون‌های معدنی (مانند افزایش میزان پتاسیم در اندام‌های هوایی) و یا از طریق سنتز زیاد مواد حل شونده سازگار که به عنوان اسمولیت عمل می‌کنند، صورت می‌گیرد.

گیاهان مقادیر کمی از کودهای شیمیایی فسفره در دسترس خودشان را استفاده می‌کنند و بقیه آن در خاک به سرعت به ترکیبات نامحلول تبدیل می‌شود (Vassilev and Vassileva, 2003). این امر موجب می‌شود به طور مکرر از کودهای شیمیایی فسفره استفاده گردد، اما استفاده مرتب از آنها پرهزینه بوده و از طرفی برای محیط زیست نامطلوب می‌باشد (Reddy *et al.*, 2002). میکروارگانیسم‌هایی که کلات‌های با حلالیت پایین را حل می‌کنند، فسفات غیر محلول را به فرم آلی آن تبدیل می‌کنند. کودهای فسفاته زیستی حاوی گونه‌های باکتریایی از جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* می‌باشد که با استفاده از ترشح اسیدهای آلی و آنزیم فسفاتاز، فسفر نامحلول خاک را به شکل قابل جذب برای گیاهان در می‌آورند (Rodriguez *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2005).

قارچ‌های میکوریزایی یکی از مهمترین میکروارگانیسم‌های محیط ریشه محسوب می‌شوند که از طریق ایجاد همزیستی با ریشه گیاهان نقش کلیدی را در پایداری ریزوفسفر در زیست بوم‌های زراعی بازی می‌کنند. در اثر همزیستی بین قارچ و ریشه گیاهان با تأمین قندهای فتوسنتزی تولید شده توسط گیاهان به عنوان منبع کربن آلی، قارچ به حیات خود ادامه داده، بقاء و تکثیر آن تضمین می‌گردد. در مقابل، این رابطه

رس سیلت شن اشباع	(dS/m)	مواد خنثی شونده (%)	کربن آلی pH	فسفر قابل اسیدیته	هدايت الکتریکی در صد جذب	پتاسمی قابل جذب	جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه تا عمق ۳۰ سانتی‌متر
۳۲	۰/۹۱۵	۸/۵۱	۱۰/۳	۰/۷۸	۳۷/۶	۱۶۶	۴۴ ۳۲ ۲۴

برای اندازه‌گیری عناصر غذایی برگ، ۵ بوته از هر کرت در مرحله گلدهی کامل بوته‌ها به طور تصادفی انتخاب و برگ‌های آن‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۲ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. برای اندازه‌گیری نیتروژن، یک گرم از برگ همیشه بهار آسیاب شده را با ۵ گرم کاتالیزور (سولفات مس، سولفات پتاسمیم و اکسید مس) مخلوط، و روی آن ۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در دستگاه کجلدا (مدل v40، Hanon شرکت) در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از خروج نمونه‌ها از دستگاه روی هر کدام ۲۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه نموده و سپس با اسید سولفوریک تیترازول تیتر شدند. مقدار اسید مصرف شده در تیتراسیون در فرمول زیر قرار داده شده و میزان نیتروژن مشخص گردید (du Preez and Bale, 1989).

$$\text{نیتروژن} = \frac{\text{وزن نمونه}}{۱۰۰} \times ۰/۰۰۱۴ \times \text{مقدار اسید مصرف شده در}$$

تیتراسیون) = درصد نیتروژن

درصد پروتئین از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{نیتروژن} = \frac{۶/۲۵}{\text{میزان درصد نیتروژن}} \times ۱۰۰$$

و عملکرد پروتئین از طریق رابطه زیر به دست آمد:

= عملکرد پروتئین برگ

عملکرد زیست‌توده برگ × درصد پروتئین برگ

یک گرم از ماده گیاهی پس از هضم به روش سوزاندن خشک

(سوزاندن با HCl)، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ nm

به روش رنگ سنجی وانادات (آمونیوم هپتامولیدات

به اضافه آمونیوم وانادات) برای اندازه‌گیری فسفر برگ، و از

دستگاه فلیم فتوومتر (مدل pfp7 Clinical) به روش نشر

شعله‌ای برای اندازه‌گیری پتاسمیم استفاده شد (Allen, 1989).

برای اندازه‌گیری عملکرد زیستی و زیست‌توده برگ همیشه

بهار، در اواخر دوره رشد، یک متر مربع از هر کرت به طور

آورده شده است.

پس از آماده‌سازی زمین، در اوایل اردیبهشت ماه کرت‌های آزمایشی به اندازه ۲×۲ متر ایجاد گردید. بذرهای همیشه بهار در ردیف‌هایی به فاصله ۳۰ سانتی‌متر، فاصله بوته‌ها روی ردیف ۶ و عمق کاشت ۴-۳ سانتی‌متر در ۱۹ و ۲۰ اردیبهشت ماه کشت شدند. تیمارهای آزمایشی شامل آبیاری (آبیاری در ۵۰٪ و ۸۰٪ طرفیت زراعی) و سیستم کوددهی (شاهد، سوپر فسفات تریپل به میزان ۱۰۰ kg/ha، باکتری‌های حل کننده فسفات و گونه‌های *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. hoi*) قارچ میکوریزا (شاهد، سوپر فسفات تریپل بودند. طرفیت زراعی خاک مزرعه ۲۵ درصد بود. آبیاری در ۵۰ و ۸۰ درصد طرفیت زراعی صورت پذیرفت و مقدار آب آبیاری از طریق معادله زیر محاسبه گردید (علیزاده، ۱۳۸۸).

مساحت زمین × عمق توسعه ریشه × وزن مخصوص ظاهری (FC-PWP) = مقدار آب آبیاری PWP که FC درصد رطوبت خاک در حد طرفیت زراعی و نقطه پژمردگی دائمی گیاه می‌باشد.

بذرهای همیشه بهار از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. مایه‌های تلقیح گونه‌های قارچ میکوریزا از دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه گردید. کود زیستی فسفات بارور-۲ (باکتری‌های حل کننده فسفات) به مقدار ۱۰۰ گرم در هکتار (براساس توصیه شرکت تولید کننده آن، زیست فناور سبز) به شکل بذرمال، در سایه و به دور از نور خورشید اعمال شد. قارچ‌های میکوریزا به مقدار ۱۰۰ گرم در مترمربع در داخل شیارهای ایجاد شده ریخته شده و سپس بذر از هر گونه تهیه کاشته شدند. کنترل علف‌های هرز، جهت جلوگیری از رقابت آن‌ها با همیشه بهار و ممانعت از هر گونه تداخل علف کشها با تیمارهای آزمایشی، به صورت دستی و مداوم در طول فصل رشد انجام گرفت.

کمبود آب برای کلیه تیمارهای کود فسفره بیشتر از آبیاری طبیعی بود. بیشترین مقدار نیتروژن (۰/۶۳ درصد) برگ در گیاهان تلقیح شده با *G. intraradices* و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی مشاهده شد. در حالی که کمترین درصد نیتروژن (۰/۲ درصد) برگ در ظرفیت زراعی ۸۰٪ و تیمار فسفر شیمیایی به دست آمد (شکل ۱). گیاهان میکوریزایی در تجمع نیتروژن برگی نسبت به سایر تیمارها در آبیاری ۵۰٪ ظرفیت زراعی برتری داشتند. در شرایط آبیاری طبیعی (آبیاری در ۸۰٪ ظرفیت زراعی)، میزان نیتروژن برگی در گیاهان تلقیح شده با گونه *G. hoi* بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱). بنابراین، اهمیت نوع گونه قارچی در مقاومت به تنفس کمبود آب قابل توجه می‌باشد. به طوری که در شرایط کم‌آبی گونه *G. intraradices* و در شرایط آبیاری مطلوب گونه *G. hoi* در تجمع نیتروژن برتری داشتند. بیشترین عملکرد پروتئین (۱۷/۱۶۹ کیلوگرم در هکتار) در گیاهان میکوریزایی تیمار شده با *G. mosseae* که در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی آبیاری شدند، به دست آمد که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با عملکرد پروتئین حاصل از گیاهان میکوریزایی با دو گونه دیگر نداشت. کمترین عملکرد پروتئین (۵۲/۵۶ کیلوگرم در هکتار) در گیاهان شاهد (غیرمیکوریزایی) و آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی بدست آمدند. عملکرد پروتئین گیاهان آبیاری شده در ۸۰٪ ظرفیت زراعی کمتر از عملکرد پروتئین حاصل از آبیاری در ۵۰٪ ظرفیت زراعی بود. با این حال، عملکرد پروتئین در کلیه سطوح کودی در شرایط آبیاری طبیعی (آبیاری در ۸۰٪ ظرفیت زراعی) تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان نداد. به طور کلی، عملکرد پروتئین در گیاهان میکوریزایی بیشتر از سایر تیمارهای منابع کود فسفره بود (شکل ۲).

فسفر برگ: غلظت فسفر برگ در گیاهان آبیاری شده در ۸۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی به ترتیب ۰/۳۱ و ۰/۳۳ درصد بود که نشان دهنده تفاوت ۲ درصدی برای این تیمارهای آبیاری در فسفر برگ می‌باشد (شکل ۳).

عملکرد زیستی: عملکرد زیستی (زیست‌توده کل) در آبیاری طبیعی (آبیاری در ۸۰٪ ظرفیت زراعی) بیشتر از

کامل برداشت شدند. نمونه‌های برداشت شده به تفکیک (ساقه، برگ و کاپیتول) به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۲ درجه سانتی‌گراد خشکانیده و توزین شدند.

برای سنجش درصد کلینیزاسیون ریشه، ابتدا قطعات ریشه به طول یک سانتی‌متر در محلول فرمالین استیک اسید قرار داده شدند، و بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌ها با آب مقطر شسته و در KOH ۱۰٪ به مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه در آون قرار داده شدند. سپس ریشه‌ها به مدت سه دقیقه در اسید کلریدریک ۱٪ قرار داده شدند. نمونه‌ها با تریان بلو ۰/۵ رنگ آمیزی شده و به مدت ۱/۵ ساعت در آون ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از آن نمونه‌ها به وسیله لاکتوگلیسرول رنگ زدایی شدند، و در زیر میکروسکوپ (مجهر به صفحه مدرج) مورد بررسی قرار گرفتند. درصد کلینیزاسیون از نسبت تعداد نقاط رنگی از کل نقاط مورد بررسی به دست آمد (Phillips and Hayman, 1970; Giovannetti and Mosse, 1980).

$$\frac{\text{تعداد نقاط آبی}}{\text{تعداد کل برخوردها}} \times 100 = \text{درصد کلینیزاسیون}$$

تجزیه واریانس داده‌های حاصل بر اساس امید ریاضی طرح پایه و توسط نرم افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن (Duncan's Multiple Range test) توسط نرم افزار MSTATC انجام شد.

نتایج:

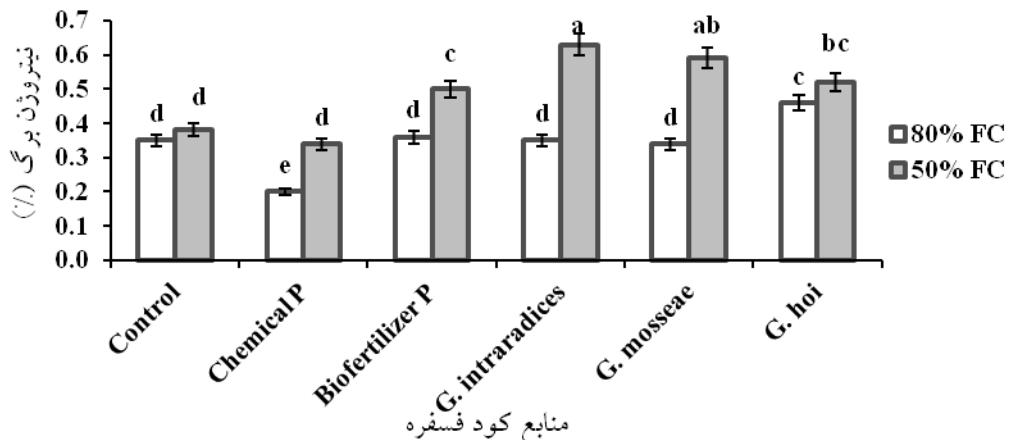
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل بین آبیاری و نوع کود فسفره بر درصد نیتروژن، درصد پروتئین، عملکرد پروتئین، عملکرد زیستی و زیست‌توده برگ همیشه بهار در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. درحالی که تأثیر آبیاری بر میزان فسفر برگ معنی‌دار، ولی اثر آن بر میزان پتاسیم برگ همیشه بهار غیرمعنی‌دار بود. همچنین تأثیر نوع کود فسفره بر درصد کلینیزاسیون معنی‌دار، اما بر میزان فسفر برگ و پتاسیم برگ غیرمعنی‌دار شد. همچنین تأثیر آبیاری بر درصد کلینیزاسیون در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

نیتروژن برگ: درصد نیتروژن و پروتئین برگ در شرایط

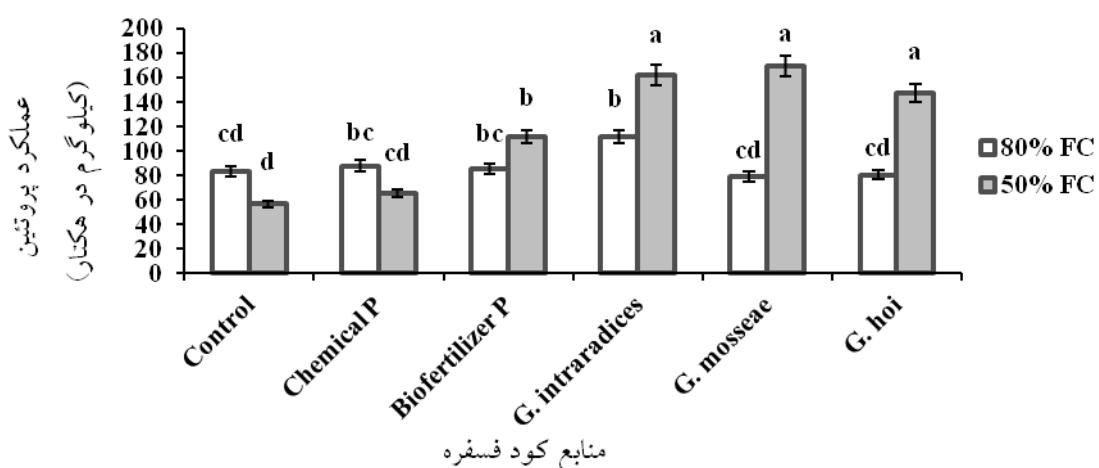
جدول ۲- نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی گیاه دارویی همیشه بهار تحت تأثیر منابع مختلف کود فسفره و آبیاری

میانگین مربعتات										منابع تغییر	درجه آزادی	درصد نیتروژن برگ	فرسخ برگ	پتانسیم برگ	عملکرد پروتئین	عملکرد زیستی	برگ زیست	درصد برق	آبیاری
درصد کلوزیازیون	زیست‌توده برگ	عملکرد زیستی	عملکرد پروتئین	پتانسیم برگ	فسفر برگ	درصد نیتروژن برگ	درصد	درصد	منابع تغییر	درجه آزادی	آبیاری								
۷۱/۱۴	۲۰۷۴۳	۱۰۱۵۷۸/۶۲	۴۲۵/۷۰۸	۰/۶۴۳*	۰/۳۱۵	۰/۰۰۴	۲												
۱۹۱/۲۶*	۴۱۳۰۷۷۷**	۴۷۴۳۲۳۵۰ **	۸۴۸۸/۲۴۴ **	۰/۴۴۹	۰/۴۸۱*	۰/۲۰۷**	۱				(A)								
۴۹۳/۳۷**	۲۸۹۲۱۸۹**	۳۹۸۳۰۶۳**	۴۲۱/۶۳**	۰/۲۴۱	۰/۱۰۹	۰/۴۴**	۵				(B)								
۲۸/۴	۵۴۷۴۹۹۹**	۲۲۷۰۰۴۱**	۳۴۱۰/۱۱۰**	۰/۰۲۰	۰/۰۷۹	۰/۰۱۵**	۵				A × B								
۳۲/۰۶	۱۷۴۰۶۵	۴۴۴۳۸۰	۲۱۹/۶۱۰	۰/۱۵۶	۰/۱۱۸	۰/۰۰۲	۲۲				اشتباه آزمایشی								
۱۳/۱۰	۱۰/۳۸	۵/۰۵	۱۴/۳۳	۶/۳۰	۱۰/۷۱	۱۰/۶۲			ضریب تغییرات (%)										

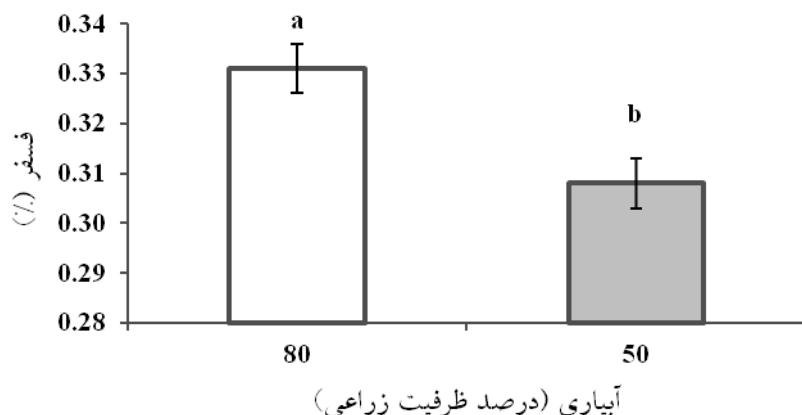
* معنی دار در سطح احتمال ۱٪ ، ** معنی دار در سطح احتمال ۵٪



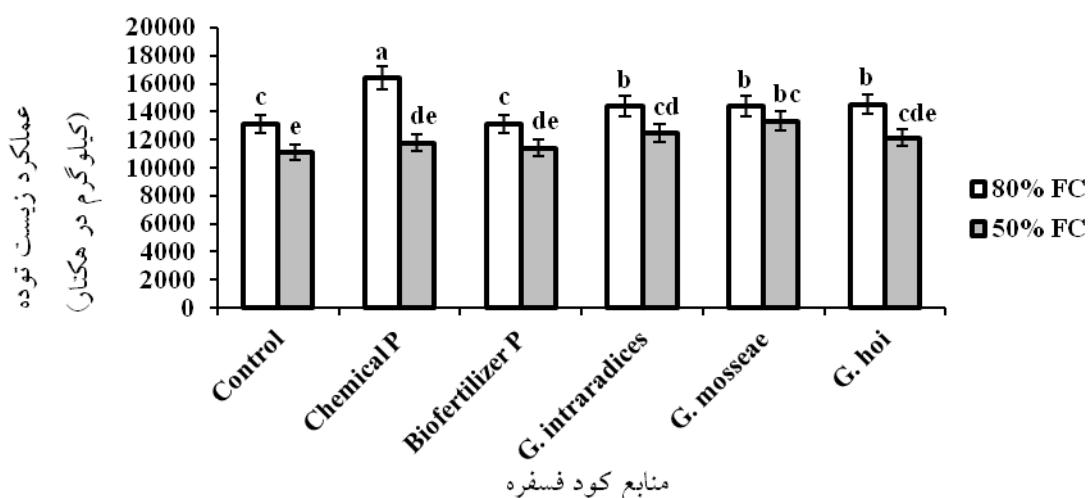
شکل ۱- مقایسه میانگین درصد نیتروژن برگ همیشه بهار تحت تأثیر آبیاری و نوع کود فسفره با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیر مشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباہ استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.



شکل ۲- مقایسه میانگین عملکرد پروتئین برگ همیشه بهار تحت تأثیر آبیاری و نوع کود فسفره با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیر مشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباہ استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.



شکل ۳- مقایسه میانگین میزان فسفر برگ همیشه بهار تحت تأثیر آبیاری با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیر مشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباہ استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.



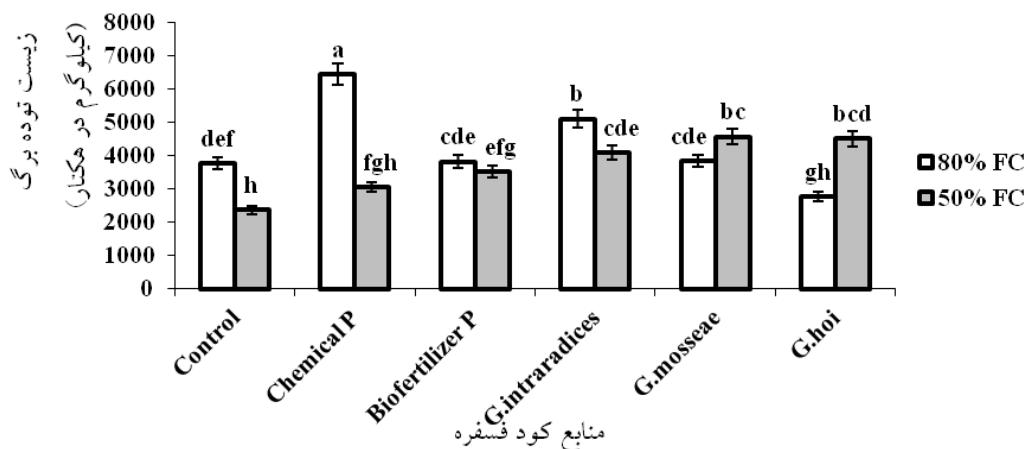
شکل ۴- مقایسه میانگین عملکرد زیستی همیشه بهار تحت تأثیر آبیاری و نوع کود فسفره با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیر مشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباہ استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.

کمبود آب و شاهد کمترین مقدار (۲۳۶۲/۱۵ کیلوگرم در هکتار) را داشت. از طرفی گیاهان تلقیح شده با گونه های قارچ در شرایط تنفس کمبود آب زیست توده برگ بیشتری از سایر تیمارها در همین شرایط تنفس داشتند (شکل ۵).

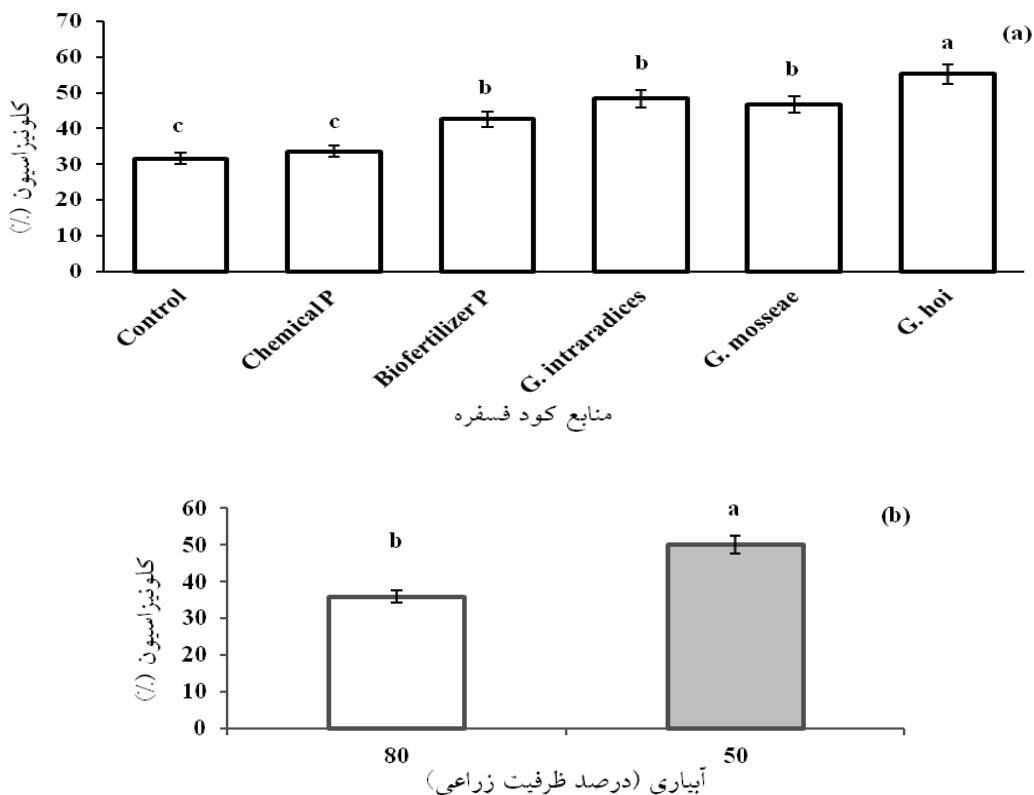
در صد کلینیزاسیون ریشه: با اینکه در صد کلینیزاسیون ریشه در گیاهان تیمار شده با گونه های قارچ *G. mosseae* و *G. intraradices* بیشتر از شاهد بود، ولی بالاترین میزان آن (۵۵/۲۹ درصد) در گیاهان تیمار شده با *G. hoi* مشاهده شد. کمترین در صد کلینیزاسیون در تیمار شاهد (۳۱/۵۹ درصد) مشاهده گردید که تفاوت معنی داری با کود شیمیایی فسفره

زیست توده تولید شده در شرایط کمبود آب بود. بالاترین مقدار عملکرد زیست توده (۱۶۴۰۲/۷۵ کیلوگرم در هکتار) در گیاهان تیمار شده با سوپر فسفات تریپل و آبیاری در ۸۰٪ ظرفیت زراعی مشاهده شد. در حالی که کمترین عملکرد زیست توده (۱۱۰۸۳/۴۴ کیلوگرم در هکتار) در ظرفیت زراعی ۵۰٪ و شاهد به دست آمد. همچنین عملکرد زیست توده در گیاهان تلقیح شده با گونه های قارچ بیشتر از تیمار فسفات بارور ۲ بود (شکل ۴).

زیست توده برگ: بیشترین زیست توده برگ (۶۸۴۳/۲۳ گیلوگرم در هکتار) در شرایط آبیاری طبیعی و تیمار فسفر شیمیایی مشاهده گردید. ولی زیست توده برگ در شرایط تنفس



شکل ۵- مقایسه میانگین زیست‌توده برگ همیشه بهار تحت تأثیر آبیاری و نوع کود فسفره با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیر مشابه پیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. اشتباه استانداردها دقت اندازه‌گیری میانگین‌ها را نشان می‌دهند.



شکل ۶- مقایسه میانگین درصد کلینیزاسیون ریشه همیشه بهار تحت تأثیر نوع کود فسفره (a) و آبیاری (b) با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیر مشابه پیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد. اشتباه استانداردها دقت اندازه‌گیری میانگین‌ها را نشان می‌دهند.

به ترتیب ۱۹، ۱۷ و ۸ درصد بیشتر از تیمارهای شاهد، فسفر شیمیایی و فسفات بارور-۲ بود (شکل ۶-a). همچنین درصد کلینیزاسیون در شرایط تنفس کمبود آب (۵۰/۱۰ درصد) بیشتر از آبیاری طبیعی (۳۵/۹۳ درصد) بود (شکل ۶-b).

نداشت. کود زیستی فسفات بارور-۲ درصد کلینیزاسیون ریشه همیشه بهار را همانند گونه‌های قارچ *G. mosseae* و *G. intraradices* نسبت به شاهد و تیمار کود شیمیایی افزایش داد. درصد کلینیزاسیون در گیاهان تیمار شده با گونه‌های قارچ

بحث:

که زارعی و همکاران (۱۳۹۳) در آزمایش خود روی گیاه همیشه بهار بیان نمودند که مایه‌زنی با قارچ میکوریزا آرسکولار سبب افزایش معنی‌دار نیتروژن، فسفر و پتاسیم نسبت به شاهد گردید. همچنین نشان داده شده است که میزان عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم در برگ‌های ذرت تحت تنش Zhao *et al.*, 2015 خشکی با تلقیح قارچ میکوریزا بهبود یافته است (2015). اثرات مثبت قارچ‌های میکوریز در تحرک بخشی به فسفر و جذب آن با مکانیسم‌های توسعه سطح ریشه، افزایش هدایت هیدرولیکی آب و تسهیل انتقال توده‌ای فسفر، افزایش تعرق در پتانسیل بالای آب در خاک و کمک به انتشار فسفر، ترشح ترکیبات آلی تعديل کننده pH و افزایش فعالیت آنزیم پلی‌فسفات کیناز امکان‌پذیر می‌گردد (David *et al.*, 2007). از طرفی باکتری‌های حل کننده فسفر از طریق مکانیسم‌هایی آن را از حالت تثبیت شده به فرم قابل استفاده برای گیاه تبدیل می‌کنند (Rodriguez *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2005). به نظر می‌رسد در تحقیق حاضر، علت عدم تأثیر فسفر (شیمیایی و زیستی) بر میزان فسفر برگ، بالا بودن فسفر قابل جذب در خاک می‌باشد (جدول ۱).

در تحقیق حاضر میزان پتاسیم برگ تحت تأثیر آبیاری و منابع کود فسفره قرار نگرفت (جدول ۲). انتقال مواد محلول از غشای تمامی سلول‌ها و همچنین جذب یون‌ها توسط ریشه گیاهان، دارای دو ویژگی یعنی تجمع و انتخابی بودن می‌باشد. از طرفی غلظت درونی یون پتاسیم چندین برابر غلظت آن در بیرون سلول‌های گیاهی می‌باشد. نسبت تجمع برای یون‌های پتاسیم و نیترات خیلی بزرگتر از یون‌های سولفات و سدیم می‌باشد (Hopkins and Huner, 2008). به نظر می‌رسد به خاطر بالا بودن غلظت درونی این عنصر، میزان انباشت آن تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده قرار نگرفته است. Saglam و همکاران (۲۰۱۰) در مطالعات خود روی تغییرات یون‌های آپوپلاستی و سیمپلاستی *Ctenanthe setosa* گزارش کردند که تحت تنش خشکی غلظت یون پتاسیم آپوپلاست و سیمپلاست کاهش می‌باشد. نتایج رضوانی و همکاران (۱۳۸۸) نشان داد که میکوریزا تأثیری روی جذب پتاسیم به وسیله گیاه یونجه نداشت.

در تحقیق حاضر درصد نیتروژن در شرایط تنش کمبود آب بیشتر از شرایط طبیعی بود (شکل ۱)، طوری که با وجود عملکرد پایین زیست‌توده (شکل ۴)، منجر به افزایش عملکرد پروتئین (شکل ۲) در واحد سطح نیز (غیر از تیمارهای فسفر شیمیایی و شاهد که عملکرد زیست‌توده در کمبود آب بسیار کمتر از آبیاری طبیعی بود) شده است. کمبود آب منجر به تولید پروتئین‌های LEA (Late Embryogenesis Abundant) می‌شود که در افزایش مقاومت گیاه به تنش نقش دارند (Wise and Tunnacliffe, 2004). تنش کم‌آبی سبب هیدرولیز Cornoy *et al.*, 1988 پروتئین‌های تیلاکوئیدی می‌شود (and). همچنین گزارش شده است که تجزیه پروتئین‌های کلروپلاستی منبع با ارزشی برای اشکال قابل تحرک نیتروژن به محض ورود به شرایط تنش می‌باشد (Martin and Torres, 1992). در طی خشکی فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در اندام هوایی بیش از ریشه کاهش می‌یابد که این امر به کاهش جریان نیترات از ریشه به اندام هوایی نسبت داده شده است (Silva *et al.*, 2004). در زمان کم‌آبی نیترات به مقدار زیاد تجمع می‌یابد که می‌تواند به عنوان منبع نیتروژن برای سنتز اسیدهای آمینه آزاد مورد استفاده قرار گیرد (Heuer *et al.*, 1979). نتایج حاضر با یافته‌های Ghorbanli و همکاران (۲۰۱۳) که گزارش کردند در شرایط تنش ملایم و شدید خشکی مقدار پروتئین برگ‌ها افزایش می‌یابد، مطابقت داشت. همچنین اسمعیل‌نژادخیاوی و خارا (۱۳۹۳) گزارش کردند که پروتئین کل اندام هوایی کدوی خورشی در گیاهان میکوریزایی نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی داشت.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین‌ها، میزان تجمع فسفر در برگ تحت تأثیر تیمارهای کودی قرار نگرفت (جدول ۲)، ولی فسفر برگ در شرایط تنش کمبود آب کاهش یافت (شکل ۳). فسفر موجود در خاک بیشتر به فرم تثبیت شده، و برای گیاهان غیر قابل استفاده می‌باشد که این حالت در شرایط تنش کمبود آب شدیدتر می‌باشد. با افزایش میزان آب آبیاری تحرک این عنصر بیشتر شده و در دسترس گیاهان قرار می‌گیرد. در حالی

باکتری‌های حل کننده فسفر می‌تواند این تلقیح را تقویت نماید. بالا بودن عملکرد زیست‌توده (زیست‌توده کل و زیست‌توده برگ) در شرایط طبیعی آبیاری و بدون تنفس می‌تواند ناشی از تحرک و در دسترس بودن عناصر غذایی از جمله فسفر باشد که در شرایط کمبود آب این عنصر ثبیت شده و برای گیاه غیرقابل استفاده می‌شود. گیاهان همزیست با سویه مناسب میکوریزا آب و مواد غذایی (به ویژه فسفر) بیشتری جذب می‌کنند، در نتیجه فعالیت فتوستزی گیاه، ثبیت CO_2 و سطح برگ تولیدی گیاه افزایش می‌یابد (رضوانی و همکاران، ۱۳۸۸).

نتیجه‌گیری کلی:

به طور کلی تجمع نیتروژن در اندام‌های هوایی گیاه همیشه بهار در شرایط تنفس کمبود آب (آبیاری در ۵۰ درصد ظرفیت زراعی) و در تیمارهای کود زیستی بیشتر از شرایط آبیاری طبیعی (آبیاری در ۸۰ درصد ظرفیت زراعی) بود. به دلیل دسترسی آسان و بدون هزینه کربوهیدراتی به فسفر برای گیاه، بیشترین تولید زیستی (زیست‌توده اندام‌های هوایی و زیست‌توده برگ) در گیاهان تیمار شده با کود سوپر فسفات تریپل به دست آمد. عملکرد زیستی گیاهان آبیاری شده در آبیاری طبیعی ۷ درصد بیشتر بود. درصد کلونیزاسیون ریشه در گیاهان تیمار شده با قارچ‌های میکوریزا نسبت به منابع کودی فسفره و شاهد بیشتر بود.

در این تحقیق درصد کلونیزاسیون ریشه تحت تأثیر سطوح آبیاری (شرایط طبیعی و تنفس) و نوع کود فسفره قرار داشت (جدول ۲). به طوری که میزان کلونیزاسیون ریشه همیشه بهار با گونه *G. hoi* بیشتر از *G. intraradices* و *G. mosseae* بود. هرچند میزان کلونیزاسیون در هر سه گونه بالاتر از تیمارهای شاهد و فسفر شیمیایی می‌باشد. باکتری‌های حل کننده فسفات هم درصد قابل قبولی از کلونیزاسیون را نشان دادند (شکل ۶). نتایج متفاوت در درصد کلونیزاسیون ممکن است به خاطر سازگاری قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار به بسترها مختلف و رفتارهای متفاوت گیاهان تحت تنفس خشکی باشد (Birhane *et al.*, 2013) (Gholamhoseini *et al.*, 2013) (Zhao و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که با افزایش شدت خشکی میزان کلونیزاسیون ریشه افزایش می‌یابد، ولی در مقابل El-Mesbahi و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که تنفس خشکی میزان کلونیزاسیون را کاهش می‌دهد. در صورتی که میزان فسفر خاک بالا باشد، آلدگی ریشه گیاه به میکوریز کاهش می‌یابد (Norris *et al.*, 1994). تیمار کودی سوپر فسفات تریپل با افزایش میزان فسفر خاک سبب کاهش کلونیزاسیون تا حد شاهد شده است. در مطالعات قبلی اثرات هم افزایی باکتری‌های حل کننده فسفر بر فعالیت و کلونیزاسیون گونه‌های قارچی گزارش شده است (Javadi Esfahani *et al.*, 2009). همچنین کلونیزاسیون بالای ۳۰ درصدی در تیمار شاهد می‌تواند بدلیل حضور گونه‌های مختلف قارچی در خاک مزرعه باشد، و تلقیح با قارچ موقع کاشت و همچنین اضافه کردن

منابع:

- اسماعیل‌نژاد خیاوی، ن. و خارا، ج. (۱۳۹۳) تأثیر قارچ میکوریز آربوسکولار *Glomus etunicatum* بر روی رشد و برخی پارامترهای فیزیولوژیک در گیاه کدوی خورشتی تحت سمیت علفکش متری بوزین. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۲۷: ۵۲-۶۰.
- باقری، س.، شبانی، ل.، احمدی خوبی، م.، حیدرزاده، پ. و ابراهیمیم. ع. (۱۳۹۲) تأثیر دو گونه میکوریز بر رشد و جذب مواد غذایی در ژنوتیپ‌های مختلف نعناع سبز. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۴: ۲۴-۱۳.
- حبيب‌زاده، زردهشتی، م. ر.، پیرزاد، ع. و جلیلیان، ج. (۱۳۹۱) اثر قارچ ریشه‌های آربوسکولار بر شاخص‌های رشد و عملکرد دانه ماش تحت تنفس کم آبی (Vigna radiata (L.) Wilczek). مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک ۶۰: ۶۹-۶۰.

- رضوانی، م.، اردکانی، م. ر.، رجالی، ف.، نورمحمدی، ق.، زعفریان، ف. و تیموریان، س. (۱۳۸۸) تأثیر سویه‌های مختلف قارچهای میکوریزا روی ویژگی‌های ریشه و غلظت فسفر، پتاسیم، روی و آهن یونجه (*Medicago sativa L.*). مجله دانش نوین کشاورزی ۱۵: ۶۶-۵۵.
- زارعی، م.، مرینخی، م. و سحرخیز، م. ج. (۱۳۹۳) اثر قارچ میکوریزا آربوسکولار و تفاله شیرین بیان بر ویژگی‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis L.*). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۳۰(۳): ۴۰۱-۳۹۱.
- صمصام شریعت، س. (۱۳۸۳) مجموعه‌ای از گیاهان دارویی. انتشارات روزبهان، ۳۹۳ صفحه.
- علیزاده، ا. (۱۳۸۸) طراحی سیستم‌های آبیاری. جلد اول. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۴۴ صفحه.
- Allen, S. E. (1989) Chemical Analysis of Ecological Materials. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, London.
- AL-Karaki, G., McMichael, B. and Zak, J. (2004) Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. Mycorrhiza 14: 263-269.
- Azimi, J., Pirzad, A. and Hadi, H. (2012) Effect of drought stress on morphology and essential oil of pot marigold. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 2: 11-17.
- Birhane, E., Sterck, F. J., Bongers, F. J. and Kuyper, T. W. (2014) Arbuscular mycorrhizal impacts on competitive interactions between *Acacia etbaica* and *Boswellia papyrifera* seedlings under drought stress. Journal of Plant Ecology 7: 298-308.
- Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H. and Sa, T. (2005) Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biology and Biochemistry 37: 1970-1974.
- Cornoy, J. P., Virgon, J. M., Smillie, R. M. and Barlow, E. W. (1988) Influence of drought acclimation and CO₂ enrichment on osmotic adjustment and chlorophyll a fluorescence of sunflower during drought. Plant Physiology 186: 1108-1115.
- David, D., Gerald, N., Carolyn, R. and Paul, R. H. (2007) Inoculation with Arbuscular mycorrhizal fungi increases the yield of potatoes in a high P soil. Biological Agriculture and Horticulture 25: 67-78.
- Demir, S. (2004) Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological, growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology 28: 85-90.
- du Preez, D. R. and Bale, G. C. (1989) A simple method for the quantitative recovery of nitrate-N during the Kjeldahl analysis of dry soil and plant samples. Communications in Soil Science and Plant Analysis 20(3-4): 345-357.
- El-Mesbahi, M. N., Azcón, R., Ruiz-Lozano, J. M. and Aroca, R. (2012) Plant potassium content modifies the effects of arbuscular mycorrhizal symbiosis on root hydraulic properties in maize plants. Mycorrhiza 22: 555-564.
- Gholamhoseini, M., Ghalavand, A., Dolatabadian, A., Jamshidi, E. and Khodaei-Joghan, A. (2013) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on growth, yield, nutrient uptake and irrigation water productivity of sunflowers grown under drought stress. Agricultural Water Management 117: 106-114.
- Ghorbanli, M., Gaforabad, M., Amirkian, T. and Allahverdi Mamaghani, B. (2013) Investigation of proline, total protein, chlorophyll, ascorbate and dehydroascorbate changes under drought stress in Akria and Mobil tomato cultivars. Iranian Journal of Plant Physiology 3: 651-658.
- Giovannetti, M. and Mosse, B. (1980) An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84: 489-500.
- Heuer, B., Plaut, Z. and Federman, E. (1979) Nitrate and nitrite reductase in wheat leaves as affected by different types of water stress. Physiologia Plantarum 46: 318-323.
- Hopkins, W. G. and Huner, N. P. A. (2008) Introduction to Plant Physiology, 4th Edition, Wiley, 503 p.
- Javadi Esfahani, Y., Khavazi, K. and Ghorbani, S. 2009. Cross interaction of *Pseudomonas putida* and *Glomus intraradices* and its effect on wheat root colonization. Pakistan Journal of Biological Sciences 12(20): 1365-1370.
- Martin, B. and Torres, N. A. R. (1992) Effects of water deficits stress on photosynthesis, its components and component limitations and on water use efficiency in wheat. Plant Physiology 100: 733-739.
- Mosse, B. (1973) Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhizae. IV. In soil given additional phosphate. New Phytologist 72: 127-136.
- Norris, J. R., Read, D. J. and Varma, A. K. (1994) Techniques for Mycorrhizal Research Methods in Microbiology. Academic Press, London.
- Pei , F., Li, X., Liu, X. and Lao, C. (2013) Assessing the impacts of droughts on net primary productivity in China. Journal of Environmental Management 114: 362-371.

- Phillips, J. M. and Hayman, D. S. (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158-161.
- Re, T. A., Mooney, D., Antignac, E., Dufour, E., Bark, I., Srinivasan, V. and Nohynek, G. (2009) Application of the threshold of toxicological concern approach for the safety evaluation of calendula flower (*Calendula officinalis*) petals and extracts used in cosmetic and personal care products. *Food Chemistry and Toxicology* 47: 1246-1254.
- Reddy, M. S., Kumar, S., Babita, K. and Reddy, M. S. (2002) Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 84: 187-189.
- Rekha, B., Shruti, C., Rashmi, S., Sharma, A. K. and Johri, B. (2009) Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth and nutrient status of *Dalbergia sissoo*. *Tropical Ecology Journal* 50: 231-242.
- Rodriguez, H., Gonzalez, T., Goire, I. and Bashan, Y. (2004) Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften* 91: 552-555.
- Saglam, A., Terzi, R., Nar, H., Saruhan, N., Ayaz, F. A. and Kadioglu, A. (2010) Inorganic and organic solutes in apoplastic and symplastic spaces contribute to osmotic adjustment during leaf rolling in *Ctenanthe setosa*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 52: 37-44.
- Shokrani, F., Pirzad, A., Zardoshti, M. R. and Darvishzadeh, R. (2012) Effect of irrigation disruption and biological nitrogen on some physiological and morphological characters of leaf in *Calendula officinalis* L. *Journal of Medicinal Plants Research* 6: 79-87.
- Shubhra, K., Dayal, J., Goswami, C. L. and Munjal, R. (2004) Effects of water-deficit on oil of *Calendula* aerial parts. *Biologia Plantarum* 48: 445-448.
- Silva, J., Oson, J., Fonseca, F. and Correia, M. (2004) The effects of soil during and subsequent re-watering on the activity of nitrate reductase in root and leaves of *Helianthus annuus*. *Functional Plant Biology* 31: 611-621.
- Vassilev, N. and Vassileva, M. (2003) Biotechnological solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61: 435-440.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Wise, M. J. and Tunnacliffe, A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science* 9: 13-17.
- Zhao, R., Guo, W., Bi, N., Guo, J., Wang, L., Zhao, J. and Zhang, J. (2015) Arbuscular mycorrhizal fungi affect the growth, nutrient uptake and water status of maize (*Zea mays* L.) grown in two types of coal mine spoils under drought stress. *Applied Soil Ecology* 88: 41-49.

