

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

مهناز ظفری، علی عبادی*، قاسم پرمون و سدابه جهانبخش

^۱ گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۲۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۴/۰۲/۰۲)

چکیده:

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

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

مقدمه:

عنوان عدم وجود رطوبت کافی و ضروری برای یک گیاه به منظور رشد نرمال و کامل کردن چرخه زندگی تعریف شود (Manivannan et al., 2008). یکی از حساس‌ترین مراحل فیزیولوژیکی گیاه که نسبت به خشکی حساس است رشد و توسعه سلول می‌باشد، که علت آن کاهش فشار آماس است. تنش آبی توسعه سلولی و رشد گیاه را به علت فشار پایین

تنش‌های محیطی از فاکتورهای مهم کاهش محصولات کشاورزی در دنیا هستند. خشکی، دماهای بالا و پایین و شوری خاک به طور نامطلوبی جوانه‌زنی، رشد گیاه و در نهایت تولید محصول را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Van Den Berg and Zeng, 2006). کمبود آب، می‌تواند به

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

حاوی سولفور است. متیونین یک واسطه بیوسنتز سیستئین، کارنتئین، تورین، لستین، فسفولیپیدها بوده و به عنوان پیش‌ساز هورمون اتیلن و در تنظیم باز شدن روزنه‌های برگ موثر است، و از طرفی به عنوان باقی‌مانده پروتئین‌ها اکسید شده بوده که می‌تواند توسط رادیکال‌های فعال اکسیژن تولید شده در سیستم‌های زیستی تولید شود (Refsum *et al.*, 1998). همچنین لیزین در تنظیم باز شدن روزنه‌های برگ، در جوانه زنی دانه‌های گرده و در سنتز کلروفیل کاربرد دارد که می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاه به تنش ایفا کند (نجفی، ۱۳۹۲).

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

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

آماس متوقف می‌سازد (Makersie and Leshem, 1994). همچنین، کاهش جذب آب از راه ریشه‌ها، با کاهش تورژسانس سلول همراه بوده و موجب کاهش تقسیم سلولی و مهار رشد سلولی می‌شود (Yordanov *et al.*, 2000). کاهش میزان آب در محیط جذب، باعث اختلال در انتقال مواد غذایی و کاهش رشد را به دنبال دارد. کاهش آب سبب لوله‌ای شدن و پیچ خوردن برگ‌ها، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز، اثر روی تنفس، کاهش فضای بین سلولی، تخریب پروتئین‌ها و آنزیم‌ها، تولید مواد سمی و افزایش تولید انواع اکسیژن واکنش گر می‌شود (Shimshi *et al.*, 1992). تنش خشکی موجب کاهش محتوای نسبی آب و باعث تغییر در غشاء سلول و افزایش نشت الکترولیت‌های سلول می‌گردد (Fu *et al.*, 2004). گیاهان از سازوکارهای متعددی جهت مقابله با تنش استفاده می‌کنند. تنظیم اسمزی، یک نوع سازگاری به تنش کمبود آب است که از طریق تجمع مواد محلول درون سلول‌ها، منجر به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرآیندهای وابسته به آن در پتانسیل‌های پایین آب می‌شود (Vinocur and Altman, 2005). تنظیم اسمزی از طریق تولید انواع مواد آلی مانند پرولین، بتائین و قندهای محلول در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی است (Mohammadkhan and Heidari, 2008; Ahmad and Sharma, 2010). قندهای محلول به عنوان ثابت دهنده غشاهای سلولی و حفظ‌کننده تورژسانس سلول‌ها، عمل می‌کنند. در حقیقت، در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد (Slama *et al.*, 2007). اسیدآمین پرولین معمولاً در مقادیر زیاد در پاسخ به تنش‌های محیطی، تجمع می‌یابد. شکستن سریع پرولین بعد از پایان یافتن شرایط تنش، ممکن است خود تأمین‌کننده عوامل مورد نیاز برای ATP فسفوریلاسیون اکسیداتیو میتوکندریایی و تولید ترمیم صدمات ناشی از تنش باشد (Bates *et al.*, 1973). مقدار چندین اسیدآمین دیگر نیز تحت تأثیر تنش‌های مختلف مانند خشکی و شوری افزایش می‌یابد. متیونین یکی دیگر از اسیدهای آمینه است که غیر قطبی بوده و به همراه سیستئین جزء دو اسیدآمین

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

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

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

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

مواد و روش‌ها:

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

جدول ۱ - نتایج تجزیه خاک مورد استفاده در آزمایش.

| بافت خاک | ذرات خاک (%) | | | میزان عناصر قابل جذب (میلی گرم در لیتر) | | کربن آلی (%) | pH | شوری (dsm.m ⁻²) |
|----------|--------------|------|----|---|------|--------------|------|-----------------------------|
| | شن | سیلت | رس | پتاسیم | فسفر | | | |
| لومی | ۸۴ | ۱۴ | ۲ | ۱۷۰ | ۸/۵ | ۰/۰۶ | ۷/۸۸ | ۰/۶۲۵ |

طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد.

میزان قندهای محلول: اندازه‌گیری قندهای محلول برگ به

روش فنول سولفوریک (Dubois et al., 1956) با کمی تغییر صورت گرفت. به مقدار ۰/۲ گرم از نمونه‌های جوان‌ترین برگ پودر شده را با دو میلی‌لیتر بافر سدیم فسفات (pH=۷) ساییده و با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. از محلول رویی ۱۰ میکرولیتر برداشته و به آن ۹۹۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل، ۰/۵ میلی‌لیتر فنول ۵ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک (۹۸ درصد) افزوده شد. پس از تثبیت رنگ به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای ۲۷-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر صورت گرفت.

میزان لیزین و متیونین: اندازه‌گیری لیزین و متیونین با

استفاده از روش Feller و همکاران (۱۹۶۹) صورت گرفت، برای اندازه‌گیری میزان لیزین ۰/۵ گرم نمونه برگ را در ۵۰ میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید (۰/۱ نرمال) حل کرده آن را با آب به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و صاف کرده و سپس نیم میلی‌لیتر از آن را با گلیسرول (۵۰ درصد)، دو میلی‌لیتر از بافر فسفات (pH=6) و یک میلی‌لیتر نین‌هیدرین حل و به مدت ۳۰ دقیقه در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و جذب در ۵۷۰ نانومتر قرائت شد. همچنین برای اندازه‌گیری مقدار متیونین ۱۰ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده در مرحله سه لیزین را برداشته و در فلاکس ۵۰ میلی‌لیتری به آن چهار میلی‌لیتر از سدیم هیدروکسید (۵ نرمال)، دو میلی‌لیتر از محلول گلیسین آبدار و دو میلی‌لیتر از محلول سدیم نیتروفری سیانید آبدار (۰/۱) اضافه شد بعد از هر اضافه کردن خوب مخلوط (ورتکس) گردید. محلول حاصل به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و سپس به مدت ۵ دقیقه در حمام یخ

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

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

استخراج که شامل ۵ میلی‌لیتر تریس-اسید کلریدریک یک مولار، ۲۰۰ میکرولیتر Na₂EDTA یک مولار و ۰/۰۴ درصد (۷/۷-۲- مرکاپتو اتانول) می‌باشد مخلوط شده و مخلوط حاصل به مدت ۲۱ دقیقه با سرعت ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس برای خارج کردن تمام ناخالصی‌ها موجود در نمونه قسمت بالایی داخل لوله مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد و ۵۰۰۰ میکرولیتر از محلول برادفورد و ۲۹۰ میکرولیتر بافر استخراج و ۱۰ میکرو لیتر عصاره استخراج را مخلوط کرده و بعد از ورتکس میزان جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (Bradford, 1976).

میزان پرولین: اندازه‌گیری میزان پرولین برگ با استفاده از

روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) صورت گرفت، یک گرم بافت برگ در ۱۰ میلی‌لیتر سولفوسالیسیلیک اسید ۳/۳ درصد سائیده و همگنای حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و سپس به دو میلی‌لیتر از عصاره حاصل، دو میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین که ۱/۲۵ گرم پودر اسید نین‌هیدرین را در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال حل نموده و سپس ۲۰ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار به آن اضافه کرده و سپس دو میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال خالص اضافه گردید. لوله‌ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد و سپس چهار میلی‌لیتر تولوئن به هر یک از لوله‌ها اضافه و به مدت ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس گردید. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز بالایی رنگی، با دقت جدا و جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل یو وی ۲۱۰۰ ساخت یونیکو امریکا) با

رگرسیون با استفاده از SPSS و رسم نمودارها با استفاده از Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث:

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

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

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

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

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

$$\text{درصد خسارت} = 1 - \text{درصد پایداری غشاء}$$

محتوای آب نسبی بافت:

آب نسبی بافت برگ با استفاده از روش Weatherley (۱۹۹۵) مقدار ۰/۵ گرم از نمونه‌های برگ‌گی جدا شدند. بلافاصله وزن تر آن‌ها تعیین شد. سپس نمونه‌ها در داخل لوله‌های آزمایش در بدار محتوای ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر غوطه‌ور شدند و به مدت ۶ ساعت در محیط نسبتاً خنک و بدون نور نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت برگ‌ها را از داخل لوله‌های آزمایش در آورده و سریعاً با کاغذ خشک کن، آب روی برگ‌ها زدوده شد و وزن آن‌ها تعیین شد. سپس نمونه‌ها به داخل آون الکتریکی با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و بعد از ۴۸ ساعت وزن خشک برگ‌ها تعیین گردید و با استفاده از رابطه زیر محاسبه محتوای آب نسبی تعیین شد.

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

سطح برگ و طول ساقه و وزن خشک اندام هوایی: سطح

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

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر کاربرد محرک‌های رشد و تنش خشکی بر صفات یونجه همدانی.

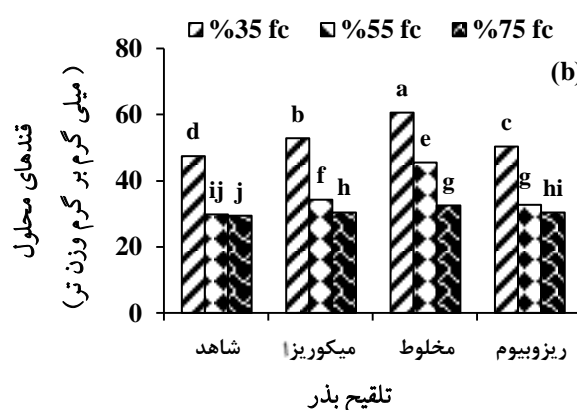
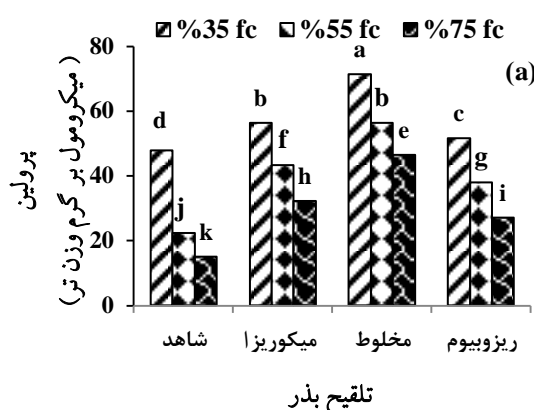
| میانگین مربعات | | | | | | | |
|------------------|------------|---------------------|----------------------|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|
| منابع تغییرات | درجه آزادی | پرولین | قندهای محلول | پروتئین | لیزین | متیونین | پتانسیل اسمزی |
| تکرار | ۲ | ۰/۰۰۲ ^{ns} | ۰/۰۰۸۳ ^{ns} | ۲/۷۶ ^{ns} | ۰/۰۰۱ ^{ns} | ۰/۰۰۰۰۰۷ ^{ns} | ۰/۰۱۱ ^{ns} |
| محرک رشد (M) | ۳ | ۱۳/۱۶ ^{**} | ۱/۸۸ ^{**} | ۱۶۹/۴۹ ^{**} | ۰/۰۲۳ [*] | ۰/۰۰۰۰۱۲ ^{ns} | ۱۸/۹۴ ^{**} |
| خشکی (D) | ۲ | ۲۱/۶۲ ^{**} | ۱۶/۱۸ ^{**} | ۹۴۲/۰۷ ^{**} | ۰/۰۱۹ [*] | ۰/۰۰۰۰۴۷ ^{**} | ۱۱۲/۳۳ ^{**} |
| M × D | ۶ | ۷/۸۱ ^{**} | ۳/۶ ^{**} | ۵۱۵/۹۸ ^{**} | ۰/۰۰۹ ^{ns} | ۰/۰۰۰۰۰۹ ^{ns} | ۲۷/۷۷ ^{**} |
| خطای آزمایش | ۲۲ | ۰/۰۰۱ | ۰/۰۰۱ | ۰/۸۱ | ۰/۰۰۶ | ۰/۰۰۰۰۰۹ | ۰/۱۷ |
| ضریب تغییرات (%) | - | ۰/۷۵ | ۰/۸۱ | ۲/۱۳ | ۵/۹ | ۳/۶ | ۳/۳۲ |

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

ادامه جدول ۲- تجزیه واریانس اثر کاربرد محرک‌های رشد و تنش خشکی بر صفات یونجه همدانی

| میانگین مربعات | | | | | | |
|------------------|------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| منابع تغییرات | درجه آزادی | پایداری غشا | محتوای آب نسبی | ارتفاع ساقه | سطح برگ | وزن خشک اندام هوایی |
| تکرار | ۲ | ۳/۰۲۷ ^{ns} | ۰/۱۹۸ ^{**} | ۰/۱۹ | ۳/۴۴ | ۰/۰۳۸ |
| محرک رشد (M) | ۳ | ۱۷۳/۵۴ ^{**} | ۲۸۶/۱۴ ^{**} | ۲۲۲/۰۲ ^{**} | ۶۸۶/۴۷ ^{**} | ۶۰/۷۸ ^{**} |
| خشکی (D) | ۲ | ۶۴/۵۵ ^{**} | ۲۸۴۴/۹۴ ^{**} | ۲۸۶/۳۶ ^{**} | ۹۱۹/۵۲ ^{**} | ۹۴/۳۸ ^{**} |
| M × D | ۶ | ۴۹۶/۱۱ ^{**} | ۶۱۲/۷۵ ^{**} | ۱۹۵/۵۵ ^{**} | ۳۶۰/۹۳ ^{**} | ۳۶/۶۵ ^{**} |
| خطای آزمایش | ۲۲ | ۲/۹۹ | ۰/۵۸ | ۰/۵۸ | ۲/۷۷ | ۰/۰۰۰۶۳ |
| ضریب تغییرات (%) | - | ۳/۱۸ | ۱/۶۶ | ۳/۹۳ | ۷/۳۶ | ۰/۳۲ |

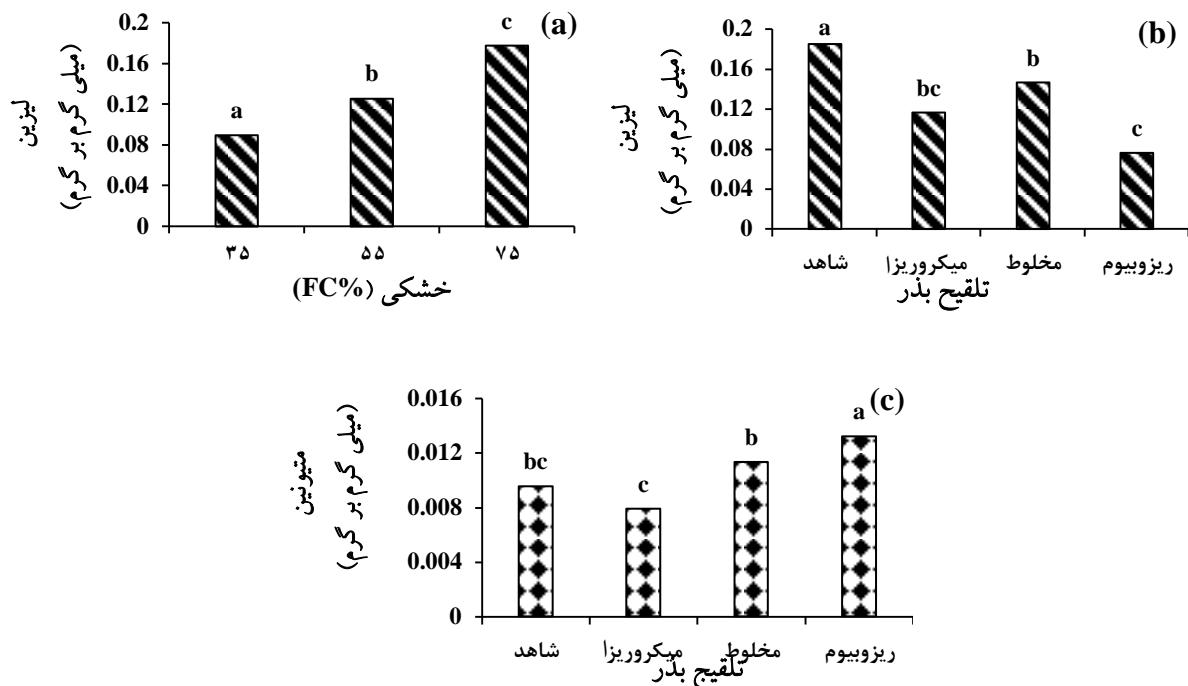
ns, **, * به ترتیب غیره معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد.



شکل ۱- تأثیر محرک‌های رشد بر میزان پرولین (a) و قندهای محلول (b) یونجه تحت تنش کم‌آبی. حروف نامشابه نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ۵ درصد است.

فسفر دارد به تلقیح با قارچ‌های میکوریزا آربوسکولار واکنش مثبت نشان دهد. همچنین به هیف‌های میکوریزا آربوسکولار چسبیده و از آن به عنوان راه نفوذ به ریشه استفاده می‌کند؛

نیتروزنی هست و استفاده از نیتروزن می‌تواند سبب افزایش مقدار آن‌ها در گیاه شود (Marschner, 1995). اثر هم افزایی به این دلیل است که گره‌های ریزوبیوم به دلیل نیاز شدیدی که به



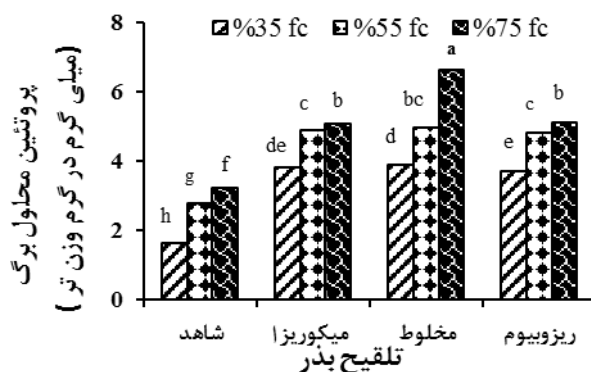
شکل ۲- تأثیر تنش خشکی بر میزان لیزین (a) و محرک‌های رشد بر میزان لیزین (b) و متیونین (c) یونجه تحت تنش کم‌آبی. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ۵ درصد.

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

پروتئین‌های برگ نیز در سطح ۱ درصد تحت تأثیر

بنابراین احتمالاً ریزوبیوم‌ها نیز با گسترش هیفها گسترش یابند و میزان فعالیت آن‌ها افزایش یابد (Bianciotto *et al.*, 2001) اثرات اصلی تنش خشکی در سطح ۵ درصد بر میزان لیزین تأثیر معنی‌داری نشان داد ولی بر مقدار متیونین بی تأثیر بود (جدول ۲). خشکی موجب کاهش مقدار لیزین در برگ‌های یونجه گردید، به طوری که مقدار این اسید آمینه در شرایط عدم تنش (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) ۰/۱۷۷ میلی‌گرم بر گرم بود، ولی شدیدترین سطح تنش با کاهش ۹۸ درصد به ۰/۰۸۹ میلی‌گرم بر گرم رسید (شکل ۲). تلقیح با محرک‌های رشد نیز در سطح ۵ درصد بر میزان لیزین تأثیرگذار بود. تلقیح بذر موجب کاهش میزان لیزین شد. بیشترین (۰/۱۸۵ میلی‌گرم بر گرم) و کمترین (۰/۰۷۶ میلی‌گرم بر گرم) مقدار لیزین به ترتیب از تیمار شاهد و تلقیح با قارچ ریزوبیوم بدست آمد. تلقیح بذر در سطح ۱ درصد بر میزان متیونین نیز تأثیر معنی‌داری داشت بر خلاف لیزین موجب افزایش مقدار این اسید آمینه شد. ریزوبیوم بالاترین مقدار متیونین را به خود اختصاص داد (شکل ۲).

کاهش اسید آمینه‌های لیزین و متیونین در پژوهش توکلی و



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

کم‌آبی داشت. از طرف دیگر همان‌طور که در بحث پرولین و قندهای محلول ذکر شد نیتروژن در ساخت پروتئین نقش دارد و با تغییر مقدار آن در اثر تنش پروتئین‌ها تخریب شده و میزان آن‌ها کاهش می‌یابد. همچنین از آنجا که نیتروژن در گیاهان به صورت پروتئین تکامل می‌یابد و یکی از منابع ساخت نیتروژن باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و میکوریزا می‌باشند از طرف دیگر همان‌طور که ذکر گردید این دو ریز جانداران باعث افزایش جذب عناصر آهن و پتاسیم می‌شود؛ بنابراین افزایش میزان نیتروژن، آهن و پتاسیم در گیاه منجر به افزایش میزان پروتئین می‌شود. در مطالعه Movludi و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند مصرف نیتروژن در طی تنش کم آبی موجب افزایش میزان قندهای محلول و پرولین در برگ‌های جوه بهاره شد.

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

برهمکنش محرک‌های رشد و تنش کم‌آبی قرار گرفت (جدول ۲). افزایش شدت تنش موجب کاهش پروتئین‌های محلول برگ شده و تلقیح بذر سبب افزایش مقدار آن شد. بیشترین پروتئین محلول برگ در تمام سطوح تنش به تلقیح دوگانه تعلق داشت و تیمارهای ریزوبیوم و میکوریزا در یک دامنه بوده و با یک دیگر تفاوت آماری نداشتند. بالاترین (۶/۴۳ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و پایین‌ترین (۱/۶۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) میزان پروتئین به ترتیب در تیمار تلقیحی مخلوط در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی مشاهده شد (شکل ۳).

پژوهش دیگری تأثیر کاهش پتانسیل آبی خاک بر روی پروتئین و رنگیزه‌های موجود در کلروپلاست را گزارش نمود (Soliman *et al.*, 2011). تنش رطوبتی وضعیت پلی ریبوزوم‌های مؤثر در ساخته‌شدن پروتئین‌ها در بافت‌ها را تغییر می‌دهد. تعداد پلی ریبوزوم‌ها در شرایط کم‌آبی کاهش می‌یابد. در این رابطه مطالعات انجام گرفته در ذرت دلالت بر این دارد که افزایش سطح تنش آبی موجب کاهش در سطح پلی ریبوزوم‌ها شده و در نتیجه گونه‌های گیاهی که توانسته‌اند تحت این شرایط ادامه بقاء یابند، ظرفیت و توانایی بیشتری در جهت تولید پلی ریبوزوم‌ها در بافت‌های خود نشان داده‌اند (Scott *et al.*, 1979). یون‌های فلزی از قبیل آهن به عنوان عنصر ریزمغذی ضروری دخیل در تقسیم سلولی، متابولیسم اسید نوکلئیک و سنتز پروتئین هستند (Cakmak *et al.*, 1999). فتحی امیر خیز و همکاران (۱۳۹۰) گزارش نمودند، کاربرد آهن تأثیری مثبت در افزایش مقدار پروتئین‌های محلول برگ گلرنگ در تنش

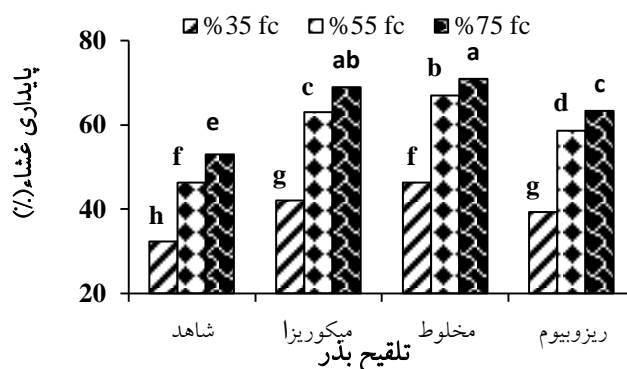
شرایط عدم تنش و عدم تلقیح بذر در تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی است (شکل ۴).

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

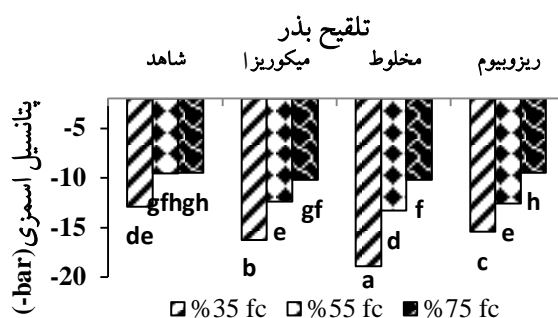
برهم‌کنش خشکی و تلقیح بذر بر پتانسیل اسمزی برگ‌های یونجه تأثیرگذار بود (جدول ۲). تنش موجب کاهش پتانسیل اسمزی شده و تلقیح بذر نیز موجب افزایش مقدار آن شد. با توجه به نتایج موجود در شکل ۵ مشاهده می‌شود. سطوح پایین تنش تأثیر غیره معنی‌داری بر پتانسیل اسمزی داشته به طوری که در شرایط عدم تلقیح (شاهد) بین ۷۵ و ۵۵ درصد ظرفیت زراعی تفاوت آماری مشاهده نشد. همچنین در شرایط عدم تنش (۷۵ درصد ظرفیت زراعی) تلقیح بذر تأثیری بر پتانسیل اسمزی نداشته ولی با شدت یافتن تنش تفاوت بین تیمارهای تلقیح افزایش یافت. پایین‌ترین پتانسیل اسمزی (بالاترین پتانسیل منفی) از تلقیح مخلوط در سطح ۳۵ درصد ظرفیت زراعی بدست آمد (شکل ۵). یافته‌های این پژوهش با نتایج Dehqanzadeh و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. در طی تنش، پتانسیل آب سلول به پایین‌تر از حد آستانه می‌رسد. کاهش تورژسانس باعث فعال شدن یک توالی پیچیده

فرآیندهای تطابقی مرتبط با سطح تحمل گیاه به تنش می‌شود. در چنین شرایطی آنزیم پروتئولاز افزایش می‌یابد و سنتز پرولین به‌منظور افزایش توان جذب آب تشدید می‌شود. (Ghorbanli and Niakan, 2005). تجمع املاح و محلول‌های سازگاری موجب متعادل کردن پتانسیل واکوئل‌ها و کاهش پتانسیل اسمزی سلولی می‌شود (Mansour et al., 2005). از متابولیت‌های سازگار می‌توان به تجمع پرولین، قندهای محلول و برخی از اسید آمینه‌های دیگر، مانند لیزین و متیونین اشاره کرد که در این پژوهش نیز با افزایش تنش تولید آن‌ها افزایش پیدا کرد. کاهش پتانسیل اسمزی از طریق تجمع املاح در سلول‌ها و حفظ فشار آماس سلول‌ها به توسعه و رشد گیاه در شرایط تنش کمک می‌کند. استفاده از محرک‌های رشد موجب بهبود تنظیم اسمزی در جهت افزایش تحمل گیاه به تنش شد. چنین نتایجی توسط مطالعات دیگر نیز گزارش شده است (Kaschuk et al., 2010). تجمع محلول‌های سازگار در شرایط تنش با توجه به وجود نیتروژن در ساختار آن‌ها موجب تحمیل هزینه کربن و نیتروژن بر گیاه می‌شود. از این‌رو استفاده از محرک‌های رشد با تأمین نیتروژن تا حد زیادی سبب افزایش مقدار آن‌ها در گیاه شده و موجب تنظیم اسمزی می‌شود (Soliman et al., 2011).

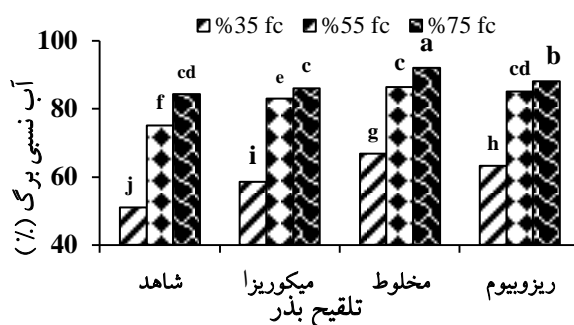
محتوای آب نسبی نیز تحت تأثیر اثرات اصلی و برهم‌کنش محرک‌های رشد و تنش خشکی در سطح ۱ درصد قرار گرفت (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد، تنش موجب کاهش محتوای آب نسبی سلول و تلقیح با کاهش تأثیرات تنش، سبب افزایش محتوای آب نسبی بافت شد. مشاهده شد بین تنش ۷۵ و ۵۵ درصد ظرفیت زراعی تفاوت زیادی نیست ولی تنش ۳۵ درصد موجب کاهش شدید در آب سلول شد. تنش موجب افزایش اختلاف بین تیمارهای تلقیح نیز شده است. در بین تیمارهای تلقیح، تلقیح مخلوط بیشترین تأثیر را نشان داد، به طوری که بیشترین (۹۱/۱ درصد) و کمترین (۵۲ درصد) محتوای آب نسبی به ترتیب از تیمار مخلوط در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و شاهد در ۳۵ درصد ظرفیت زراعی بدست آمد (شکل ۶).



شکل ۴- برهم کنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر پایداری غشاء برگ‌های یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ۵ درصد.



شکل ۵- برهم کنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر پتانسیل اسمزی برگ‌های یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ۵ درصد.



شکل ۶- برهم کنش محرک‌های رشد و تنش خشکی بر میزان آب نسبی برگ‌های یونجه. حروف نامشابه نشان دهند تفاوت معنی‌دار آزمون LSD در سطح ۵ درصد.

مخلوط با افزایش جذب عناصر غذایی و افزایش جذب آب و همچنین گسترش ریشه‌ها ناشی از گسترش هیف‌های میکوریزا بیشترین محتوای آب نسبی را به خود اختصاص داد. علاوه بر آن با افزایش پرولین و قندهای محلول در حضور تلقیح دوگانه میزان محتوای آب نسبی نیز افزایش می‌یابد که احتمالاً به دلیل حفظ آماس است. با توجه به نتایج معادلات رگرسیونی مشاهده می‌شود در طی تشدید تنش سهم متابولیت‌های

کاهش رشد و فعالیت ریشه و افزایش میزان تبخیر و تعرق از جامعه گیاهی از عوامل کاهش محتوای آب نسبی بافت شناخته شده‌اند (Taruminkeng and Coto, 2003). به نظر می‌رسد محرک‌های رشد با جذب بیشتر آب توسط هیف‌ها می‌توانند در افزایش محتوای آب نسبی بافت نقش داشته باشند. تصور می‌شود عامل دیگری نیز مانند افزایش جذب آب نیز در بالا بردن آب نسبی برگ دخیل باشد. به طوری که تلقیح

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

| صفات مستقل | همبستگی R square | ضرایب رگرسیونی معادله | | | مدل Model | |
|---------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|---------------------|-----------------------|------------------------------------|
| | | b ₀ | b ₁ | b ₂ | | b ₃ |
| قندهای محلول | ۰/۸۹۴ | ۱۱۴/۸۳** | -۷/۸۰۶** | -۰/۴۳۶** | ۰/۰۰۰** | $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$ |
| پرویلین | ۰/۳۸۵ | ۵۲/۲۸** | ۲۷/۹۳** | -۷/۳۵۷** | ۰/۴۸۳** | $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$ |
| لیزین | ۰/۲۸۴ | ۹۵/۳۱* | -۲۲۶/۶۴ ^{ns} | ۶۲۱/۰۹** | -۶۴۹/۹۰ ^{ns} | $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2$ |
| متیونین | ۰/۰۳۵ | ۶۹/۲۸ ^{ns} | ۶۹۴/۱۹ ^{ns} | ^{ns} | ^{ns} | $Y = 0$ |
| پروتئین | ۰/۲۳۸ | ۲۸/۹۷ ^{ns} | ۱/۶۷ ^{ns} | ۱۱/۶۰** | -۱/۰۶** | $Y = b_2X^2$ |
| پتانسیل اسمزی | ۰/۸۸۲ | ۱۱۸/۱۸** | -۲/۵۴ ^{ns} | -۰/۵۷ ^{ns} | ۰/۰۰۰** | $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$ |
| پایداری غشاء | ۰/۸۳۱ | -۱۶/۰۸* | ۲/۲۲** | ۰/۰۰۰ | -۰/۰۰۰** | $Y = b_0 + b_1X + b_2X^2 + b_3X^3$ |

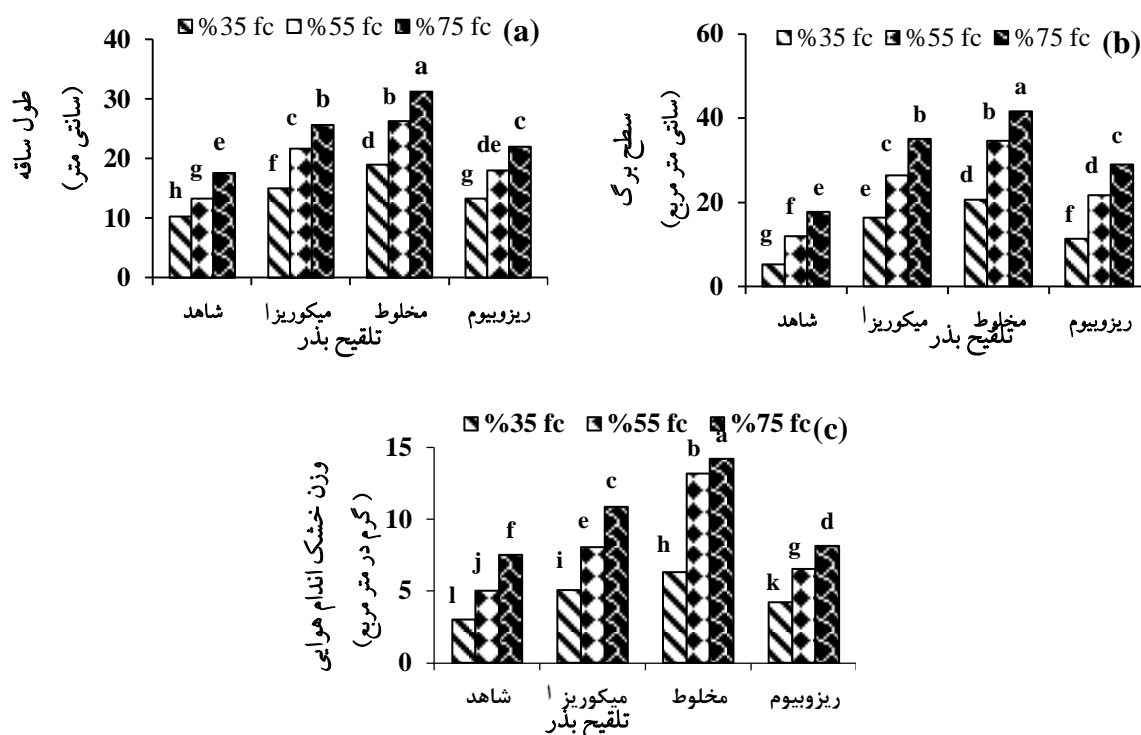
ns, **, * به ترتیب غیره معنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱ و ۵ درصد

موجب افزایش مقدار آن‌ها شد. با توجه به نتایج مشاهده می‌شود کاربرد میکرووریزا در مقایسه با ریزوبیوم بهتر عمل کرده و همواره در تمام سطوح تنش بالاتر از ریزوبیوم بود ولی با این وجود کاربرد همزمان آن‌ها بالاترین طول ساقه، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی را نشان داد. بالاترین طول ساقه (۳۱ سانتی‌متر)؛ سطح برگ (۴۱/۶۶ سانتی‌متر مربع) و وزن خشک اندام هوایی (۱۴/۵۲ گرم در متر مربع) در ۷۵ درصد ظرفیت زراعی و تلقیح مخلوط بذر و کمترین مقدار آن‌ها (۱۰/۳۳ سانتی‌متر طول ساقه، ۵/۳ سانتی‌متر مربع در بوته سطح برگ و ۳/۵۷ گرم در متر مربع وزن خشک اندام هوایی) نیز از ۳۵ درصد ظرفیت زراعی از بذور تلقیح نشده بدست آمد (شکل ۷). کاهش طول ساقه و سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی با افزایش تنش در گزارش Pennypacker و همکاران (۱۹۹۰) نیز گزارش شده است. رشد برگ اولین فرایندی است که به کمبود آب واکنش نشان می‌دهد و در نتیجه سطح برگ در گیاه کاهش می‌یابد (Paye, 2000). کمبود آب با کاهش آماس سلولی، رشد و تقسیم سلول‌ها را کاهش داد و در نتیجه تعداد و سطح برگ و طول ساقه و وزن خشک در گیاه کاهش پیدا می‌کند (Desuloux et al., 2000). با توجه به تغییرات سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی در طی محتوای آب بافت مشاهده می‌شود که تغییرات آنها با یکدیگر به صورت معادله درجه دوم می‌باشد. به طوری که افزایش محتوای آب بافت تا یک حدی موجب افزایش سطح برگ و وزن خشک گردید.

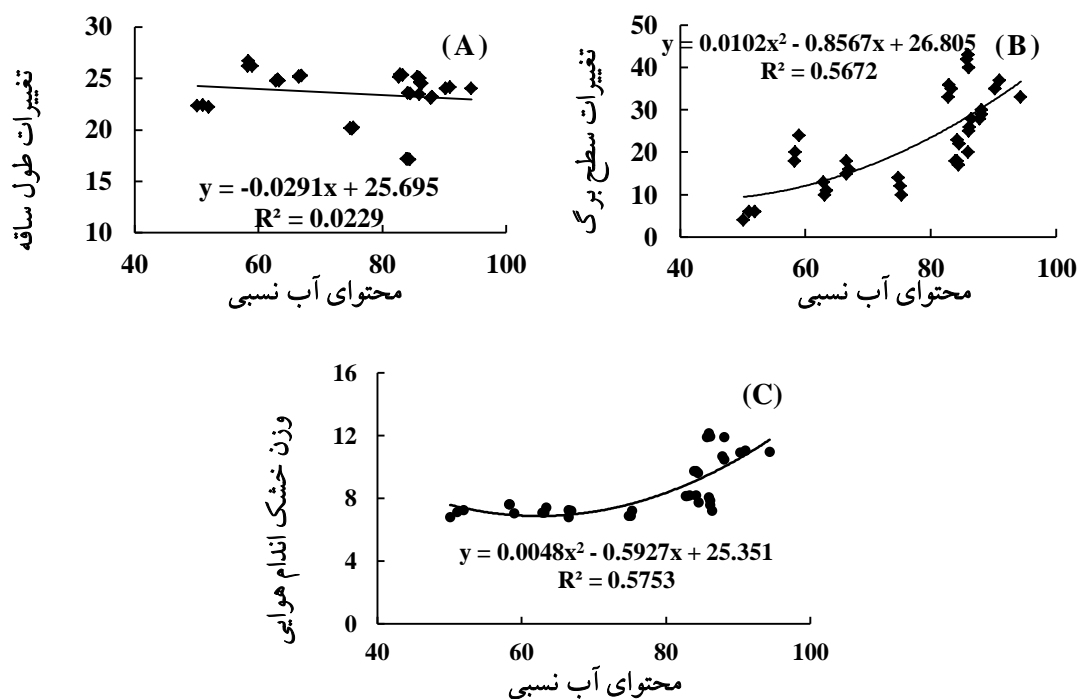
سازگاری به قندهای محلول در پیش‌بینی محتوای آب نسبی بافت افزایش می‌یابد (جدول ۳). افزایش قندهای محلول با توجه به نقش آن در پایداری غشا موجب افزایش سهم پایداری غشا در تنظیم آب بافت می‌شود.

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

با توجه به تجزیه واریانس‌ها مشاهده می‌شود که اثرات اصلی تنش خشکی و تلقیح بذر و برهم‌کنش آن‌ها در سطح احتمال ۱ درصد بر طول ساقه، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی یونجه معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد، تنش موجب کاهش ارتفاع، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی یونجه شده و کاربرد محرک‌های رشد نیز



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



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

کمترین ضریب همبستگی را نشان داد (شکل ۸). همچنین میکوریزا با افزایش جذب عناصر غذایی و حضور

طول ساقه در مقایسه با سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی کمتر تحت تأثیر محتوای آب بافت می‌باشد و تغییرات آن‌ها

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

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

فتحی امیرخیز، ک. امینی دهقی، م. مدرس ثانوی، ع.، حشمتی، س. ۱۳۹۰. تاثیر کاربرد خاکی و برگی عنصر آهن بر برخی خصوصیات بیوشیمیایی گلرنگ (*Catthamus tinctorius* L.)، تحت دو رژیم رطوبتی. مجله علوم گیاهان زراعی ایران ۴۲: ۵۱۸-۵۰۹.

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

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

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

نتیجه‌گیری:

با توجه به نتایج این پژوهش مشاهده شد که خشکی موجب

منابع:

آخوندی، م. صفرنژاد، ع. لاهوتی، م. ۱۳۸۵. اثر تنش خشکی بر تجمع پرولین و تغییرات عناصر در یونجه یزدی نیکشهری و رنجر (*Medicago sativa* L.). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. ۱۶۵-۱:۱۷۴.

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

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

زارع مهرجردی، م. باقری، ع. بهرامی، ا. ر. نباتی، ج. معصومی، ع. ۱۳۹۱. تأثیر تنش خشکی بر خصوصیات فتوسنتزی، ترکیبات

فنی و ظرفیت مهار رادیکال های فعال ژنوتیپ های مختلف نخود (*Cicer arietinum* L.) در محیط آبکشت. علوم و فنون کشت های گلخانه ای ۱۴: ۷۶-۵۹.

- Feller, R. E., Feller, D. A. and Shepherd, A. D. (1969) Determination of free lysine and Methionine in Amino acid-Fortified wheat. *HortScience* 46: 614-620.
- Fu, J., J. Fry and Huang, B. (2004) Minimum water requirements of four turfgrasses in the transition zone. *HortScience* 39: 1740-1744.
- Ghorbanli, M., and Niakan, M. (2005) Study the effect of drought stress on soluble sugars, protein, proline, phenol compounds and reductase enzyme activity in soybean plants cv. Gorgan 3. *Tarbiat Moallem University Sci Magazin*. 5: 537-550.
- Irigoyen, J. J., Emerich, D. W., Sanchez-Diaz, M. (1992) Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evolution. *Physiologia Plantarum* 84:67-72.
- Janardhan, K. V. and Krishnamorthy, V. (1975) A rapid method for determination of osmotic potential of plant cell. *Current Science* 44: 390-391
- Kaschuk, G, Leffelaar, P. A, Giller, K. E, Alberton, O., Hungria, M. and Kuyper, T. W. (2010) Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 125-127
- Makersie, B. D. and Leshem, Y. Y. (1994) Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands
- Manivannan, P., Abdul Jaleel, C., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2008) Osmoregulation and antioxidant metabolism in drought-stressed *Helianthus annuus* under triadimefon drenching. *Comptes Rendus Biologies* 331: 418-425.
- Mansour, M. M. F., Salama, K. H., Ali. F. Z. M. and Abou Hadid, A. F. (2005) Cell and plant responses to NaCl in *Zea mays* L. cultivars differing in salt tolerance. *General and Applied Plant Physiology* 31: 29-41.
- Marschner, H., (1995) Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd edition, Academic Press. Ltd., London, 862 p.
- Mengel, K. and Kirkby, E. A. (2001) Principles of Plant Nutrition. 5th Edition. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 849.
- Mohammadkhani, N. and Heidari, R. (2008) Drought-induced accumulation of soluble sugars and proline in two maize varieties. *World Applied Sciences Journal* 3: 448-453.
- Movludi, A., Ebadi, A., Jahanbakhsh, S., Davari, M. and Parmoon, G. H. (2014) The Effect of Water Deficit and Nitrogen on the Antioxidant Enzymes' Activity and Quantum Yield of Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Not Bot Horti Agrobo*. 2014: 42(2):398-404.
- Pang, X. M., Zhang, Z. Y., Wen, X. P., Ban, Y. and Moriguchi, T. (2007) Polyamines, allpurpose players in response to environment stresses in plants function of polyamines in plants: recent
- Allam, M. Z., Haider, S. A. (2007) Accumulation of protein, chlorophyll and relative leaf water Content in Barley (*Hordeum vulgare* L.) in relation to sowing time and nitrogen fertilizer. *Reserch Journal Agricultur Biological Science* 3: 149-152.
- Antunes, P. M., Deaville, D., and Goss, M. J. (2005) Effect of two AMF life strategies on the tripartite symbiosis with *Bradyrhizobium japonicum* and soybean. *Mycorrhiz Issue: Online First*, Published online: 16 December 2005.
- Atanasova, E. (2008) Effect of nitrogen sources on the nitrogenous forms and accumulation of amino acid in head cabbage. *Plant Soil and Environment* 54: 66-71.
- Azcon, R., Rubio, R. and Burea, J. M. (1991) Selective interaction between different species of mycorrhizal fungi and *Rhizobium meliloti* strains and their effects on growth, N₂-fixation (N₁₅) and nutrition of *Medicago sativa* L. *New Phytologist* 117:339-404.
- Baon, J. B., Smith S.E. and Alston A. M. (1994) Growth and phosphorus uptake of rye with long and short root hairs: interaction with mycorrhizal infection. *Plant and Soil* 197: 247-254.
- Bates, L. S., Walderen, R. D. and Taere, I. D. (1973) Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant Soil*, 39: 205-207.
- Bianciotto, V., S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante and S. Perotto. (2001) Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *European Journal of Histochem* 45: 39-49.
- Bradford, M. M. (1979) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cakmak, I., Kalayci, M., Ekis, H., Brauni, J., Kilinc, Y. & Yilmaz, A. (1999) Zn deficiency as a practical problem in Plant and human nutrition in Turkey: a NATO-science for stability project. *Field Crops Research*, 60, 175-188.
- Dehqanzadeh, H., Khajehpour, M. R., Heidari Sharif Abad, H., and Soleimani, A. S. (2008) Effect of limited irrigation on the accumulation of proline, free soluble sugars and potassium in bread wheat cultivars. *10th Iran Cong Agron and Plant Breed Science*, 430p.
- Desuloux, D., Huynh, T. T., and P. Roumet. (2000) Idaeification of soybean plant characteristics that indicate the timing of olrought stress. *Crop Science* 40: 716-722.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- Eppendorfer, W.H. (1978) Effects of N-fertilisation on amino acid composition and nutritive value of spinach, kale, cauliflower and potatoes. *Journal Science Food Agricultueal* 4: 305-311.

- vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy. *Biology and Fertility of Soils* 28: 139–144.
- Slama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi, D., Savoure, A. and Abdelly, C. (2007) Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum*. *Environmental and Experimental Botany* 61:10–17.
- Soliman, A. S., Shanan, N. T., Massoud, O. N. and Swelim, D. M. (2011) Improving salinity tolerance of *Acacia saligna* (Labill.) Plant by *Arbuscular mycorrhizal* fungi and *Rhizobium* inoculation. *African Journal of Biotechnology* 11: 1259-1266.
- Tarumingkeng, R. C., and Coto, Z. (2003) Effects of drought stress on growth and yield of soybean. @2003 Kisman, Science Philosophy PPs 702, Term paper, Graduate School, Borgor Agricultural University (Institut Ppertanian Bogor), December 2003.
- Van Den Berg, L. and Zeng, Y. J. (2006) Response of South African indigenous grass species to drought stress induced by polyethylene glycol (PEG) 6000. *South African Journal of Botany* 72: 284-286
- Vinocur, B. and Altman, A. (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
- Wang, Z. and B. Huang. (2004) Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. *Crop Science* 44:1729-1736.
- Weatherley, P. E. (1995) Studies in water relation of cotton plants, the field measurement of water deficit in leaves. *New Phytologist* 49: 81-87.
- Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2000) Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. *Photosynthetica* 38: 171-186
- development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34: 135-148
- Pavlik, M., Pavlíková, D., Balík, J. and Neuberg, M. (2010) The contents of amino acids and sterols in maize plants growing under different nitrogen conditions. *Plant Soil and Environment* 56: 125-132.
- Paye, W. A. (2000) Water relations of sparse canopied crops. *Agronomy Journal* 92:807-814.
- Pennypacker, B. W., Leath, K. T., Stout, W. L. and R. R. Hill (1990) Technique for simulating field drought stress in the greenhouse. *Agronomy Journal* 82: 951-957.
- Rafiee, M., Lari, H., and Abdipoor, F. (2008) Change of corn cultivars carbohydrate under drought stress. 10th Iranian Cong. of Agron and Plant Breeding Sci . 318p.
- Refsum H., Ueland, P.M, Nygård, O., Vollset, S.E. (1998) Homocysteine and Cardiovascular Disease. *Annual Review of Medicine* 49: 31–62
- Riahinia, S. H., Khazaei H. R., Kafi M., and Nezami, A. (2013) Effects of water stress and nitrogen levels on relative water content, chlorophyll fluorescence and membrane stability index in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Reserch on Crops* 14: 88-94.
- Saneoka, H., Moghaieb, R. E. A., Premachandra, G. S., and Fujita, K. (2004) Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in *Agrostis palustris* Huds. *Environmental and Experimental Botany* 52:131–138.
- Scott, N. S., R. Munns and Barlow, E. W. R. (1979) Polyribosome content in young and eged wheat leaves subjected to drought. *Journal of Experimental Botany* 30: 905- 91.
- Shimshi, D., Mayoral, M. L., Atsmond, D. (1992). Response to water stress in wheat and related wild species. *Crop Science* 22: 123-128.
- Singh, S. and Kapoor, K. K. (1999) Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a