

## تغییرات عناصر غذایی و زیست توده 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 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 زیست توده 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 ۵۰٪ 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 کلینزاسیون ریشه، و اثر متقابل بین آبیاری و کود بر میزان پروتئین برگ و عملکرد زیستی معنی‌دار بود. بیشترین افزایش کلینزاسیون ریشه همیشه بهار نسبت به شاهد در گیاهان تیمار شده با گونه *G. hoi* مشاهده گردید. به طور کلی در شرایط تنش کمبود آب، تولید زیست توده 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، کلینزاسیون، میکوریزا

### مقدمه:

شریعت، ۱۳۸۳). همچنین این گیاه حاوی تری‌ترپن‌ها، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها، کارتوئیدها، 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، سالیسیلیک اسید، لوریک اسید، پالمیتیک اسید، کلسترول و اینولین در ریشه می‌باشد (صمصام

\*نویسنده مسؤل، 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 می شود (Rekha et al., 2009). علت افزایش عملکرد محصول در گیاهان تلقیح شده با میکوریزا تعادل آبی آنها در شرایط تنش خشکی و در نتیجه جذب بیشتر آب و عناصر غذایی معدنی می باشد (حبیبزاده و همکاران، ۱۳۹۱). برای همزیستی سودمند میکوریزا، سطح فسفر خاک کمتر از ۵۰ ppm توصیه می شود و قارچ های میکوریزا زمانی که میزان  $Ca(H_2PO_4)_2$  در یک کیلوگرم خاک یک گرم یا بیشتر باشد، از بین می روند (Mosse, 1973). نتایج تحقیقات Norris و همکاران (۱۹۹۴) نشان می دهد که همزیستی و آلودگی میکوریزیایی ریشه ها در سطوح بالاتر از این مقدار کاهش یافته و تلقیح گیاهان در این شرایط کمکی به گیاه نخواهد کرد. همزیستی با قارچ های میکوریزا میزان رشد، تولید زیست توده و جذب عناصر غذایی در گندم (AL-Karaki et al., 2004)، زیست توده در نعنای (باقری و همکاران، ۱۳۹۲) و میزان فتوسنتز در فلفل (Demir, 2004) را نسبت به گیاهان شاهد بهبود می بخشد. افزایش میزان فتوسنتز در گیاهان میکوریزیایی به علت بهبود جذب فسفر و افزایش محتوای کلروفیل می باشد (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 برگ های گیاه دارویی همیشه بهار، در سطوح مختلف تأمین آب (تنش و بدون تنش) ضروری بوده و از اهداف اصلی این تحقیق می باشد.

#### مواد و روش ها:

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 بلوک های کامل تصادفی در ۳ تکرار اجرا گردید. ویژگی های خاک محل آزمایش در جدول ۱

(Wang et al., 2003). بررسی تأثیر تنش کمبود آب روی همیشه بهار نشان می دهد که افزایش فاصله آبیاری عملکرد زیست توده این گیاه را کاهش می دهد (Shokrani et al., 2012). همچنین با افزایش شدت تنش 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) عملکرد (دانه و روغن) و اجزای تشکیل دهنده عملکرد در شرایط تنش خشکی به شدت کاهش یافت، در حالی که درصد روغن افزایش داشت. سازگاری گیاهان به شرایط محیطی متفاوت مثل خشکی از طریق جذب یون های معدنی (مانند افزایش میزان پتاسیم در اندام های هوایی) و یا از طریق سنتز زیاد مواد حل شونده سازگار که به عنوان اسمولیت عمل می کنند، صورت می گیرد.

گیاهان مقادیر کمی از کودهای شیمیایی فسفره در دسترس خودشان را استفاده می کنند و بقیه آن در خاک به سرعت به ترکیبات نامحلول تبدیل می شود (Vassilev and Vassileva, 2003). این امر موجب می شود به طور مکرر از کودهای شیمیایی فسفره استفاده گردد، اما استفاده مرتب از آنها پرهزینه بوده و از طرفی برای محیط زیست نامطلوب می باشد (Reddy et al., 2002). میکروارگانسیم هایی که کلات های با حلالیت پایین را حل می کنند، فسفات غیرمحلول را به فرم آلی آن تبدیل می کنند. کودهای فسفاته زیستی حاوی گونه های باکتریایی از جنس های *Bacillus* و *Pseudomonas* می باشد که با استفاده از ترشح اسیدهای آلی و آنزیم فسفاتاز، فسفر نامحلول خاک را به شکل قابل جذب برای گیاهان در می آورند (Rodriguez et al., 2004; Chung et al., 2005).

قارچ های میکوریزیایی یکی از مهمترین میکروارگانسیم های محیط ریشه محسوب می شوند که از طریق ایجاد همزیستی با ریشه گیاهان نقش کلیدی را در پایداری ریزوسفر در زیست بوم های زراعی بازی می کنند. 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 می گردد. در مقابل، این رابطه

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه تا عمق ۳۰ سانتی‌متر

رس	سیلت	شن	پتاسیم قابل جذب	فسفر قابل جذب	کربن آلی	مواد خشتی شونده	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی	درصد اشباع
(%)	(%)	(%)	(mg/kg)	(%)	(%)	(%)	(dS/m)	(%)	(%)
۲۴	۳۲	۴۴	۱۶۶	۳۷/۶	۰/۷۸	۱۰/۳	۸/۵۱	۰/۹۱۵	۳۲

برای اندازه‌گیری عناصر غذایی برگ، ۵ بوته از هر کرت در مرحله گلدهی کامل بوته‌ها به‌طور 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 پتاسیم و اکسید مس) مخلوط، و روی آن ۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در دستگاه کج‌دال (مدل v40، شرکت Hanon) در دمای ۴۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از خروج نمونه‌ها از دستگاه روی هرکدام ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه نموده و سپس با اسید سولفوریک تیتراژول تیتراژ شدند. مقدار اسید مصرف شده در تیتراسیون در فرمول زیر قرار داده شده و میزان نیتروژن مشخص گردید (du Preez and Bale, 1989).

$$100 \times \left\{ \frac{\text{وزن نمونه}}{0.014} \times \text{مقدار اسید مصرف شده در} \right.$$

$$\left. \text{تیتراسیون} \right\} = \text{درصد نیتروژن}$$

درصد پروتئین از طریق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$6/25 \times \text{میزان درصد نیتروژن} = \text{درصد پروتئین خام برگ}$$

و عملکرد پروتئین از طریق رابطه زیر به دست آمد:

$$= \text{عملکرد پروتئین برگ}$$

$$\text{عملکرد زیست‌توده برگ} \times \text{درصد پروتئین برگ}$$

یک گرم از ماده گیاهی پس از هضم به روش سوزاندن خشک (سوزاندن با HCl)، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰nm به روش رنگ سنجی وانادات (آمونیم هپتامولیدات به اضافه آمونیم وانادات) برای اندازه‌گیری فسفر برگ، و از دستگاه فلیم فتومتر (مدل Clinical pfp7) به روش نشر شعله‌ای برای اندازه‌گیری پتاسیم 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. بذره‌های 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٪ ظرفیت زراعی) و سیستم کوددهی (شاهد، سوپر فسفات تریپل به میزان ۱۰۰kg/ha، باکتری‌های حل‌کننده فسفات و گونه‌های قارچ میکوریزا *Glomus intraradices*, *G. mosseae*, *G. hoi*) بودند. ظرفیت زراعی خاک مزرعه ۲۵ درصد بود. آبیاری در ۵۰ و ۸۰ درصد ظرفیت 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  
که FC درصد رطوبت خاک در حد ظرفیت زراعی و PWP نقطه پژمردگی دائمی گیاه می‌باشند.

بذره‌های 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 حل‌کننده فسفات) به مقدار ۱۰۰ گرم در هکتار (براساس توصیه شرکت تولیدکننده 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 بذور روی آنها کاشته شدند. کنترل علف‌های هرز، جهت جلوگیری از رقابت آن‌ها با همیشه بهار و ممانعت از هر گونه تداخل علف‌کش‌ها با تیمارهای آزمایشی، به صورت دستی و مداوم در طول فصل رشد انجام گرفت.

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 کلینزاسیون 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 (مجهز به صفحه مدرج) مورد بررسی قرار گرفتند. درصد کلینزاسیون از نسبت تعداد نقاط رنگی از کل نقاط مورد بررسی به دست آمد (Phillips and Hayman, 1970; Giovannetti and Mosse, 1980).

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

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 کلینزاسیون معنی‌دار، اما بر میزان فسفر برگ و پتاسیم برگ غیرمعنی‌دار شد. همچنین تأثیر آبیاری بر درصد کلینزاسیون در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

**نیتروژن برگ:** درصد نیتروژن و پروتئین برگ در شرایط

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 برگ نسبت به سایر تیمارها در آبیاری ۵۰٪ ظرفیت زراعی برتری داشتند. در شرایط آبیاری طبیعی (آبیاری در ۸۰٪ ظرفیت زراعی)، میزان نیتروژن برگ در گیاهان تلقیح شده با گونه *G. hoi* بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱). بنابراین، اهمیت نوع گونه قارچی در مقاومت به تنش کمبود آب قابل توجه می‌باشد. به‌طوری که در شرایط کم‌آبی گونه *G. intraradices* و در شرایط آبیاری مطلوب گونه *G. hoi* در تجمع نیتروژن برتری داشتند. بیشترین عملکرد پروتئین (۱۶۹/۱۷ 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 (۵۶/۵۲ 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. به‌طور کلی، عملکرد پروتئین در گیاهان میکوریزایی بیشتر از سایر تیمارهای منابع کود فسفره بود (شکل ۲).

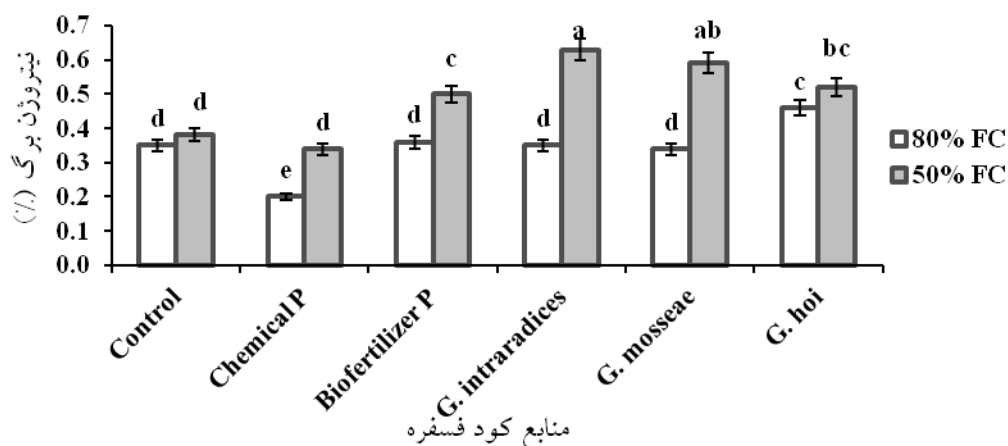
**فسفر برگ:** غلظت فسفر برگ در گیاهان آبیاری شده در ۸۰٪ و ۵۰٪ ظرفیت زراعی به ترتیب ۰/۳۳ و ۰/۳۱ درصد بود که نشان دهنده تفاوت ۲ درصدی برای این تیمارهای آبیاری در فسفر برگ می‌باشد (شکل ۳).

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

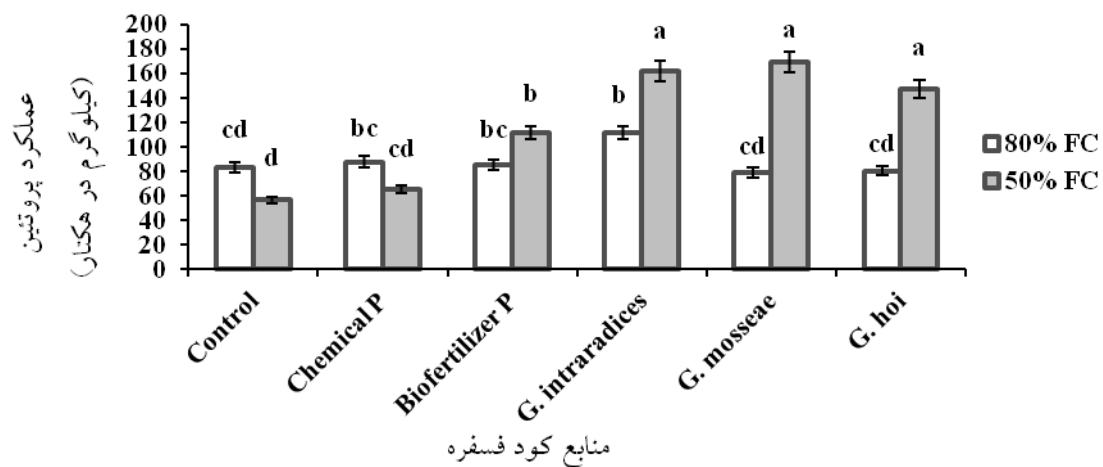
جدول ۲- نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفات مورد بررسی گیاه دارویی همیشه بهار تحت تأثیر منابع مختلف کود فسفره و آبیاری

میانگین مربعات							
منابع تغییر	درجه آزادی	درصد نیتروژن برگ	فسفر برگ	پتاسیم برگ	عملکرد پروتئین	عملکرد زیستی	زیست توده برگ
تکرار	۲	۰/۰۰۴	۰/۳۱۵	۰/۶۴۳*	۴۲۵/۷۰۸	۱۰۱۵۷۸/۶۲	۲۰۷۴۳
آبیاری (A)	۱	۰/۲۰۷**	۰/۴۸۱*	۰/۴۴۹	۸۴۸۸/۲۴۴**	۴۷۴۳۳۵۰**	۴۱۳۰۷۷۷**
نوع کود فسفره (B)	۵	۰/۰۴۴**	۰/۱۰۹	۰/۲۴۱	۴۲۱۰/۶۳۰**	۳۹۸۳۰۶۳**	۲۸۹۲۱۸۹**
A × B	۵	۰/۰۱۵**	۰/۰۷۹	۰/۰۲۰	۳۴۱۰/۱۱۰**	۲۲۷۰۰۴۱**	۵۴۷۴۹۹۹**
اشتباه آزمایشی	۲۲	۰/۰۰۲	۰/۱۱۸	۰/۱۵۶	۲۱۹/۶۱۰	۴۴۴۳۸۰	۱۷۴۰۶۵
ضریب تغییرات (%)		۱۰/۶۲	۱۰/۷۱	۶۳۰	۱۴/۳۳	۵/۰۵	۱۰/۳۸

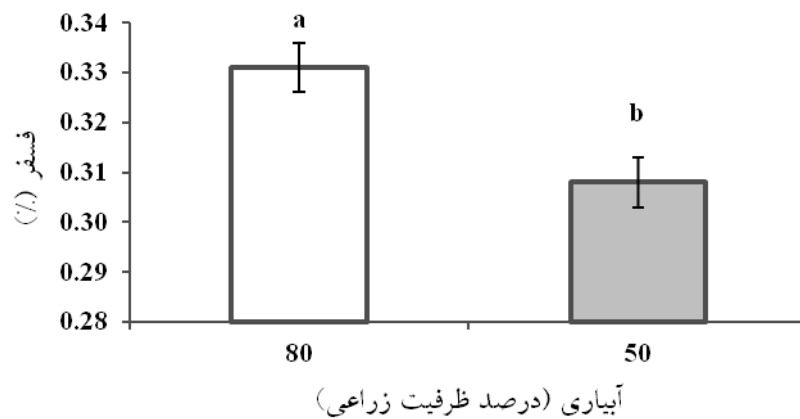
\*\* معنی دار در سطح احتمال ۱٪، \* معنی دار در سطح احتمال ۵٪



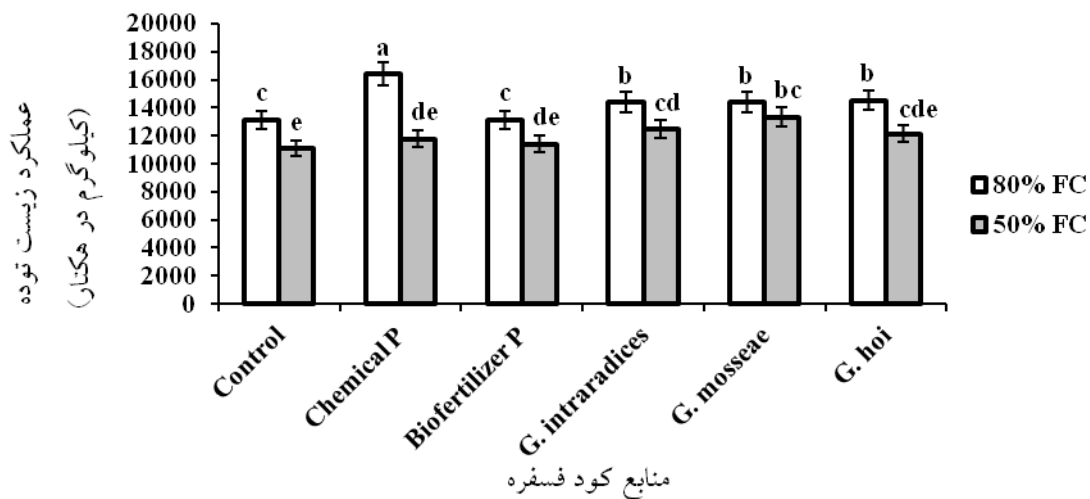
شکل ۱- مقایسه میانگین درصد نیتروژن برگ همیشه بهار تحت تأثیر آبیاری و نوع کود فسفره با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیر مشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباه استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.



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. اشتباه 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 غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباه استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.



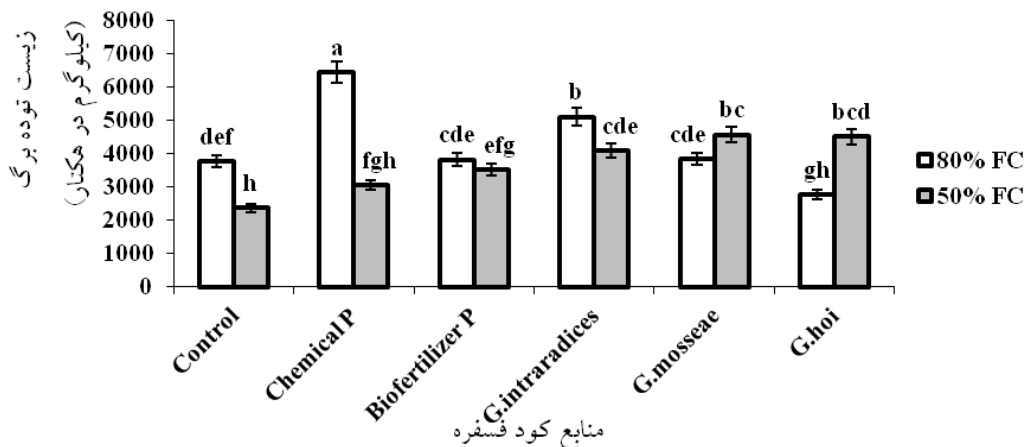
شکل ۴- مقایسه میانگین عملکرد زیستی همیشه بهار تحت تأثیر آبیاری و نوع کود فسفره با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباه استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.

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

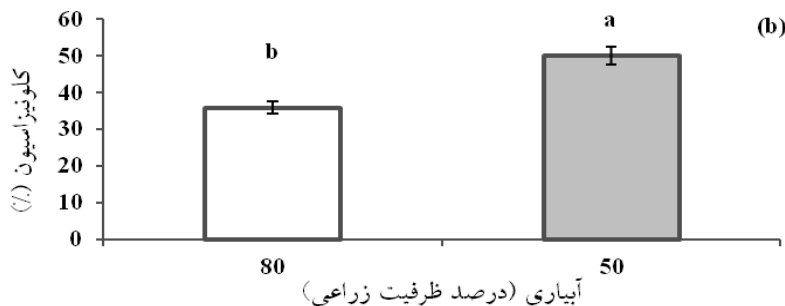
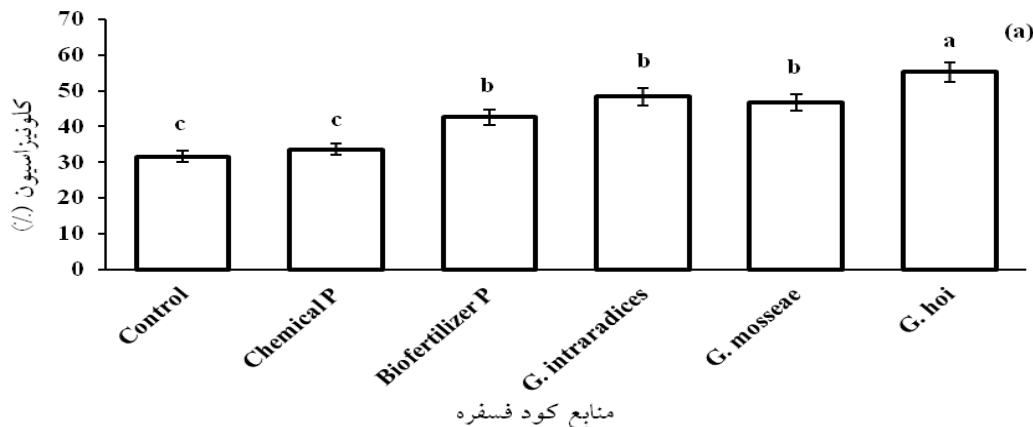
**درصد کلنیزاسیون ریشه:** با اینکه درصد کلنیزاسیون ریشه در گیاهان تیمار شده با گونه های قارچ *G. mosseae* و *G. intraradices* بیشتر از شاهد بود، ولی بالاترین میزان آن (۵۵/۲۹ درصد) در گیاهان تیمار شده با *G. hoi* مشاهده شد. کمترین درصد کلنیزاسیون در تیمار شاهد (۳۱/۵۹ درصد) مشاهده گردید که تفاوت معنی داری 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) کیلوگرم در هکتار) در شرایط آبیاری طبیعی و تیمار فسفره شیمیایی مشاهده گردید. ولی زیست توده برگ در شرایط تنش



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



شکل ۶- مقایسه میانگین درصد کلونیزاسیون ریشه همیشه بهار تحت تأثیر نوع کود فسفره (a) و آبیاری (b) با استفاده از آزمون دانکن. حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد می باشد. اشتباه استانداردها دقت اندازه گیری میانگین ها را نشان می دهند.

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

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

## بحث:

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

بر اساس نتایج مقایسه میانگین ها، 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 می باشد که این حالت در شرایط تنش کمبود آب شدیدتر می باشد. با افزایش میزان آب آبیاری تحرک این عنصر بیشتر شده و در دسترس گیاهان قرار می گیرد. در حالی

که زارعی و همکاران (۱۳۹۳) در آزمایش خود روی گیاه همیشه بهار بیان نمودند که مایه زنی با قارچ میکوریزا آربسکولار سبب افزایش معنی دار نیتروژن، فسفر و پتاسیم نسبت به شاهد گردید. همچنین نشان داده شده است که میزان عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم در برگ های ذرت تحت تنش خشکی با تلقیح قارچ میکوریزا بهبود یافته است (Zhao et al., 2015). اثرات مثبت قارچ های میکوریز در تحرک بخشی به فسفر و جذب آن با مکانیسم های توسعه سطح ریشه، افزایش هدایت هیدرولیکی آب و تسهیل انتقال توده ای فسفر، افزایش تعرق در پتانسیل بالای آب در خاک و کمک به انتشار فسفر، ترشح ترکیبات آلی تعدیل کننده pH و افزایش فعالیت آنزیم پلی فسفات کیناز امکان پذیر می گردد (David et al., 2007). از طرفی باکتری های حل کننده فسفر از طریق مکانیسم هایی آن را از حالت تثبیت شده به فرم قابل استفاده برای گیاه تبدیل می کنند (Rodriguez et al., 2004; Chung et al., 2005). به نظر می رسد در تحقیق حاضر، علت عدم تأثیر فسفر (شیمیایی و زیستی) بر میزان فسفر برگ، بالا بودن فسفر قابل جذب در خاک می باشد (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 سلول ها و همچنین جذب یون ها توسط ریشه گیاهان، دارای دو ویژگی یعنی تجمع و انتخابی بودن می باشد. از طرفی غلظت درونی یون پتاسیم چندین برابر غلظت آن در بیرون سلول های گیاهی می باشد. نسبت تجمع برای یون های پتاسیم و نیترات خیلی بزرگتر از یون های سولفات و سدیم می باشد (Hopkins and Huner, 2008). به نظر می رسد 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 یون های آپوپلاستی و سیم پلاستی *Ctenanthe setosa* گزارش کردند که تحت تنش خشکی غلظت یون پتاسیم آپوپلاست و سیم پلاست کاهش می یابد. نتایج رضوانی و همکاران (۱۳۸۸) نشان داد که میکوریزا تأثیری روی جذب پتاسیم به وسیله گیاه یونجه نداشت.



باکتری‌های حل کننده فسفر می‌تواند این تلقیح را تقویت نماید. بالا بودن عملکرد زیست توده (زیست توده کل و زیست توده برگ) در شرایط طبیعی آبیاری و بدون تنش می‌تواند ناشی از تحرک و در دسترس بودن عناصر غذایی از جمله فسفر باشد که در شرایط کمبود آب این عنصر تثبیت 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 فتوسنتزی گیاه، تثبیت CO<sub>2</sub> و سطح برگ تولیدی گیاه افزایش می‌یابد (رضوانی و همکاران، ۱۳۸۸).

### نتیجه گیری کلی:

به طور کلی تجمع نیتروژن در اندام‌های هوایی گیاه همیشه بهار در شرایط تنش 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 (زیست توده اندام‌های هوایی و زیست توده برگ) در گیاهان تیمار شده با کود سوپر فسفات تریپل به دست آمد. عملکرد زیستی گیاهان آبیاری شده در ۸۰٪ ظرفیت زراعی ۱۶ درصد، و زیست توده برگ ۱۴ درصد بیشتر از شرایط تنش بود. میزان فسفر برگ همیشه بهار 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 تنش) 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 بسترهای مختلف و رفتارهای متفاوت گیاهان تحت تنش خشکی باشد (Gholamhoseini et al., 2013). در حالی که Birhane و همکاران (۲۰۱۴)، Zhao و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که با افزایش شدت خشکی میزان کلونیزاسیون ریشه افزایش می‌یابد، ولی در مقابل El-Mesbahi و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که تنش خشکی میزان کلونیزاسیون را کاهش می‌دهد. در صورتی که میزان فسفر خاک بالا باشد، آلودگی ریشه گیاه به میکوریز کاهش می‌یابد (Norris et al., 1994). تیمار کودی سوپرفسفات 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:

- اسمعیل‌نژاد خیایوی، ن. و خارا، ج. (۱۳۹۳) تأثیر قارچ میکوریز آربوسکولار *Glomus etunicatum* بر روی رشد و برخی پارامترهای فیزیولوژیک در گیاه کدوی خورشیدی تحت سمیت علفکش متری بوزین. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست شناسی 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 نعنای سبز. مجله فرآیند و کارکرد گیاهی ۴: ۱۳-۲۴.
- حبیب‌زاده، زردشتی، م. ر.، پیرزاد، ع. و جلیلیان، ج. (۱۳۹۱) اثر قارچ ریشه‌های آربوسکولار بر شاخص‌های رشد و عملکرد دانه ماش تحت تنش کم آبی (*Vigna radiata* (L.) Wilczk). مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، علوم آب و خاک ۶۰: ۶۹-

رضوانی، م.، اردکانی، م.، ر.، رجالی، ف.، نورمحمدی، ق.، زعفریان، ف. و تیموریان، س. (۱۳۸۸) تأثیر سویه‌های مختلف فارچهای میکوریزا روی ویژگی‌های ریشه و غلظت فسفر، پتاسیم، روی و آهن یونجه (*Medicago sativa* L.). مجله دانش نوین کشاورزی ۱۵: ۶۶-۵۵.

زارعی، م.، مریخی، م. و سحرخیز، م. ج. (۱۳۹۳) اثر فارچ 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، ۴۴۴ 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 CO<sub>2</sub> 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., Amirikian, 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.

