اثر توأم قارچ و باکتری بر افزایش اسمولیت‌های سازگاری در یونجه تحت تنش کم‌آبی

مهناز ظفری*، علی عبادی و سدابه جهانبخش گده کهریز

اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۸/۳

چکیده

اثر تلقیح قارچ و باکتری در مقاومت به تنش کم‌آبی در یونجه در آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۰ بررسی شد. تنش کم‌آبی در سطوح ۳۵٪، ۵۵٪ و ۷۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای اعمال شد. تیمارهای تلقیح شامل تلقیح بذر با میکوریزا گونه موسه‌آ، باکتری همزیست یونجه، موسه‌آ + باکتری همزیست یونجه و شاهد بودند. نتایج نشان داد که با افزایش تنش در تیمارها غلظت سدیم، پرولین و قندهای محلول افزایش یافت، اما غلظت پتاسیم، فسفر، سطح برگ و هدایت روزنه کاهش یافت. بین تیمارهای تلقیحی پتاسیم، فسفر، پرولین، قندهای محلول، هدایت روزنه و سطح برگ به‌ترتیب با بیشترین مقادیر (۶/۷۲، ۵/۰۷، ۷/۱۴، ۶/۰۵، ۲۸، ۲۰/۶۶) به تلقیح دوگانه و کمترین مقادیر (۶/۱۳، ۲/۹، ۴/۷۷، ۴/۷۳، ۱۵ و ۵/۳۳) به شاهد در سطح تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی تعلق گرفت. بعد از تلقیح دوگانه تیمار تلقیحی میکوریز نسبت به تلقیحی باکتری همزیست بیشتر بود. اما سدیم با کمترین مقدار (۲/۵۳) به تلقیح دوگانه و بیشترین مقدار (۳/۰۸) به شاهد در سطح تنش ۳۵ درصد ظرفیت زراعی مربوط بود. تلقیح دوگانه با افزایش جذب آب، عناصر غذایی و اسمولیت‌های سازگاری توانست مقاومت گیاه را در برابر کم‌آبی بهبود بخشد. با توجه به اینکه امروز مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی مشکلاتی ازجمله آلودگی خاک و محیط‌زیست و افزایش نهاده‌های شیمیایی به وجود آورده است. از این‌رو استفاده از منابع بیولوژیک می‌تواند از جنبه‌های مختلف اقتصادی و زیست محیطی مفید بوده و جایگزین مناسبی برای نهاده‌های شیمیایی باشد.

واژه‌های کلیدی: گلوموس موسه‌آ، سینوریزوبیوم ملیلوتی، تنش کم‌آبی، اسمولیت‌های‌های سازگاری

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۲۸۵۲۷۹۶ ، پست الکترونیکی: mahnaz.zafari@yahoo.com

مقدمه

خشکی با ایجاد تنش کمبود عناصر غذایی در گیاه از طریق اختلال در روند جذب و تجمع عناصر غذایی باعث کاهش عملکرد گیاه می‌شود (۲). از آنجایی که توسعه و رشد سلول به پتانسیل تورگر بستگی دارد، تنش کم‌آبی با کاهش پتانسیل تورگر تغییراتی را در گیاه ایجاد می‌کند که در اثر کمبود آماس، رشد سلول‌ها کاهش و اندازه آنها کوچکتر می‌ماند (۲۵). در شرایط تنش، روزنه‌ها به منظور کاهش تلفات آب بسته می‌شوند. بسته شدن جزیی یا کامل آنها از طریق تجمع ABA در آپوپلاست سلولهای محافظ روزنه صورت می‌گیرد. به هر حال بسته شدن طولانی مدت روزنه‌ها برای گیاه مضر است، زیرا CO_2 لازم برای فتوسنتز فراهم نمی‌شود. در واقع بسته شدن کامل روزنه‌ها آخرین واکنش گیاه به منظور جلوگیری از مرگ سلولها در اثر خشکی است (۲۸). کاهش نفوذ دی‌اکسیدکربن، اکسیده شدن دوباره $NADP^+$ را توسط چرخهٔ کالوین کاهش می‌دهد (۳۰)، در نتیجه با افزایش انتقال الکترون به مولکول اکسیژن، موجب تولید گونه‌های اکسیژن فعال مانند رادیکال سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و اکسیژن منفرد می‌شود (۱۱)، بنابراین یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر تنش کم‌آبی، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن

فعال در اجزای مختلف سلولی است (۱۲). به دلیل اینکه تنش کم‌آبی با شروع یک تنش اکسایشی همراه است، بنابراین در شرایط کم‌آبی تولید و ذخیره گونه‌های سمی و مخرب اکسیژن آزاد افزایش می‌یابد (۱۸). در شرایط کم-آبی، گیاهان با تولید و ذخیره اسمولیت‌ها (مانند اسیدهای آمینه، قندها، برخی از یون‌های معدنی، هورمون‌ها و پروتئین‌ها) با تنش مقابله می‌کنند. از بین ترکیب‌های آلی، اسیدآمینه پرولین یکی از مهمترین تنظیم‌کننده‌های اسمزی است (۸). اگرچه پرولین در همه اندام‌های گیاه کامل در طی تنش کم‌آبی تجمع می‌یابد ولی سریع‌ترین انباشت را در برگ‌ها نشان می‌دهد (۳). قندهای محلول دسته دیگری از تنظیم کننده‌های اسمزی می‌باشند که در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابند. تعیین میزان قندهای محلول نیز روشی مفید در انتخاب گونه‌های مقاوم به خشکی است (۲۶). در مجموع افزایش قندهای محلول در طی تنش کم-آبی (به‌ویژه تنش شدید) می‌تواند به دلایل زیر باشد: ۱- تخریب کربوهیدرات‌های نامحلول که منجر به افزایش قند-های محلول می‌شود، ۲- سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیرفتوسنتزی و ۳- متوقف شدن رشد (۱۷). استفاده از پتانسیل میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی در برقراری روابط همزیستی با گیاهان، نقش مؤثری در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی دارند (۲۳). یکی دیگر از محققان برای اولین بار به آثار مثبت رابطه همزیستی میکوریزایی بر افزایش رشد گیاهان لگوم تلقیح شده با قارچ میکوریزا و باکتری ریزوبیوم اشاره نمود، سپس در سال ۱۹۵۷ محقق دیگری نشان داد که همزیستی میکوریزایی دارای اثر افزاینده‌ای بر جذب عناصر غذایی دارد (۳۱).

مواد و روشها

اثر کودهای بیولوژیک در افزایش تحمل گیاه یونجه به تنش کم‌آبی در آزمایشی به صورت فاکتوریل ۴×۳ در قالب طرح پایه بلوک‌های کاملا" تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۰ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی در شرایط خاک سترون شده مطالعه شد. برای از بین بردن جمعیت قارچ‌های میکوریز بومی و سایر میکروارگانیسم‌های بومی موجود در خاک اقدام به استریل کردن خاک در اتوکلاو شد. ظرفیت زراعی خاک به روش وزنی تعیین شد و تنش خشکی در سه سطح ۳۵٪ ، ۵۵ ٪ و ۷۵٪ ظرفیت زراعی اعمال گردید. تیمارها شامل تلقیح بذرهای یونجه با میکوریزا، سینوریزوبیوم ملیلوتی، سینوریزوبیوم ملیلوتی + میکوریزا (تلقیح دوگانه) و شاهد (عدم تلقیح) بودند.

برای اندازه‌گیری پرولین از برگ‌های کاملا توسعه یافته انتهایی استفاده شد. نیم گرم برگ را با استفاده از ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد در هاون چینی کوبیده و قسمت بالایی محلول جدا گردید. عمل استخراج دو بار دیگر و هر بار با ۵ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد تکرار شد. محلول بدست آمده ده دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای تعیین غلظت پرولین یک میلی‌لیتر از عصاره الکل بدست آمده با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر رقیق شده و ۵ میلی لیتر معرف نین‌هیدرین به آن افزوده شد (۱۲۵ میلی‌گرم نین هیدرین+ ۲ میلی‌لیتر اسید فسفریک ۶ مولار+ ۳ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال). سپس ۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آنها افزوده و هم زده شد. نمونه‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از خارج کردن نمونه‌ها از حمام آب جوش و رسیدن آنها به دمای محیط آزمایشگاه، ۱۰ میلی لیتر بنزن به آنها افزوده و با همزن مکانیکی مخلوط شدند تا پرولین وارد فاز بنزن شود .نمونه‌ها ۳۰ دقیقه به حال سکون رها شده و میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ نانومتر اندازه گیری شده و منحنی کالیبراسیون با استفاده از استاندارد ال-پرولین تهیه شد. استخراج کربوهیدرات‌های محلول مشابه پرولین بود. ۰/۱ میلی لیتر عصاره الکلی با ۳ میلی لیتر آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون + ۱۰۰ میلی لیتر سولفوریک اسید ۷۲٪) مخلوط گردید. این محلول ده

دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد تا واکنش انجام و رنگی شود. سپس میزان جذب آن با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر قرائت و مقدار قندهای محلول محاسبه شد (۱۹). برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم، مقدار یک گرم از اندام هوایی خشک در داخل بوته چینی ریخته شد و در کوره الکتریکی در دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از این مدت بر روی هر نمونه خاکستر ۱۰ میلی لیتر از اسید کلریدریک ۲ نرمال افزوده و تا نقطه جوش حرارت داده شد. سپس نمونه داخل بالن ۱۰۰ میلی‌لیتر صاف و با آب مقطر به حجم رسانده شد. برای تعیین میزان پتاسیم مقدار ۱/۹۰ گرم کربنات پتاسیم توزین و در داخل بالن ۱ لیتری به حجم رسانده شد تا محلولppm ۱۰۰۰ از کلرید پتاسیم به‌دست آید. از این محلول استاندارد مقادیر ۰/۵، ۱/۲۵، ۲/۵ ، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌لیتر برداشته و داخل بالن ۱۰۰ میلی لیتر با آب مقطر به حجم رسانده شد. برای تعیین محلول‌های استاندارد سدیم نیز از ۲/۵۴ گرم کلرور سدیم به همین ترتیب استفاده شد. از دستگاه طیف‌سنج شعله‌ای برای اندازه‌گیری غلظت عناصر استفاده شد. از استانداردهای ۰/۵، ۱/۲۵، ۲/۵ ، ۵، ۷/۵ و ۱۰ ppm برای ترسیم منحنی استاندارد استفاده گردید. برای اندازه‌گیری فسفر، ابتدا نمونه ها را ریز کرده و در آون در دمای ۵۵ درجه گذاشته تا خشک شوند، سپس نمونه‌ها را کاملاً پودر کرده و یک گرم از پودر نمونه‌ها را درون بوته‌ی چینی ریخته و در کوره‌ی الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۲ ساعت قرار داده تا خاکستر شوند. سپس غلظت فسفر به روش جونز (۲۱) در طول موج ۵۵۰ نانومتر محاسبه شد. سطح برگ با دستگاه سطح برگ سنج مدل ADC اندازه گیری شد. هدایت روزنه‌ای با استفاده از دستگاه پرومتر مدل Leaf Porometer SC-1 اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که با قراردادن قسمت میانی جوانترین برگ کاملا توسعه یافته در داخل سنسور دستگاه اعداد مربوط به میزان مقاومت روزنه بر حسب m^2s/mol قرائت گردید.

داده‌ها با نرم افزار SAS ورژن ۹ آنالیز و میانگین‌ها به روش LSD مقایسه شدند. ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار EXCEL انجام گردید.

نتایج

بر اساس نتایج تجزیه واریانس بین کم‌آبی و تلقیح بذر اثر متقابل معنی‌داری در تمامی صفات مورد بررسی وجود داشت (جدول۱، ۱٪= α).

خلاصه تجزیه واریانس اثر تیمار و تنش کم آبی در برخی صفات یونجه

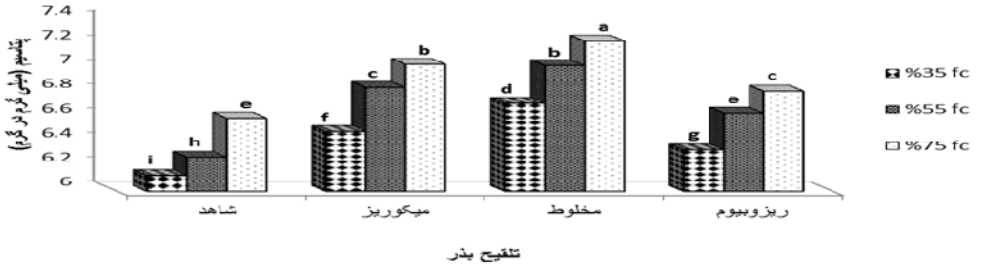
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		پتاسیم	فسفر	سدیم	پرولین	قندهای محلول	هدایت روزنه	سطح برگ
تکرار	۲	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۸۵	۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	۰/۰۰۸۳	۰/۶۴	۳/۴۴
تیمار	۳	۰/۷**	۱۲/۲۳**	۰/۵۹**	۱۳/۱۶**	۱/۸۸**	۷۵۹/۸۹**	۶۸۶/۴۷**
خشکی	۲	۰/۷۶**	۴/۰۵**	۰/۶۱**	۲۱/۶۲**	۱۶/۱۸**	۱۵۷۷/۱۰۳**	۹۱۹/۵۳**
تیمار × خشکی	۶	۰/۳۳**	۴/۱۳**	۰/۲۷**	۷/۸۱**	۳/۶**	۴۹۷/۷۱**	۳۶۰/۹۳**
خطای آزمایش	۲۲	۰/۰۰۰۷	۰/۰۰۰۳۴	۰/۰۰۰۴۶	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۲۳	۲/۷۷
ضریب تغییرات	–	۳/۷۱	۰/۴۱	۰/۸۳	۰/۷۵	۰/۸۱	۱/۲۰	۷/۳۶

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

پتاسیم، سدیم، فسفر: در این بررسی مقدار جذب پتاسیم با افزایش شدت تنش (FC ۳۵٪) کاهش یافت (شکل ۱)، در حالیکه غلظت سدیم افزایش پیدا کرد (شکل۲). در بین تیمارهای تلقیحی تلقیح دوگانه بیشترین جذب پتاسیم و کمترین جذب سدیم را داشت. پتاسیم و سدیم در گیاه

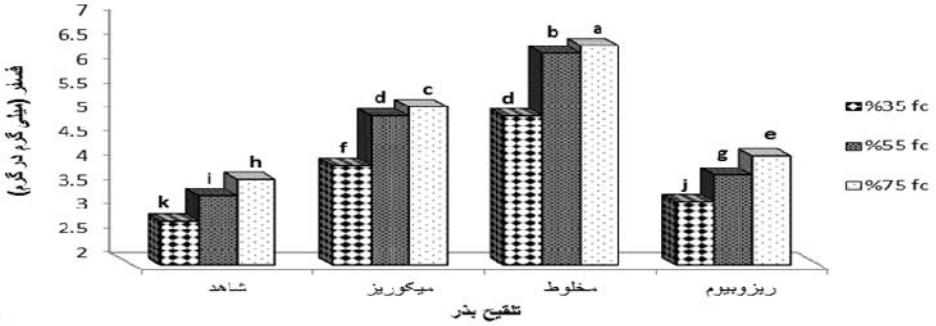
رقیب یکدیگر هستند و با افزایش یکی دیگری کاهش می‌یابد.

در نمودار غلظت فسفر (شکل۳) همانند پتاسیم شاهد افزایش میزان غلظت فسفر با افزایش رطوبت هستیم. اما در این نمودار اختلاف سطوح ۵۵٪ و ۷۵٪ شاهد نه تنها اختلاف بارزی با سطوح ۵۵٪ و ۷۵٪ بقیه تیمارها ندارد بلکه با اختلاف سطح ۳۵٪ و ۵۵٪ خودش اختلاف بسیار ناچیز دارد و این نشان می‌دهد که میزان غلظت فسفر به اندازه پتاسیم تابع رطوبت نیست و شاید عوامل دیگری نیز در میزان جذب آن مؤثر است که در تیمارهای تلقیحی میکوریز و تلقیح دوگانه به وضوح به چشم می‌خورد.



شکل ۱- مقایسه میانگین ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی در پتاسیم

شکل ۲- مقایسه میانگین ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی در سدیم

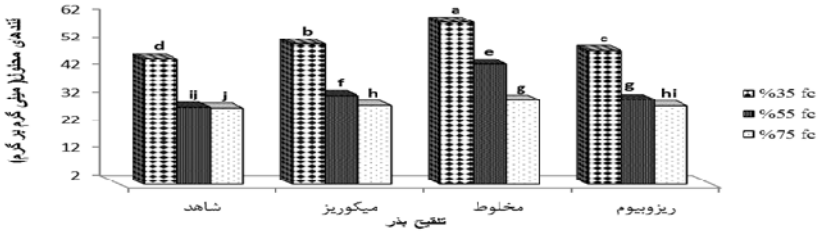


شکل۳-مقایسه میانگین ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی در فسفر

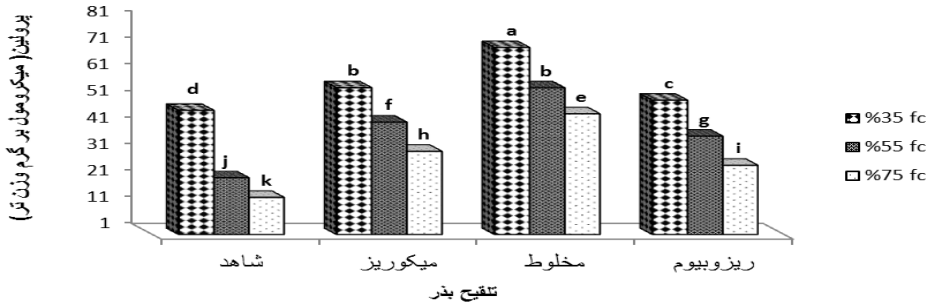
اسمولیت‌های سازگاری: با افزایش شدت کم‌آبی میزان تولید اسمولیت‌های سازگاری قندهای محلول و پرولین افزایش یافت و بیشترین و کمترین میزان تولید آنها به‌ترتیب به تلقیح دوگانه و شاهد تعلق داشت. در هر دو نمودار (۴ و ۵) مشاهده می‌شود که تیمارهای تلقیح به‌ویژه تلقیح دوگانه با هر کاهش در میزان دسترسی به آب واکنش نشان داده و بر میزان تولید اسمولیت‌های سازگاری افزوده است، در حالیکه تیمار شاهد در بین سطوح تنش تنها در

۳۵fc٪ بیشترین میزان اسمولیت‌ها را داشت. در واقع در مقایسه با بقیه تیمارها میزان اختلاف سطوح ۳۵٪ و ۵۵٪ بسیار زیاد بود. با مقایسه این دو نمودار چنین به نظر می‌رسد که میزان تولید پرولین به تولید قندهای محلول ارتباط دارد و با افزایش تنش میزان تولید پرولین بر قندهای محلول پیشی گرفته است، یا به‌عبارت دیگر در شرایط تنش حساسیت گیاه به افزایش تولید پرولین بیشتر از قند-های محلول است، به‌طوری‌که قمری‌زارع و همکاران (۷) نیز به نتایج مشابهی رسیده‌اند.

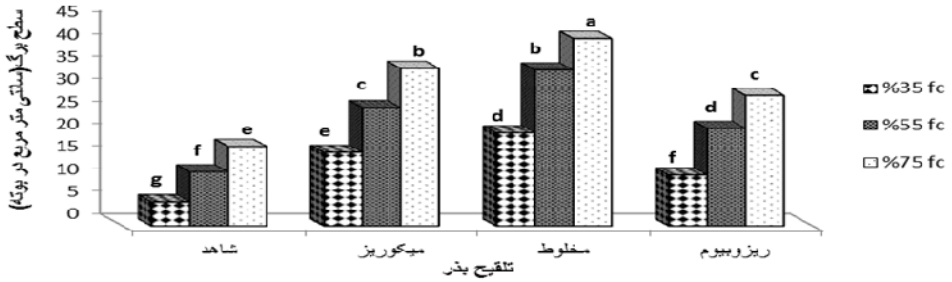
سطح برگ : در شکل ۶ مشاهده می‌شود که با افزایش شدت تنش کم‌آبی میزان سطح برگ به شدت کاهش یافته و اختلاف معنی‌داری باهم دارند. در سطوح تلقیحی تیمار میکوریز با اختلاف معنی‌دار نسبت به تلقیح با باکتری سطح برگ بیشتری در هر سه سطح تنش داشت و بیشترین میزان سطح برگ در هر سه سطح تنش به تلقیح دوگانه تعلق داشت.



شکل ۴- مقایسه میانگین ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی بر قندهای محلول



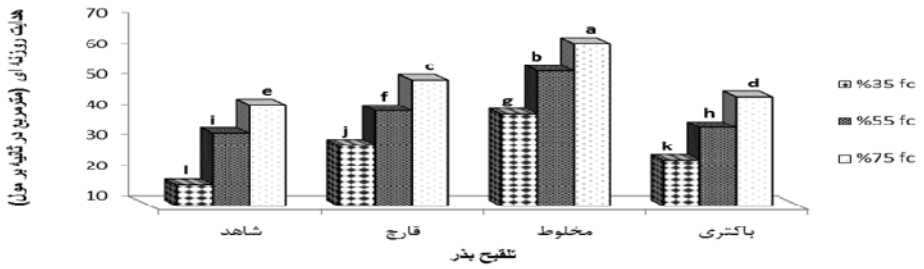
شکل ۵- مقایسه میانگین ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی بر پرولین



شکل ۶- مقایسه میانگین ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی بر سطح برگ

هدایت روزنه‌ای: با افزایش شدت کم‌آبی افزایش یافته است. اگر این نمودار را با نمودارهای فسفر و پتاسیم مقایسه کنیم شاهد همبستگی مثبت بین آنها خواهیم بود که با کاهش فسفر و پتاسیم، هدایت روزنه‌ای نیز کاهش یافته است و بیشترین میزان به تلقیح دوگانه تعلق داشت. در بین تلقیح های انفرادی هدایت روزنه در میکوریز بیشتر از

تلقیح با باکتری بود (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه میانگین ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی بر هدایت روزنه‌ای

بحث

پتاسیم، سدیم، فسفر: تنش عناصر غذایی زمانی رخ می‌دهد که میزان عناصر پایین‌تر (کمبود) یا بالاتر (سمیت) از حد مورد نیاز گیاه باشد. این حالت ممکن است ناشی از کم تحرکی عناصر غذایی در خاک در اثر تنش کم آبی باشد که منجر به کاهش جریان توده‌ای آب و اختلال در جذب عناصر غذایی می‌شود. به چنین دلایلی گراهام و همکاران (۱۶) نیز در یافته‌های خود اشاره کرده‌اند. کاهش پتاسیم در تنش کم‌آبی در پژوهش آرزمجو و همکاران (۱۰) نیز اشاره شده است. مقایسه دو نمودار غلظت پتاسیم و سدیم در گیاه نشان می‌دهد که با کاهش غلظت پتاسیم، غلظت سدیم افزایش یافته و نقش پتاسیم را به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی بر عهده گرفته است. نتایج مشابه این پژوهش توسط لودلاو (۲۱) نیز گزارش شده است. پتاسیم عمدتا در گیاهان به‌عنوان تنظیم‌کننده اسمزی اهمیت دارد و می‌تواند تا ۵۰ درصد در پتانسیل اسمزی برگ‌ها نقش داشته باشد (۳۲). سدیم و پتاسیم به‌عنوان رقیب عمل کرده و افزایش یکی باعث کاهش دیگری است، بنابراین در تیمارهای تلقیحی میکروارگانیسم‌ها با افزایش غلظت پتاسیم منجر به کاهش غلظت سدیم می‌شوند. کاهش غلظت سدیم توسط باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی در پژوهش (۶) نیز مشاهده شده است. ردی و همکاران (۲۹) نیز گزارش کرده‌اند که یونهای سدیم و پتاسیم جزء تنظیم‌کننده‌های اسمزی می‌باشند.

ممکن است افزایش جذب فسفر در تیمارهای حاوی میکوریز به وجود هیف‌ها مربوط باشد که باکتری‌ها از آن بی‌بهره‌اند. هیف قارچ‌های میکوریز برای نفوذ به ریشه گیاهان آنزیم‌هایی را ترشح می‌کنند که باعث سستی دیواره سلولی گیاهان می‌شود این سستی دیواره نفوذ باکتری ریزوبیوم را که برای نفوذ به دیواره ریشه گیاهان نیازمند آنزیم پکتیناز و سایر آنزیم‌های تسهیل کننده دیواره سلولی است، تسهیل می‌کند (۹).

اسمولیت‌های سازگاری: از آنجایی‌که یکی از مسیرهای تولید پرولین گلوتامات می‌باشد ممکن است با افزایش تولید قندهای محلول میزان تولید گلوتامات افزایش یافته و سنتز پرولین تشدید شود، در نتیجه قندهای محلول کاهش یابد. چنانچه ایریگوئن و همکاران (۱۹) نیز در یونجه تشدید بیوسنتز اسیدآمینه پرولین در شرایط تنش شدید را ناشی از تأمین اسمولیت α-گلوتارات توسط مصرف قندها گزارش کرده‌اند. در این پژوهش ما شاهد افزایش پرولین با کاهش پتاسیم و افزایش سدیم بودیم که احتمالا ناشی از تخریب پروتئین‌ها و آزاد شدن اسیدآمینه‌ها در اثر کاهش جذب پتاسیم می‌باشد که موجب تولید اسیدآمینه پرولین می‌شود، این نشان می‌دهد که بین پتاسیم و پرولین ارتباط مثبت بیشتری برقرار است شاید دلیل آن، این باشد که هر دو به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های اسمزی هستند و در غیاب یکی از آنها دیگری نقشش را ایفا می‌کند. ممکن است دلیل دیگر افزایش پرولین به دلیل کاهش اثرات نامناسب سدیم در گیاه باشد که موجب بسته شدن روزنه‌ها می‌شود، لذا با

افزایش جذب سدیم، پرولین نیز افزایش می‌یابد و به‌نوعی یک حالت رقابتی بین سدیم و پرولین برای جایگزینی پتاسیم وجود دارد. بر اساس نتایج پژوهش (۱۴)، پتاسیم نقش زیادی در سنتز پروتئین دارد. (۱۵) نیز از دلایل تجمع پرولین در شرایط تنش، به تخریب پروتیین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت تنظیم اسمزی سلول اشاره کرده‌اند. افزایش پرولین طی تنش خشکی در گیاه به‌لیمو توسط (۹) گزارش شده است. همچنین (۲۷) گزارش کردند که میزان قندهای محلول برگ با اعمال تنش کم‌آبی افزایش، اما نشاسته کاهش یافت. افزایش تولید پرولین و قندهای محلول در تیمارهای تلقیح نسبت به شاهد به احتمال بسیار قوی به افزایش جذب عناصر غذایی ازجمله عناصر کم‌مصرف و عنصر ضروری نیتروژن مربوط باشد که در تلقیح دوگانه به دلیل اثر سینرژیستی میکوریز و باکتری میزان جذب نسبت به حالت انفرادی بیشتر بود. به نظر (۲۲) پرولین و قندهای محلول دارای ساختار نیتروژنی هستند. از این‌رو استفاده از نیتروژن می‌تواند تا حد زیادی سبب افزایش مقدار آنها در گیاه شود. همین طور در یافته-های (۱) مشخص شد که بیشترین میزان پرولین و قندهای محلول در حضور عناصر روی، آهن و منگنز به‌دست آمد. افزایش جذب عناصر ماکرو و میکرو در اثر تلقیح دوگانه (میکوریز و ریزوبیوم) در یافته‌های (۳۲) اشاره شده است. کاهش میزان پتاسیم و بالا رفتن مقدار سدیم، کربوهیدرات-های محلول و پرولین برگ در اثر تشدید تنش در پژوهش-های (۱۰) نیز گزارش شده است. افزایش مقادیر پرولین، قندهای محلول و پتاسیم و نیز کاهش سدیم در اثر تلقیح دوگانه در پژوهش (۳۲) هم گزارش شده است.

سطح برگ: اولین دلیل کاهش سطح برگ مربوط به کاهش پتانسیل تورگر و در نتیجه کاهش آماس و کاهش تقسیم سلولی است. رشد سلولهای اندام‌های هوایی به کاهش ψ_p حساسیت بیشتری نسبت به ریشه دارند، زیرا ψ_p آستانه عملکرد در سلول‌های برگ بسیار بزرگتر از آن در ریشه است، بدین دلیل با هر کاهش در ψ_p رشد سلول‌های اندام هوایی به سرعت متوقف می‌شود. از سوی دیگر همانطور که ذکر شد تنش کم‌آبی منجر به کاهش جذب عناصر غذایی می‌شود. به‌طوری‌که در تیمارهای حاوی میکوریز به دلیل وجود شبکه گسترده هیف‌ها و جذب آب و افزایش جذب عناصر غذایی سطح برگ نسبت به تیمارهای ریزوبیوم که نسبت به میکوریز در جذب عناصر غذایی ضعیف است و شاهد که در جذب آب و عناصر بسیار ضعیف و ناچیز عمل می‌کند در هر سه سطح تنش بیشترین سطح برگ را به خود اختصاص داده‌اند. دزولکس و همکاران (۱۳) نیز کاهش سطح برگ را ناشی از کاهش آماس و تقسیم سلولی می‌دانند. در بین عناصر مورد مطالعه در این پژوهش عنصر فسفر و پتاسیم همبستگی مثبتی با سطح برگ داشت. فسفر ازجمله عناصر کلیدی گیاه در نقل و انتقالات انرژی در فرایندهای متابولیک گیاه، تقسیم سلولی، ساختمان فسفولیپیدهای دیواره سلولی، رشد و تکامل ریشه‌ها شرکت می‌کند (۲۲). افزایش سطح برگ در حظور نیتروژن، فسفر و پتاسیم در یافته‌های (۴) نیز گزارش شده است. بنابراین در حضور فسفر تقسیم سلولی افزایش یافته و تعداد سلول و سطح برگ بیشتر می‌شود. بیشترین مقادیر سطح برگ در شرایط تنش در گیاهان تلقیح شده با میکوریز در یافته‌های (۲۴) نیز دیده شده است.

هدایت روزنه‌ای: همانطور که اشاره شد فسفر در نقل و انتقال انرژی نقش دارد و پتاسیم نقش کلیدی در باز شدن روزنه بازی می‌کند و برای ورود پتاسیم به سلول‌های محافظ گارد روزنه حضور فسفر الزامیست، زیرا پمپ‌های غشاء دیواره سلول‌های روزنه برای انتقال فعال پتاسیم به درون سیتوپلاسم سلول‌های محافظ روزنه نیاز به منبع انرژی دارند و این منبع از فسفر تأمین می‌شود. علاوه بر اینها، نمودار هدایت روزنه با نمودار سطح برگ نیز رابطه متقابل مثبت دارد و با افزایش سطح برگ و در نتیجه افزایش تعداد روزنه‌ها از مقاومت روزنه‌ای کاسته شده و باعث افزایش ورود دی‌اکسیدکربن می‌گردد. با افزایش

تثبیت دی اکسید کربن نسبت $NADPH/NADP^+$ در سیتوپلاسم سلول کاهش یافته و متعاقب آن از پدیده بازدارندگی نوری نیز ممانعت می‌شود. تروگتون (۳۴) نیز چنین بیان کرده است که مقدار کم پتاسیم، هدایت روزنه‌ای برای CO_2 را بیشتر از هدایت‌های درونی کاهش می‌دهد، زیرا پتاسیم از طریق سلولهای محافظ از دست می‌رود. کاهش هدایت روزنه‌ای در شرایط خشکی در پژوهش (۵) نیز گزارش شده است. بنابراین تیمارهای تلقیحی با افزایش جذب عناصر و افزایش سطح برگ باعث افزایش هدایت روزنه می‌شود و این میزان جذب در تلقیح دوگانه به دلیل اثر سینرژیستی میکوریز و ریزوبیوم بر همدیگر بیشتر از میکوریز و ریزوبیوم در حالت انفرادی بود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش مشخص شد که تنش کم‌آبی عمده تأثیر خود را از طریق تنش عناصر غذایی بر صفات فیزیولوژیک گیاه برجای می‌گذارد و بهترین تیمار برای مبارزه با تنش کم‌آبی و عناصر غذایی در یونجه، تلقیح بذرها با گلوموس موسهآ و سینوریزوبیوم ملیلوتی به حالت تلقیح دوگانه می‌باشد. نتیجه دیگر این بود با اینکه سینوریزوبیوم ملیلوتی باکتری همزیست یونجه است اما قارچ میکوریز، سویه موسهآ در حالت تلقیح انفرادی نسبت به تلقیح انفرادی باکتری ارجحیت داشت. بنابراین لازم به ذکر است در این آزمایش به دلیل استرلیزه کردن خاک هیچ‌گونه میکروارگانیسم بومی دیگری حضور نداشت.

منابع

۱- بابائیان، م .م .حیدری و ا .قنبری .۱۳۸۹ . اثر تنش خشکی و محلول پاشی عناصر کم مصرف بر ویژگی های فیزیولوژیک و جذب عناصر غذایی در آفتابگردان(*Helianthus* annus L.) مجله علوم زراعی ایران . ۱۲(۴) ۳۹۱-۳۷۷.

۲- چوگان، ر .۱۳۸۳ . اصلاح ذرت برای تحمل به تنش خشکی و نیتروژن .تالیف .بنزیگر .م.، ج .امادمیدز، دبک رمم، بلون . انتشارات وزارت جهاد کشاورزی. ۹۵ صفحه.

۳- حیدری شریف آباد، ح. ۱۳۷۹. گیاه، خشکی و خشکسالی. چاپ اول، انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها ومراتع کشور، تهران، ۱۶۳ صفحه.

۴- راهداری، پ.، مظفری، ا.، پناهی، ب. ۱۳۹۱. بررسی اثر محلول پاشی اسید آمینه های آزاد بر برخی ویژگیهای کیفی و کمی پسته(*Pistachia vera* L.) رقم فندقی. مجله زیست شناسی ایران. جلد ۲۵. شماره ۴. ص ۶۰۶-۶۱۷.

۵- صنایعی، س.۱۳۹۰. تاثیر نیتروژن معدنی بر رشد و کارایی مصرف نیتروژن در یونجه تحت شرایط خشکی. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت، دانشگاه محقق اردبیلی، ص ۷۶-۷۷.

۶- عموآقایی، ر.، نیک اندیش، ف.۱۳۹۴. اثر تلقیح ریشه دو رقم یونجه (Medicago sativa) با جدایه هایی از گونه های سینوریزوبیوم و باسیلوس بر رشد، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای سلول در شرایط تنش شوری. مجله پژوهشهای گیاهی (انجمن زیست شناسی ایران). جلد ۲۸، شماره ۱، صفحه ۱۵۲-۱۴۰.

۷- قمری زارع، ع.، رضوانی، س.، فروتن، م. ۱۳۸۷. اثر تنش خشکی ناشی از PEG در چند گونه یونجهٔ یکساله در شرایط آب کشت (Aquaculture). فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. جلد ۱۶ ، شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۱۹۷-۱۸۲.

۸- مجیدی هروان، ا. ۱۳۷۲. مکانیزم فیزیولوژی مقاومت به تنگناهای محیطی. چکیده مقالات اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، دانشگاه تهران، ص ۱۳۴-۱۳۳.

۹- محمدی، ع.، ابراهیم زاده، ح.، هادیان، ج.، میرمعصومی، م. ۱۳۹۴. واکاوی اثر تنش خشکی بر برخی پارامترهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه بهلیمو(Lippia *citriodora* H.B.K.). مجله پژوهشهای گیاهی (انجمن زیست شناسی ایران). جلد ۲۸، شماره ۳، صفحه ۶۲۸-۶۱۷.

10- Arazmjo, A., Heidari, M., Ghanbari, A., 2010. The effect of water stress and three sources of fertilizers on flower yield, physiological parameters and nutrient uptake in chamomile (Matricaria chamomilla L.) Iranian J. of Medic and Aromatic Plants, Vol. 25, No. 4.

11- Asada K (1999) The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. Annual Rev. Plant Physiology Plant Molecule Biology. 50: 601-639.

12- Allen M.F. 1992. Mycorrhizal Functioning, an Integrative Plant-Fungal Process .New York,p.534.

13- De Carvalho, M. H. C. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. Plant Signal Behav. 3(3): 156-165. dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in saltstressed function of ascorbate peroxidase isoenzymes. J. Exp. Bot. 53: 1305-1319.

14- Desuloux, D., Huynh,T. T., and P. Roumet. 2000. Idaetification of soybean plant characteristics that indicate the timing of olrought stress. Crop Sci. 40: 716-722.

15- Ezzat, Z. M.,Khalil, K. M., Khalil, A.A.2005. Effect of natural potassium fertilizer on yield. Yield components and seed composition of lentil in old and new reclaimed lands. Egypt, J. Applied Sci., 20: 80-92 .

16- 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: 1, 2. 537-550.

17- Graham, R.D. and MJ. Webb.1991.Micronutrients and plant disease resistant and tolerance in plants. In micronutrients in agriculture, edited by J.J. Mortvedt, F.R. Cox, L.M. Shuman and R.M Welch,pp.329-370. Madison, WI Soil Science Society of America Book series NO.

18- Hsiao, T.1973. Plant responses to water stress. Annu Rev Plant Physiol,vol. 24 :519-570.

19- Inze, D. and M. Van Montagu. 1995. Oxidative stress in plants. Curr. Opin. Biotech. 6:153-158.

20- 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 evoluation. Physiologia Plantarum 84:67-72.

21- Jones, J. B. 2001. Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis. CRC Press LLC, U. S.

22- Ludlow, M. M., 1985. Effect of water stress on the decline of leaf net photosynthesis with age. In environmental and biological control of photosynthesis, edited by R. Marcell, PP. 123-133. The Hague: Junk.

23- Marschner, H., 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd edition, Academic Press. Ltd., London, 862 p.

24- Mishra R.R., 2007. Soil microbiology. Translated by: A.Fallah, H. Besharati, & H. Khosravi, Aeeizh publisher. 179 pp .

25- Nagarathna, T. K., Prasad, T.G., Bagyaraj, D. J. and Shadakshari, Y.G. (2007). Effect of arbuscular mycorrhiza and phosphorus levels on growth and water use efficiency in Sunflower at different soil moisture status. Journal of Agricultural Technology 3(2): 221-229.

26- Nonami, H., Wu, Y., and Matthewse, M.A. 1997. Decreased growth-induced water potential a primary cause of growth inhibition at low water potentials. Plant Physiology, 114: 501-509.

27- Pagter, M., Bragato, C., Brix, H., 2005. Tolerance and physiological responses of phragmites australis to water deficit. Aquatic Botany, 81,285-299.

28- 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.

29- Raschke, K. (1976). How stomata resolve the dilemma of opposing priorities. Philosophical transactions of the Royal Society of London. 273:551-560.

30- Reddy, A. R., K. V. Chaitanya and M. Vivekanandan. 2004. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. J. Plant Physiol. 161: 1189-1202.

31- Scandalios, J. G. 1993. Oxygen stress and superoxide dismutase. Plant Physiol. 101: 7-12.

32- Smith, S.E. and D.J. Read. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, San Diego, CA.

33- Soliman. Amira Sh., Shanan. Nermeen T., Massoud. Osama N., Swelim. D.M.2011. Improving salinity tolerance of Acacia saligna (Labill.) plant by *Arbuscular mycorrhizal* fungi and *Rhizobium* inoculation. African J. of Biotech. Vol. 11(5), pp. 1259-1266.

34- Turner, L. B., 1990. The extent and pattern of osmotic adjustment in white clover during the development of water stress. Annals on Botany 66: 721-727. under drought stress. 10th Iranian Cong. of Agron. and Plant Breeding Sci.

35- Troughton, A. 1975. The Underground Organs of Herbage Grasses Farnham Royal. Commonwealth Agricultural Bureaux.

Combined effect on fungi and bacteria metabolites on increased osmolytes of compatibility of alfalfa in the water deficit stress

Zafari M., Ebadi A. and Jahanbakhsh gode kahriz S.

Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, I.R. of Iran

Abstract

Efect symbiosis of fungi and bacteria in resistance to water deficit stress in alfalfa studied in a factorial experiment in a randomized complete block design with three replications 2010 in greenhouse of University of Mohaghegh Ardabil, Ardabil. Water deficit stress was applied at three levels of %35, %55 and %75 of field capacity. Treatments of insemination involved inoculating of seed with strain of Mycorrhiza(*Glomus mosseae*), *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium meliloti* + Mycorrhiza, and control. Results showed that with increasing stress in treatments, sodium concentration , proline and total soluble sugars increased, , While was reduced (potassium , phosphor) concentration, leaf area and stomatal conductance. Between treatments inoculation, potassium, phosphorus, proline, soluble sugar, stomatal conductance and leaf area with the highest values (72/6, 07/5, 14/7, 05/6, 28, 66/20 to double inoculation and lowest values (13/6, 9/2, 77/4, 73/4, 15, 33/5) was awarded to control in level of stress 35% of field capacity. After double inoculation, inoculated with mycorrhizal was more than symbiosis inoculation. But sodium with the least amount (2.53) to double inoculation and the highest amount (3.08) to control in stress levels of 35% field capacity was related. Double inoculation with increasing water absorption, nutrients and compatible osmolytes could improve plant resistance against the deficit. Since today the indiscriminate use of chemical fertilizers, problems such as soil and environmental pollution and increase of chemical inputs has created. Therefore, the use of biological resources could be of various aspects of economic and environmental, useful and is a good alternative to chemical inputs.

Key words: *Glomus mosseae*; *Sinorhizobium meliloti*; water deficit stress; compatible osmolytes