اثر مایه زنی توام قارچ اندومیکوریز و باکتریهای ریزوبیوم ملیلوتی و سودوموناس آئروژینوزا برگیاه یونجه (*Medicago sativa*) در شرایط تنش آبی

سجاده علیخانی و مهرناز محمودی زرندی*

ایران، کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرمان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

گیاهان در معرض انواع تنشهای زیستی و غیر زیستی از جمله خشکی قرار می گیرند که بر رشد و محصول دهی آنها تاثیر منفی دارد. همزیستی گیاهان با قارچ میکوریزی از رایج ترین استراتژیهای گیاهی بمنظور کنار آمدن با تنشهای محیطی می باشد. به همین منظور در پژوهش حاضر برهمکنش قارچ اندومیکوریز و باکتریهای سودوموناس آئروژینوزا و ریزوبیوم ملیلوتی در آزمایشی به صورت فاکتوریل بر پایه بلوکهای کاملا تصادفی در سه سطح آبیاری و سه تکرار بر گیاه یونجه مورد بررسی قرار گرفت. اسپور قارچ اندومیکوریز همزیست با یونجه از منطقه باقرآباد کرمان در مجاورت گیاه ذرت تکثیر و مورد استفاده قرار گرفت. بذرهای یونجه رقم بمی با اسپور قارچ مزبور و باکتریها بصورت منفرد و توام تلقیح شدند و در سه سطح آبیاری ۷۰، ۵۰ و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی بمدت سه ماه پرورش داده شدند. نتایج نشان داد تنش آبی بطور معنی دار باعث کاهش میزان پروتئین ولی افزایش پرولین وقندهای احیائی در گیاه یونجه می شود اما مقدار نیتروژن تغییر معنی داری نشان نمی دهد. تلقیح با قارچ اندومیکوریز و باکتریها میزان پروتئین، پرولین، قندهای احیائی و نیتروژن را در شرایط تنش و غیر تنش در مقایسه با شاهد بطور معنی داری افزایش داد. علاوه بر این اندومیکوریز و باکتریها بر یکدیگر اثر هم افزایی نشان دادند بطوری که در اکثر موارد تلقیح توام موثرتر از تلقیح منفرد بود. بر اساس این نتایج تلقیح توام باکتریهای سودوموناس آئروژینوزا، ریزوبیوم ملیلوتی و قارچ اندومیکوریز بمنظور افزایش تحمل گیاه یونجه در برابر تنش آبی پیشنهاد می گردد.

واژه های کلیدی: یونجه، اندومیکوریز، ریزوبیوم ملیلوتی، سودوموناس آئروژینوزا، تنش آبی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۳۲۹۹۴۴۳۲ ، پست الکترونیکی: mehromah@yahoo.com

مقدمه

در نواحی خشک و نیمه خشک، تنش خشکی محصول دهی را کاهش میدهد بنابراین، بکارگیری مکانیسم های دفاعی گیاهان در برابر تنش می تواند در بهبود تولید محصولات مفید باشد (۷). قارچ های میکوریزایی شایع ترین و مرسوم ترین قارچهای خاک هستند که تقریبا با ۸۰ درصد گیاهان دنیا همزیستی دارند(۱۵). و نقش مهمی در پایداری ریزوسفر در زیست بوم های زراعی ایفا می کنند. قارچهای میکوریزایی از نظر اکولوژیک اهمیت بسیاری دارند زیرا این موجودات در داخل و روی ریشه گیاهان میزبان روابط همزیستی ایجاد می کنند. گیاه میزبان منابع کربن مورد نیاز قارچ را فراهم می کند و قارچ نیز سبب افزایش ظرفیت جذب آب و عناصر غذایی گیاه میزبان می شود. بخش عمده ای از گیاهان دارای توانایی ایجاد همزیستی با قارچهای میکوریزایی هستندو همزیستی قارچ با گیاه میزبان، از بعد زیست محیطی و سلامتی انسان و دام حائز اهمیت فراوان است. باکتریهای ریزوسفری بعنوان ریزوباکتری های کمک کننده تشکیل میکوریز وباکتریهای محرک رشد گیاه توصیف می شوند؛ این باکتریها باعث

افزایش جذب عناصرنیتروژن، آهن و پتاسیم می گردند و افزایش این عناصر در گیاه منجر به افزایش مقدار پروتئین می‌شود.همچنین با توجه به این که رابطه هم‌افزایی بین محرک‌های رشد وجود دارد این عامل می‌تواند در کاهش تأثیرات تنش و افزایش جذب عناصر بویژه نیتروژن نقش داشته باشد و موجب افزایش کربن و نیتروژن موردنیاز برای تولید پرولین و دیگر اسیدهای آمینه و کاهش تجزیه پروتئین‌ها شود (۲۴).

یونجه گیاهی است علفی و چند ساله که آن را بعنوان ملکه نباتات علوفه ای شناخته اند، این گیاه بومی ایران بوده و از گذشته دور بعنوان یک گیاه با ارزش در تغذیه دام و تناوب زراعی شناخته شده است. با توجه به سازگاری بالا در اکثر نقاط دنیا و در ایران در مناطق گرم، معتدل و سردسیر رشد می کند و در هر منطقه یک اکوتیپ مرغوب ایجاد می نماید. بـه همـین دلیـل مـی تـوان در نظـامهـای متفـاوت کشاورزی از آنها اسـتفاده کرد (۲۳). از نظر کیفیت علوفه، مواد غـذایی، میـزان انـرژی مطلوب، یونجه های یکساله از گیاهان بسیار مفید بوده و در رشد دامها موثر هستند (۱۳). و برای اصلاح و جلـوگیری از فرسایش خاک بسیار مناسب مـی باشـند با توجه به کشت وسیع یونجه بررسی خصوصیات آن بویژه شناخت مکانیسم های مقاومت به خشکی از اهمیت ویژه ای برخوردار است و با توجه به اینکه کشت گونه های یکساله یونجه در مراتع و دیمزارها صورت می گیرد محدودیت منابع آبی از مواردی است که تاثیر بسزایی برعملکرد آنها می گذارد و از آنجا که کیفیت بعنوان یک معیار مقایسه و ارزیابی نقش بسیار مهمی در ارزش غذایی و اقتصادی یک محصول ایفا می کنـد این موضوع در مورد گیاهان علوفه ای نقش بیشـتری را ایفا می کند. این تحقیق بمنظور شناسایی میکروارگانیسم های موثر در بالا بردن مقاومت گیاه یونجه نسبت به کم آبی انجام شده است.

مواد و روشها

تکثیر اسپور قارچ میکوریز: بمنظور شناسایی و تکثیر اسپور قارچ میکوریزی همزیست با یونجه، از یکی از مزارع یونجه در منطقه باقرآباد کرمان نمونه ای از ناحیه ریزوسفر گیاه برداشته شد و سپس نمونه مذکور به نسبت ۱:۴ با شن استریل مخلوط گردید. از خاک حاصل برای کشت گیاه ذرت که یک گیاه مستعد تشکیل میکوریز می‌باشد بمدت سه ماه استفاده شد. در طی این مدت تکثیر اسپور قارچی صورت گرفت و با استفاده از کلید شناسایی مورتون و بنی ازنوع *Glomus intraradices* تشخیص داده شد (۲۰).

کشت گلدانی و تلقیح میکوریزی یونجه: بذور یونجه تهیه شده از مرکز تحقیقات کشاورزی کرمان با هیپوکلریت سدیم ۳٪ استریل گردید و پس از جوانه زنی در گلدان کاشته شد. خاک تعدادی از گلدانها فقط مخلوط پرلیت و شن استریل بعنوان گروه شاهد و خاک تعدادی از گلدانها مخلوط پرلیت و شن استریل همراه با ۵۰ گرم از خاک حاوی اسپور قارچ میکوریز بود.

تلقیح باکتری ریزوبیوم و سودوموناس به گیاه یونجه: مایه تلقیح ریزوبیوم ملیلوتی(ATCC/۹۹۳۰) با کدورت محلول استاندارد نیم مک فارلند (جمعیت باکتری $۱۰^{۸}$ *۱/۳ در هر میلی لیترمایه تلقیح) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC/۹۰۲۷) با کدورت محلول استاندارد مک فارلند(جمعیت باکتری معادل $۱۰^{۸}$ *۱/۵ در هر میلی لیتر مایه تلقیح) در آزمایشگاه ایرانیان غذاآزمای شهر کرمان تهیه و بمیزان یک میلی لیتر با خاک هر گلدان جهت تلقیح میکروبی مخلوط شد. برای بررسی اثر تنش خشکی به گیاهان یونجه میکوریزی و غیر میکوریزی بعد از محاسبه ظرفیت زراعی خاک گلدانها بمیزان ۷۰، ۵۰ و ۲۰ درصد ظرفیت زراعی و هر هفته یک بار با محلول غذایی ریسون فاقد فسفات (۱۸) با رقت یک دوم آبیاری و پس از گذشت سه هفته از اعمال تنش خشکی پارامترهای مورد نظر اندازه گیری شد.

سنجش غلظت پروتئین: جهت سنجش میزان پروتئین با روش برادفورد ۱ گرم از بافت تر گیاه با ۳ میلی لیتر بافر تریس- ساکارز با pH=۷/۵ بطور کامل ساییده شد سپس محلول بدست آمده به لوله سانتریفوژمنتقل و پس از ۱۰ دقیقه سکون بمدت ۲۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتیگراد سانتریفوژ گردید. سپس از محلول رویی برای سنجش غلظت پروتئین استفاده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید (۱۱).

سنجش غلظت پرولین: برای سنجش میزان پرولین با روش بتس و همکاران، ابتدا ۰/۰۲گرم از بافت تر گیاه در۱۰میلی لیتر محلول ۳ درصد اسید سولفوسالیسیلیک ساییده و عصاره حاصل بمدت ۵ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ۲ میلی لیتر از مایع رویی با ۲ میلی لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک خالص مخلوط کرده و یک ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد در حمام آب گرم قرار گرفت و بعد لوله ها در حمام یخ سرد شدند. سپس ۴ میلی لیتر تولوئن به لوله ها اضافه گردید و بخوبی تکان داده شد و سپس مقدار پرولین در لایه رنگی با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد (۹).

سنجش مقدار قندهای احیاء کننده: مقدار قندهای احیاء کننده با استفاده از روش نلسون و سوموگی (۲۲) اندازه گیری شد. ابتدا ۰۲۵/ گرم از بافت تر گیاهی وزن و هر نمونه بطور جداگانه با ۵ میلی لیتر آب مقطر در هاون چینی ساییده، سپس محتوای هاون توسط کاغذ صافی واتمن صاف گردید.۲ میلی لیتر از عصاره برگی بدست آمده به یک لوله آزمایش منتقل و به آن ۲ میلی لیتر محلول سولفات مس اضافه و بمدت ۸ دقیقه لوله های آزمایش در بن ماری با درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرارگرفتند و پس از سردشدن لوله ها ۲ میلی لیتر محلول اسید فسفومولیبدیک به هر لوله اضافه گردید و مقدار قند با استفاده از منحنی استاندارد تعیین شد.

سنجش ازت کل: برای سنجش ازت کل، یک گرم از نمونه های گیاهی خشک شده در بالن های ۵۰ سی سی با ۲۵ میلی لیتر اسید پرکلریک ۷۶ درصد ریخته شد. پس از گذشت یک شب نمونه ها بمدت ۱۰ ساعت زیر هود قرار داده شد و بر روی هیتر به ملایمت حرارت داده شدند. سپس محلول بدست آمده صاف گردید و حجم محلول با آب دوبار تقطیر به ۲۵ میلی لیتر رسانده و از محلول حاصل مقدار۲ میلی لیتر برداشته و به آن ۵ میلی لیتر سیترات سدیم- سود، ۲ میلی لیتر فنل درالکل و۲ میلی لیتر هیپوکلریت سدیم افزوده شد. بعد از ورتکس و گذشت ۵ دقیقه مقدار جذب نمونه ها با کمک منحنی استاندارد، به روش حاجی بلند (۴) سنجش گردید.

اندازه گیری وزن تر و خشک اندام هوایی: ابتدا وزن تر اندامهای هوایی اندازه گیری، سپس نمونه ها بمدت دو ساعت در دستگاه آون با درجه حرارت ۸۰ درجه سانتیگراد قرار داده و وزن خشک نمونه های هر گلدان با دقت ۰/۰۱ گرم جداگانه اندازه گیری شد.

عملیات آماری: آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون دانکن با ضریب اطمینان ۰/۱٪ انجام گردید و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد.

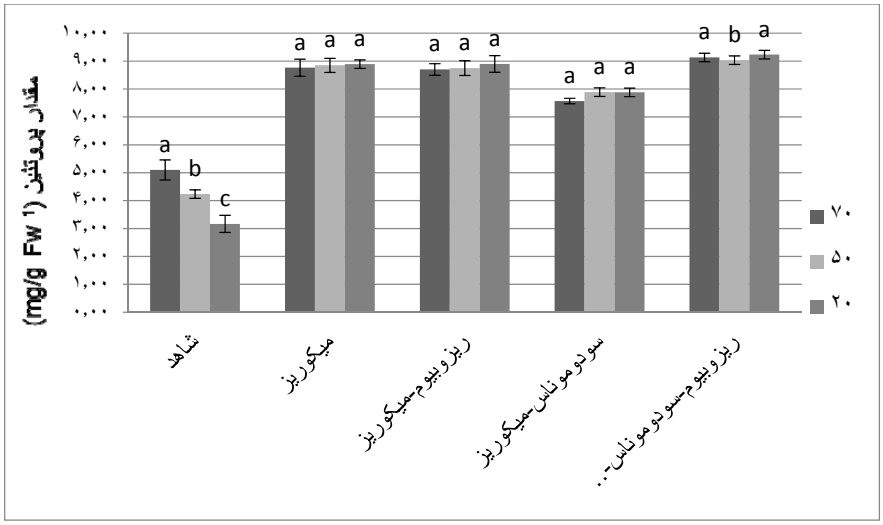
نتایج

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر تیمار میکوریز بصورت منفرد و توام با تیمار های باکتریایی بر میزان پروتئین، پرولین، قندهای احیا کننده، ازت کل و وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه یونجه در سطح احتمال ۱ یا ۵ درصد معنی دار بود و کمترین مقدار مربوط به گروه شاهد و بیشترین مقدار مربوط به تیمار میکوریز- ریزوبیوم- سودوموناس بود (جداول۱-۳-۵-۷-۹). در طی تنش آبی پروتئین بمقدار قابل توجهی کاهش نشان داد اما در تیمارهای باکتریایی بصورت منفرد و توام در مقایسه با شاهد بصورت معنی دار افزایش نشان داد. میزان پرولین و

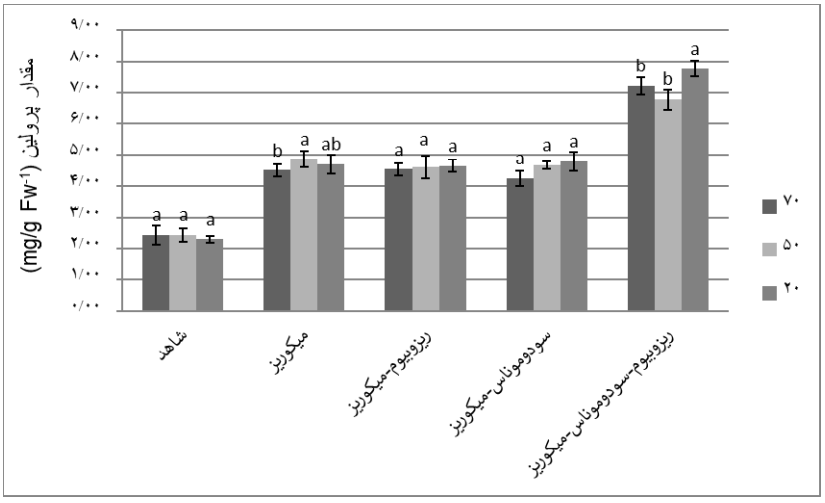
قندهای احیائی در طی تنش در گروه شاهد تغییر معنی دار نداشت اما در تیمارهای میکروبی افزایش معنی داری در همه سطوح آبی نسبت به گروه شاهد نشان داد(شکل۳و۲). بنابراین نتایج نشان می دهد که همزیستی با میکوریز، ریزوبیوم و سودوموناس به صورت منفرد و توام مقدار پروتئین، نیتروژن و وزن تر و خشک اندام هوایی را در مقایسه با شاهد بطور معنی داری افزایش می دهد (شکل۴و۱).

بحث و نتیجه گیری

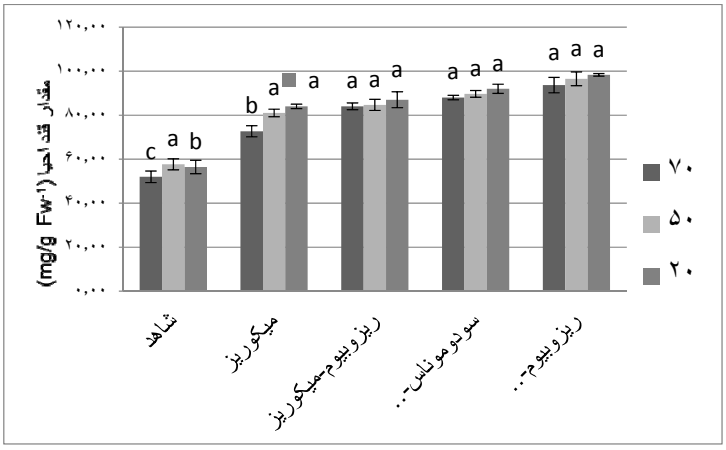
تنش آبی یک مسئله جدی جهانی است که بر روی تولید و کیفیت فرآورده های کشاورزی اثر مستقیم دارد و این موضوع با افزایش تغییرات شرایط آب و هوایی جهان روز به روز اهمیت بیشتری پیدا می کند.



شکل۱- مقایسه میانگین پروتئین اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی در رطوبت‌های مختلف (a-b) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.

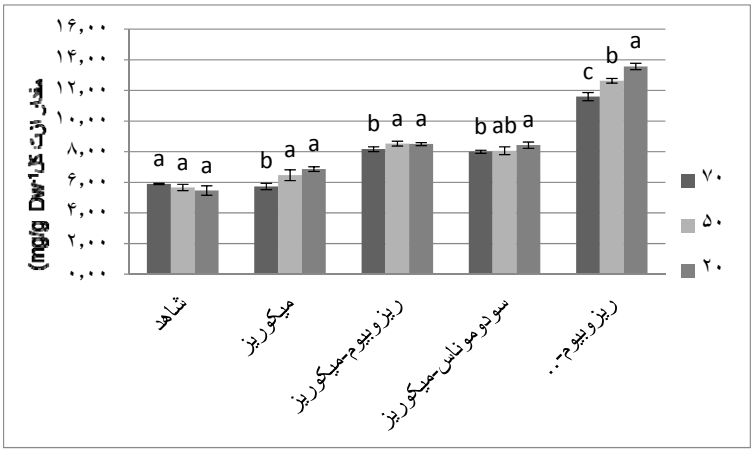


شکل۲- مقایسه میانگین پرولین اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی در رطوبت‌های مختلف (a-b) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.



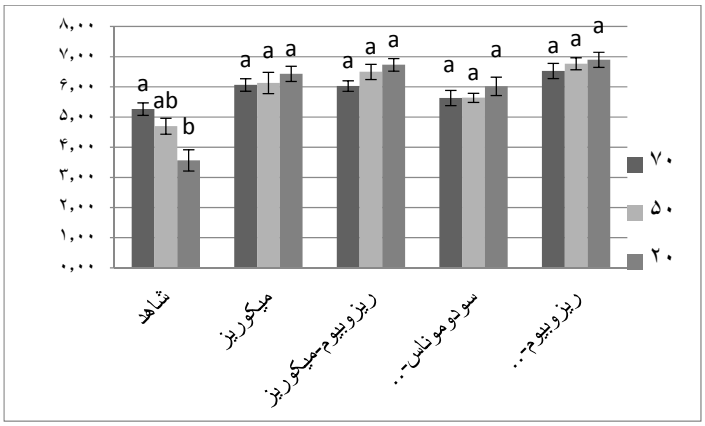
شکل ۳- مقایسه میانگین قند احیا کننده اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی در رطوبت‌های مختلف

(a-c) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.



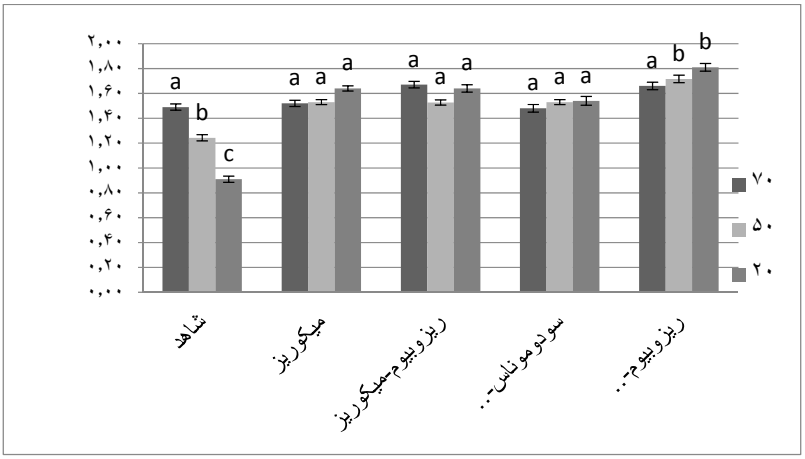
شکل ۴- مقایسه میانگین ازت کل اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی در رطوبت‌های مختلف

(a-c) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.



شکل ۵- مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی در رطوبت‌های مختلف

(a-b) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.



شکل۶- مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی در رطوبت‌های مختلف

(a-c) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند.

جدول ۱- مقایسه میانگین پروتئین اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی

تیمارهای میکروبی	پروتئین اندام هوایی(mg/g)
شاهد	۴/۱۷ ± ۰/۸۷^{d}
میکوریز	۸/۸۳ ± ۱/۲۶^{b}
ریزوبیوم-میکوریز	۸/۷۸ ± ۱/۰۹^{b}
سودوموناس-میکوریز	۷/۷۷ ± ۰/۵۲^{c}
ریزوبیوم-سودوموناس-میکوریز	۹/۶۶ ± ۰/۳۷^{a}

(a-d) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۳ غلظت نشان داده شده‌اند.

جدول ۲- مقایسه میانگین پروتئین اندام هوایی گیاه یونجه در رطوبت‌های مختلف

رطوبت‌های مختلف	پروتئین اندام هوایی(mg/g)
FC%70	۸/۱۷ ± ۲/۹۷^{a}
FC%50	۷/۱۲ ± ۱/۴۴^{b}
FC%20	۷/۱۱ ± ۲/۲۴^{b}

(a-b) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۵ تیمار نشان داده شده‌اند

جدول ۳- مقایسه میانگین پرولین اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی

تیمارهای میکروبی	پرولین اندام هوایی(mg/g)
شاهد	۲/۳۲ ± ۰/۵۰^{e}
میکوریز	۴/۹۴ ± ۰/۴۹^{b}
ریزوبیوم-میکوریز	۳/۷۸ ± ۰/۵۰^{d}
سودوموناس-میکوریز	۴/۳۸ ± ۰/۴۸^{c}
ریزوبیوم-سودوموناس-میکوریز	۷/۲۴ ± ۰/۴۹^{a}

(a-e) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۳ غلظت نشان داده شده‌اند.

جدول ۴-مقایسه میانگین پرولین اندام هوایی گیاه یونجه در رطوبت‌های مختلف

رطوبت‌های مختلف	پرولین اندام هوایی(mg/g)
FC%70	۴/۴۶ ± ۱/۶۳^{b}
FC%50	۴/۴۳ ± ۱/۵۰^{b}
FC%20	۴/۷۱ ± ۱/۹۲^{a}

(a-b) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۵ تیمار نشان داده شده‌اند.

جدول ۵- مقایسه میانگین قند احیایی اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی

تیمارهای میکروبی	قند احیایی اندام هوایی(mg/g)
شاهد	۵۹/۰۰ ± ۷/۱۲^{e}
میکوریز	۷۹/۲۲ ± ۵/۳۳^{d}
ریزوبیوم-میکوریز	۸۵/۱۱ ± ۲/۳۷^{c}
سودوموناس-میکوریز	۸۹/۰۰ ± ۱/۸۷^{b}
ریزوبیوم-سودوموناس-	۹۶/۱۷ ± ۳/۱۲^{a}

میکوریز	

(a-e) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۳ غلظت نشان داده شده‌اند.

جدول ۶- مقایسه میانگین قند احیایی اندام هوایی گیاه یونجه در رطوبت‌های مختلف

رطوبت‌های مختلف	قند احیایی اندام هوایی(mg/g)
FC%70	۷۸/۸۰ ± ۱۵/۸۳^{c}
FC%50	۸۱/۹۰ ± ۱۳/۷۹^{b}
FC%20	۸۴/۴۰ ± ۱۰/۴۹^{a}

(a-c) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۵ تیمار نشان داده شده‌اند.

جدول ۷- مقایسه میانگین ازت کل گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی

تیمارهای میکروبی	ازت کل(mg/g)
شاهد	۵/۶۷ ± ۰/۲۶^{e}
میکوریز	۶/۳۶ ± ۰/۵۴^{d}
ریزوبیوم-میکوریز	۸/۴۰ ± ۰/۲۱^{c}
سودوموناس-میکوریز	۸/۱۷ ± ۰/۲۶^{b}
ریزوبیوم-سودوموناس-میکوریز	۱۲/۶۰ ± ۰/۸۷^{a}

(a-e) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۳ غلظت نشان داده شده‌اند.

جدول ۸- مقایسه میانگین ازت کل گیاه یونجه در رطوبت‌های مختلف

رطوبت‌های مختلف	ازت کل(mg/g)
FC%70	۷/۸۸ ± ۲/۲۰^{c}
FC%50	۸/۲۷ ± ۲/۵۱^{b}
FC%20	۸/۵۷ ± ۲/۸۴^{a}

(a-c) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۵ تیمار نشان داده شده‌اند.

جدول ۹- مقایسه میانگین وزن تر اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی

تیمارهای میکروبی	وزن تر اندام هوایی(g)
شاهد	۴/۵۱ ± ۰/۷۹^{c}
میکوریز	۶/۳۱ ± ۰/۲۹^{b}
ریزوبیوم-میکوریز	۶/۲۲ ± ۰/۳۶^{b}
سودوموناس-میکوریز	۶/۲۹ ± ۰/۲۶^{b}
ریزوبیوم-سودوموناس-میکوریز	۶/۷۳ ± ۰/۸۹^{a}

(a-c) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۳ غلظت نشان داده شده‌اند.

جدول ۱۰- مقایسه میانگین وزن تراندام هوایی گیاه یونجه در رطوبت‌های مختلف

رطوبت‌های مختلف	وزن تر اندام هوایی(g)
FC%70	۶/۰۵ ± ۰/۶۰^{a}
FC%50	۵/۹۶ ± ۰/۷۶^{a}
FC%20	۵/۷۸ ± ۱/۲۳^{b}

(a-b) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۵ تیمار نشان داده شده‌اند.

جدول ۱۱- مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای میکروبی

تیمارهای میکروبی	وزن خشک اندام هوایی(g)
شاهد	۱/۲۱ ± ۰/۵۰^{d}
میکوریز	۱/۵۶ ± ۰/۴۹^{c}
ریزوبیوم-میکوریز	۱/۶۱ ± ۰/۵۰^{b}
سودوموناس-میکوریز	۱/۵۱ ± ۰/۴۸^{bc}
ریزوبیوم-سودوموناس-میکوریز	۱/۸۳ ± ۰/۴۹^{a}

(a-d) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۳ غلظت نشان داده شده‌اند.

جدول ۱۲- مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه در رطوبت‌های مختلف

رطوبت‌های مختلف	وزن خشک اندام هوایی(g)
FC%70	۱/۶۱ ± ۰/۱۲^{a}
FC%50	۱/۵۱ ± ۰/۱۶^{b}
FC%20	۱/۴۶ ± ۰/۳۱^{c}

(a-c) میانگین‌ها با حروف کاملاً متمایز تفاوت معنی داری در سطح احتمال ۵٪ دارند. اعداد جدول به صورت "انحراف معیار ± میانگین" ۳ تکرار در ۵ تیمار نشان داده شده‌اند.

جدول ۱۳- تجزیه واریانس (مقادیر مربع میانگین) داده های حاصل از اثر تیمارهای خشکی و همزیستی بر مقدار پروتئین، پرولین، قندهای احیائی، ازت کل، وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان یونجه

منابع تغییرات	درجه آزادی	پروتئین	پرولین	قندهای احیائی	ازت کل	وزن خشک	وزن تر
تیمارهای میکروبی	۴	۴۹/۳***	۲۹/۲۶***	۲۴۸۵/۲***	۷۹/۲۵۱***	۰/۳۳۱***	۶/۸***
غلظت	۲	۵/۵***	۰/۳۷***	۲۵۶/۲***	۱۴/۸۸۲***	۰/۰۸۶***	۰/۳***
تیمارهای میکروبی × غلظت	۸	۳/۰***	۰/۲۳***	۲۹۰/۵***	۳/۰۱۱***	۰/۰۷۰***	۰/۷***
خطا	۳۰	۰/۱	۰/۰۶	۶/۶	۰/۰۷۷	۰/۰۰۱	۰/۱
٪CV	-	۳/۲	۵/۶	۳/۳	۲/۹	۱/۲	۴/۲
$٪R^2$	-	۹۸/۹	۹۷/۷	۹۷/۸	۹۹/۱	۹۸/۵	۹۲/۰

ns تفاوت غیر معنی دار در سطح احتمال ۵٪، *، **، *** تفاوت معنی دار به ترتیب در سطوح احتمال ۵٪، ۱٪ و ۰/۱٪.

قارچ های میکوریز از عوامل ضروری در سیستم پایدار خاک و گیاه محسوب می شوند که با ریشه بیش از ۹۷ درصد گیاهان هم زیستی دارند و همزیستی با میکوریز آربوسکولار، تنظیم اسمزی را بر مبنای افزایش غلظت پتاسیم و کلسیم بهبود می بخشد، در نتیجه منجر به افزایش تحمل به خشکی می شود. قارچ های میکوریزایی با تولید هورمونهای گیاهی می توانند رشد گیاه و یا رشد ریشه را تشدید کنند، درنتیجه ظرفیت جذب عناصرغذایی را بالا برده و شانس گیاه را دراجتناب ازخشکی افزایش می دهند.

در پژوهش حاضر تلقیح توام قارچ میکوریزی و ریزوباکتری های بررسی شده توانست کاهش رشد گیاه یونجه در شرایط کم آبی را بطور معنی داری بهبود بخشد؛ یونسی و همکاران نیز نشان دادند تلقیح توام ریزوبیوم و سودوموناس اثرات منفی شوری را بر طول ساقه، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه در گیاه یونجه تعدیل میکند علاوه براین تیمار باکتریایی بطور معنی داری مقادیر نیتروژن و فسفر را در شرایط تنش شوری افزایش می دهد (25). بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش, تیمار تلقیحی با میکوریز و ریزوبیوم نسبت به میکوریز تنها، میزان پرولین و قندهای محلول را بطور معنی داری افزایش می دهد که این نتیجه نیز با نتایج ظفری و همکاران مطابقت می کند (۵). اشراف و همکاران در مطالعه خود دریافتند که تنش خشکی باعث افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، پرولین، مالون دی آلدئید و پروتئین کل برگ چمن میگردد این افزایش برای گیاهان میکوریزی بیشتر از گیاهان غیر میکوریزی میباشد. بنا به نظر این محققین میکوریز میتوانید با افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان و میزان پرولین سبب کاهش میزان پروکسیداسیون لیپید غشاء سلول های برگ چمن شود (۳). همچنین کاهش میزان پروتئین، در شرایط میکوریزی و حضور ریزوباکتری ها در طی تنش آبی کمتر دیده شد. تنش آبی با تولید رادیکالهای سوپراکسید یا هیدروکسیل باعث اکسیداسیون اسیدهای آمینه به گروههای کربونیل می شود و به ساختار پروتئین و عملکرد آن آسیب وارد می کند. در طی تنش به علت تخریب پروتئینها ، انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد جهت تنظیم اسمزی سلول می تواند دلیلی برای افزایش تولید پرولین باشد. به نظر می رسد با توجه به رابطه هم افزایی میکروارگانیسم های محرک رشد، این عامل می تواند در کاهش تاثیرات تنش و افزایش جذب عناصر بویژه نیتروژن نقش داشته باشد و موجب افزایش کربن و نیتروژن مورد نیاز برای تولید پرولین و دیگر اسیدهای آمینه و کاهش تجزیه پروتئینها شود. مطالعات نشان داده است که قارچ *Glomus fasciculatum* بر فعالیت گلوتامین سنتتاز و نیترات ردوکتاز بطور غیر مستقیم تاثیر دارد و این از بهبود تغذیه فسفری و رشد گیاهان میکوریزی ناشی می شود (۱۴). یافته های ژانگ و

همکاران نشان داد که گیاهان لگوم میکوریزی تثبیت نیتروژن بیشتری نسبت به گیاهان غیر میکوریزی انجام می‌دهند و غلظت نیتروژن در آنها بالاتر است که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد (۲۶). تحقیقات آنها نشان داده است که میکوریزای آربوسکولی بطور مستقیم سبب افزایش جذب نیتروژن از طریق میسلیومهای خود می‌شوند. از طرف دیگر، آنها با جذب آب و مواد غذایی بیشتر گیاه را از نظر فیزیولوژیکی برای تثبیت نیتروژن آماده می کنند و در نتیجه تثبیت نیتروژن بیشتری انجام می شود. نتایج این بررسی نشان می دهد که گیاهان تلقیح شده با باکتری سودوموناس و میکوریز میزان نیتروژن بیشتری در مقایسه با گیاهان میکوریزی و بدون تلقیح باکتری دارند که با نتایج تحقیقات دیگر مطابقت می کند. در تحقیقی کاکماکی و همکاران اثر باکتریهای محرک رشد را بر رشد گیاهچه های گندم و اسفناج بررسی کردند، این محققین افزایش فعالیت نیترات ردوکتاز را عامل افزایش جذب نیتروژن در گیاه مطرح کردند (۱۲). اردکانی وهمکاران نیز علت اصلی افزایش غلظت نیتروژن در گیاه گندم را توسعه سیستم ریشه ای توسط باکتریهای محرک رشد بیان نمودند (۱). افزایش تعداد تارهای کشنده در اثر تیمار با باکتریهای محرک رشد، سطح ریشه ای را ۱۵-۸ برابر افزایش میدهد و از این طریق با اشغال حجم کافی از منطقه اطراف ریشه، درعرضه عناصر متحرک مثل نیترات برای گیاه نقش دارد. در تلقیح دو گانه میکوریز و ریزوبیوم میزان نیتروژن نسبت به میکوریز تنها، افزایش بیشتری نشان داد آزمایشات انجام شده با گونه های متعددی از قارچهای میکوریز آربوسکولار و سوشهای مختلف ریزوبیوم دریونجه، سویا وچند گیاه دیگر از خانواده لگومینوز نشان داد که میکوریز سبب افزایش قابلیت گره زایی و تثبیت ازت شد. روش دیگری که قارچهای میکوریز سبب افزایش جذب نیتروژن توسط گیاه می گردند کمک به افزایش تثبیت ازت توسط میکروارگانیسمهای تثبیت کننده ازت است (۱۷). پناه پور تأثیر سویه های سینوریزوبیوم ملیلوتی اقلیم های مختلف را بر رشد و نمو، عملکرد و تثبیت نیتروژن در برخی از ارقام یونجه بررسی کرد و نشان داد که اثرسویه های سینوریزوبیوم ملیلوتی بر تمامی صفات معنی دار و مقدار نیتروژن در گیاهان شاهد کمتر از گیاهان همزیست با سینوریزوبیوم بود که با نتایج این پژوهش همسو می باشد (۲۱). میزان قندهای احیا کننده نیز در طی تنش تغییر نشان داد و در تیمار میکوریز و میکوریز- ریزوبیوم این تغییر بیشتر مشاهده می شود. تولید پرولین با تولید قندهای محلول هم ارتباط دارد. یکی از مسیرهای تولید پرولین گلوتامات می باشد چنانچه با افزایش تولید قندهای محلول میزان تولید گلوتامات افزایش یافته و سنتز پرولین تشدید می یابد. ایریگوئن و همکاران نیز تشدید بیوسنتز پرولین را ناشی از تامین متابولیت آلفا-گلوتارات توسط قندها گزارش کرده اند (۱۶). از طرفی تنش خشکی با تولید رادیکالهای سوپراکسید یا هیدروکسیل باعث اکسیداسیون اسیدهای آمینه به گروههای کربونیل می شود و به ساختار پروتئین و عملکرد آن اسیب وارد می کند. افزایش پرولین و قندهای محلول در تیمارهای تلقیح توام میکوریز و ریزوبیوم ممکن است به افزایش جذب عناصر غذایی بخصوص نیتروژن مربوط بوده که در تلقیح دوگانه بدلیل اثر هم افزایی میزان جذب نسبت به حالت انفرادی بیشتر بود (۱۹). منصوری و احمدی مقدم (۶) در پژوهش خود بر روی گیاه ذرت ملاحظه نمودند مقدار قند برگ و ریشه در شرایط شوری افزایش میابد و بهبود رشد گیاه در شرایط تنش شوری در حضور قارچ های میکوریزی به ممانعت از انتقال یون سدیم به اندام هوایی نسبت داده شده است.پرولین دارای ساختار نیتروژنی است و استفاده از نیتروژن می تواند سبب افزایش مقدار آنها در گیاه شود. اثر هم افزایی به این دلیل است که گره های ریزوبیوم بدلیل نیاز شدیدی که به فسفر دارد به تلقیح با قارچهای میکوریز آربوسکولار واکنش مثبت نشان دهد و به هیفهای میکوریز آربوسکولار چسبیده و از آن بعنوان راه نفوذ به ریشه استفاده می کند. بنابراین احتمالا ریزوبیومها نیز با گسترش

هیفها گسترش یابند و میزان فعالیت آنها افزایش یابد (۱۰). 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 می یابد. مطالعات پیشین نیز نقش مفید قارچ های میکوریزی را بر تشکیل گرهک و عملکرد آن نشان داده اند ازکون و بارئا بر این عقیده اند که میکوریز با تحویل فسفر بیشتر به گیاه میزبان فرآیندهای درگیر در تثبیت نیتروژن را که نیاز فسفری بالا دارند، از لحاظ نیاز فسفری تامین می کنند (۸). اسمعیل نژاد و خارا دریافتند که علف کش متری بوزین سبب کاهش میزان پروتئین کل و مقدار قندهای محلول در ریشه و اندام هوایی می گردد اما میزان کاهش با تیمار میکوریز آربوسکولار کمتر میشود همچنین با افزایش غلظت علف کش مقدار پرولین در گیاهان میکوریزی و شاهد افزایش یافت اما این افزایش در گیاهان میکوریزی بالاتر بود بطور کلی نتایج این تحقیق بهبود شرایط فیزیولوزیک گیاه کدو را تحت سمیت علف کش در اثر همزیستی میکوریزی نشان داد (۲). از نتایج این پژوهش چنین استنباط می شود که میانکنش مثبتی بین میکوریز با باکتریهای سودوموناس و ریزوبیوم وجود دارد که می تواند گیاه را در برابر تنشهای محیطی محافظت کند. برهمین اساس توصیه می شود از ترکیب قارچ میکوریز، باکتریهای ریزوبیوم و سودوموناس استفاده شود تا بازدهی و عملکرد گیاه یونجه افزایش یابد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از استاد ارجمندم خانم دکتر محمودی که با راهنماییهای بی دریغشان اینجانب را در ارائه مقاله حاضر یاری نمودند صمیمانه تقدیر و تشکر می کنم. همچنین از پرسنل آزمایشگاه ایرانیان غذاآزما همکار اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی و وزارت بهداشت و مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی شهر کرمان کمال تشکر را دارم.

منابع

۱- اردکانی ، م . ر. ۱۳۸۷ . اکولوژی .مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران . چاپ دهم . ص ۳۴۰

۲- اسمعیل نژاد خیاوی، ن. و خارا، ج. ۱۳۹۳. تاثیر قارچ میکوریز گلوموس اتونیکاتوم بر روی رشد و برخی پارامترهای فیزیولوژیک در گیاه کدوی خورشتی تحت سمیت علف کش متری بوزین. مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۵۲-۶۰.

۳- اشراف، ح.، زکی زاده، ه.، احتشامی، م. و بیگلوبی، م.ح. ۱۳۹۶. ارزیابی همزیستی سه گونه قارچ میکوریزا بر ویژگی های بیوشیمیایی چمنهای آگروپیرون و پوآی چندساله تحت تنش خشکی. مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی ایران)، دوره ۲۴، شماره ۳، صفحه ۲۷-۴۶.

۴- حاجی بلند، ر. ۱۳۷۱. پاسخ گیاه جو به اثرات متقابل سدیم و کلسیم در محیط شور، رساله کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران.

۵- ظفری، م. عبادی، ع. پرمون، ق. جهانبخش، س. ۱۳۹۴. فصلنامه فرآیند و کارکرد گیاهی، سال چهارم، شماره۱۴، صص ۷۶-۶۱.

۶- منصوری، ح. و احمدی مقدم، ع. ۱۳۹۳. تاثیر خاک های میکوریزی مختلف بر پاسخ گیاه ذرت به تنش شوری. مجله پژوهش های گیاهی (زیست شناسی ایران)، جلد ۲۷، شماره ۱، صفحه ۱۴۲-۱۵

7- Al-Karaki GN, McMichael B and Zak J. 2004. Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. Mycorrhiza 14:263–269.

8- Azcon-Aguilar,C., and Barea, J.M. 2015. Nutrient cycling in the mycorrhizosphere. J.Soil Sci.Plant Nutr.25(2):372-396.

9- Bates L.S, Waldren R.P., TeareI.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205-207.

10- 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.

11-Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. Annals of clinical Biochemistry 72: 248–254.

12- Cakmakci R, Erat M, Erdog U and Donmez MF, 2007. The influence of plant growth–promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. Journal Plant Nutrition Soil Sciences 170: 288–295.

13- Cocks, P. S. 1992. Plant attributes leading to persistence in grazed annual medics (Medicago spp) growing in rotation with wheat. Aust. J. Agric. Res., 43: 7, 1559-1570.

14- Faure S., Cliquet J., Thephany G. and Boucaud J. 1998. Nitrogen assimilation in *Lolium perenne* colonized by arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum*. New Phytologist, 138, 3, 411-417.

15- J.L. Harley and S.E. Smith 1980 . Mycorrhizal Symbiosis . Academic press, London (1983). 14. H. Kianmehr, Vesicular - Arbuscular Mycorrhizal Spore Population and Infectivity ofSaffron (Crocus sativus) in Iran . New Phytologist . 88: 70 – 82.

16- 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.

17- Johansen A., Jakobsen I., and Jensen E.S. 1994. Hyphal N transport by a vesicular-arbuscular mycorrhiza fungus associated with cucumber grown at three nitrogen levels. Plant and Soil, 160: 1-9

18- Okibe S. T., M. Abossolo Angue, B, P, Bougnom, Boyomo Onana, D. Nwaga. 2015. Improvement of arbuscular mycorrhizal fungi inoculums production by nutrient solution concentration and soil texture variation. International Journal of Agronomy and Agricultural Research(IJAA). 6(5), 7-20.

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

20- Morton,J.B, and Benny, H.L.1990.Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi(zygomycetes). A new order Glomals two new suborder, Glomineae and Gigasporineae and two new families. A caulosproaceae and Gigasporaceae with and emendation of Glomaceae. Mycotaxon, 37:471-479.

21- Panahpour, H., 2007. Effects of different climatic *Sinorhizobium meliloti sp*. on N fixation and forage yield of 3 alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. Iranian Journal of Ranglands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 15: 243-252.

22- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination, Journal of Biological Chemistry195: 19- 23.

23- Tazi, M, A. Oulahboub, B. Laadnani, and K. Kouriri, 1989. Evaluation of local annual medics ecotypes in Morocco.Proceeding of the XVI International Grassland Congress. Nice, France. :283-284.

24- Toro, M, R. Azcon and J. M. Barea. 1998. The use of isotopic dilution techniques to evaluate the interactive effects of Rhizobium genotype, mycorrhizal fungi, phosphate solubilizing rhizobacteria and rock phosphate on nitrogen and phosphorous acquisition by *Medicago sativa*. New Phytologists, 138: 265-230.

25- Younesi, O., Baghbani A., Namdari A. 2013. The effects of *Pseudomonas aeruginosa* and *Rhizobium meliloti* co-inoculation on nodulation and mineral nutrient contents in alfalfa(*Medicago sativa*) under salinity stress. International Journal Of Agriculture And Crop Sciences. 5(14), 1500-1507.

26- Zhang, H., Daoust, F., Charles, T.C., Driscoll, B.T., Prithiviraj, B., and Smi D.L. 2002. *Bradyrhizobium japonicum* mutants allowing improved nodulation and nitrogen fixation of field grown soybean in short season area. J. Agri. Sci. 138: 293-300

Effect of coinoculation with endomycorrhiza, *Pseudomonas aeroginosa* and *Rhizobium meliloti* on *Medicago sativa* under water stress

Alikhani S. and Mahmoudi Zarandi M.

Dept. of Biology, Faculty of Science, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, I.R. of Iran

Abstract

Plants are exposed by different types of biotic and abiotic stresses including drought. These stresses have negative effects on plant growth and yield. Symbiosis with mycorrhizal fungi is the most common plant strategy for acclimation to environmental stresses. Hence in present study, interaction of endomycorrhizal fungus, Pseudomonas aeroginosa and Rhizobium meliloti were examined in completely randomized blocks under three levels of irrigation and three replications. Spores of native, symbiont endomycorrhizal fungus with medicago from Bagherabad region in Kerman multiplied by Zea mays and then applied with Pseudomonas and Rhizobium separately and together in pots for three months under 3 different levels of irrigation: 70, 50, 20 percentage of field capacity. Results showed reduction of protein content while proline and reducing sugars concentration increased significantly under water stress. Changes in total nitrogen concentration were not significant. Inoculation with endomycorrhizal fungus and bacteria significantly increased protein, proline, reducing sugars and nitrogen concentration under water stress and normal condition compared with the control. In addition to, endomycorrhiza and bacteria had synergistic effect so that in many cases coinculation were more effective than single inoculation. On the basis of these results, coinoculation with endomycorrhizal fungus, Pseudomonas aeroginosa and Rhizobium meliloti is suggested for improving alfalfa tolerant to drought.

Key words: *Medicago sativa*, endomycorrhiza, Rhizobium meliloti, Pseudomonas aeroginosa, drought.