نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد ۲۶ شماره ۳/ پاییز ۱۳۹۵

تاثیر هم افزایی گلوموس موسه‌آ و سینوریزوبیوم ملیلوتی بر متابولیت‌های سازگاری یونجه

مهناز ظفری[۱*]، علی عبادی[۲]، سدابه جهانبخش گده کهریز[۲]

تاریخ دریافت: ۹٤/۳/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۳۰

۱-فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیل
۲-به ترتیب استاد و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیل
*مسول مکاتبه: Email: mahnaz.zafari@yahoo.com

چکیده

کمبود آب یکی از مهمترین تنش‌های محیطی است که رشد و تولید محصول را به طرز نامطلوبی تحت تاثیر قرار می دهد و استفاده از قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های همزیست می‌توانند نقش مهمی در مقاومت به خشکی داشته باشند. بنابراین پژوهشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۰ انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل تنش خشکی در سه سطح ٪۳۵، ٪۵۵ و٪۷۵ ظرفیت زراعی (Field Capacity) و تلقیح بذور یونجه همدانی با قارچ میکوریزی گونه *Glomus mosseae*، باکتری *Sinorhizobium meliloti*، تلقیح مخلوط و شاهد (عدم تلقیح) بودند. نتایج نشان داد که در تنش شدید، میزان پرولین، قندهای محلول و کارایی مصرف آب به ترتیب ۲/٦٥ µmol/g FW، ۲/۲۱ mg/g FW، ۱/۱ g/kg نسبت به شاهد افزایش یافته بود، در حالی که غلظت نیتروژن، عملکرد کوانتومی، پروتئین محلول، آب نسبی برگ و پتانسیل اسمزی به ترتیب با مقادیر ٪۰/۵۷، ۰/۱٦، ۰/۸ mg/g FW، ٪۲۷/۸۱ و۰/٦ bar- کاهش یافتند. دربین تیمارهای تلقیحی، حداکثر و حداقل مقادیر میانگین پروتئین محلول (۵/۱۷mg/g FW، ۲/۵٦)، قند محلول (٤/٦۱ mg/g FW، ۳/۵۵)، پرولین (۵/۸ µmol/g FW، ۲/۸۳)، آب نسبی برگ (٪ ۸۱/٦۱، ۷۰/۱۲) ، غلظت نیتروژن (٪۳/۸۱، ۲/٦٦)، کارایی مصرف آب (۰/۸٦g/kg، ۰/۰۵۷) به ترتیب به تلقیح مخلوط و شاهد تعلق داشتند، در حالی که کمترین مقدار پتانسیل اسمزی (۱/٤۱ bar-) به تلقیح مخلوط و بیشترین مقدار (bar ۱/۰٦-) به شاهد تعلق داشت. عملکرد کوانتومی بین تیمارهای تلقیحی تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

واژه های کلیدی: باکتری همزیست، تنش کم‌آبی، قارچ میکوریزی، متابولیت‌های سازگاری، یونجه

Synergistic Effects of *Glomus mosseae* and *Sinorhizobium meliloti* on Compatibility Metabolites of Alfalfa

Mahnaz Zafari[1*], Ali Ebadi[2], Sodabe Jahanbakhsh Gode Kahriz[2]

Received: June 13, 2015 Accepted: June 19, 2016

1-MSc Graduate, Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Mohaghegh University of Ardabil, Iran.
2-Prof. and Assoc. Prof., Dept. of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Mohaghegh University of Ardabil, Iran.
[*] Corresponding Author: Email: mahnaz.zafari@yahoo.com

Abstract

Water deficit is one of the most important environmental stresses that adversely affect crop growth and production. Mycorrhizal fungi and symbiotic bacteria have important role in resistance to drought stress. A factorial experiment based on randomized complete block design was conducted with three replications in greenhouse, University of Mohaghegh Ardabil in 2013. Treatments were water stress at three levels (35%, 55% and 75% field capacity) and four seed inoculation as mycorrhiza (*Glomus mosseae*), Rhizobium *(Sinorhizobium meliloti*), mixed Inoculation (*Glomus mosseae* + *Sinorhizobium meliloti*) and non-inoculated as control. The results showed that in severe stress, amount of proline, soluble sugars and water use efficiency increased (2.65 µmol/g FW, 2.21 mg/g FW, 1.1 g/kg, respectively) as compared to control. While the concentration of nitrogen, quantum yield, protein, osmotic potential and relative water content (0.57% , 0.16, 0.8 mg/g.fwt, 27.81% and - 0.6 bar) decreased, respectively. In between treatments including maximum and minimum amounts averages , soluble protein (5.17, 2.56 mg/g FW), soluble sugars (4.61, 3.55 mg/g FW) proline (5.8, 2.83 µmol/g FW), relative water content (81.61, 70.12%), concentration of nitrogen (3.81, 2.66%) water use efficiency (0.86, 0.25 g/kg), respectively, were belonged to mixed inoculation and control. While the lowest amount of osmotic potential (-1.41 bar) related to mixed inoculation, and the most amount (-1.06 bar) to control. Quantum yield did not show significant difference in between the Inoculated treatments.

Keywords: Alfalfa, Metabolites Compatibility, Mycorrhizal Fungi, Symbiotic Bacteria, Water Deficit Stress

مقدمه

خشکی با ایجاد تنش کمبود عناصر غذایی در گیاه از طریق اختلال در روند جذب و تجمع عناصر غذایی باعث کاهش عملکرد گیاه می شود (چوگان ۱۳۸۳). در شرایط تنش کم آبی کاهش پتانسیل تورمی تغییراتی را در گیاه ایجاد می‌کند. از آنجایی که توسعه و رشد سلول به پتانسیل تورمی بستگی دارد، در اثر کمبود آماس، رشد سلول‌ها کاهش و اندازه آن‌ها کوچکتر می‌ماند (نونامی و همکاران ۱۹۹۷). یکی از عوامل تاثیرگذار تنش کم‌آبی ، کاهش میزان کارایی فتوسنتز از طریق افزایش فلورسانس کلروفیل است (وزان ۱۳۸۸). به منظور تعیین وضعیت فیزیولوژی گیاه و میزان آسیب وارده به دستگاه فتوسنتزی از تکنیکی به نام سنجش فلورسانس کلروفیل استفاده می‌شود. در واقع میزان فلورسانس کلروفیل

تابعی از فعالیت فتوسنتزی برگ می‌باشد که می‌تواند در تشخیص مدت تنش‌های محیطی مورد استفاده قرار گیرد (لیچتنتالر ۱۹۹۲). یکی دیگر از راهکارها برای درک توانایی گیاهان در تحمل تنش های محیطی، شناسایی تغییرات القا شده با تنش در میزان پروتئین آنهاست. با این اندیشه که سازش به تنش، ناشی از سنتز پروتئین در پاسخ به تنش‌های محیطی و تغییر بیان ژن است. (کاواساکی و بورچرت ۲۰۰۱). گزارش شده است که رشد گیاه، جذب مواد غذایی، متابولیسم و سنتز پروتئین به میزان زیادی تحت تأثیر تنش آبی قرار می‌گیرد (کوردوویلا ۱۹۹۹). در صورت ادامه تنش خشکی محتوای نسبی آب کاهش یافته و باعث تغییرهایی در غشاء سلول و در نتیجه افزایش نشت الکترولیت سلول می‌گردد (فو و همکاران ۲۰۰٤). یک استراتژی مهم در توسعه مقاومت به خشکی در گیاهان، حفظ پایداری غشاء سلول در هنگام مواجهه با تنش کم‌آبی است (واسکوئزتلو ۱۹۹۰). بیولی (۱۹۷۹) پایداری غشاء سلول در شرایط تنش را به عنوان عامل اصلی مقاومت به خشکی بیان کرد. از آنجا که تنش کم‌آبی با شروع یک تنش اکسایشی همراه است، بنابراین در شرایط کم‌آبی تولید و ذخیره گونه‌های سمی و مخرب اکسیژن آزاد افزایش می‌یابد (اینز و همکاران ۱۹۹۵). در این وضعیت چربیهای غشاء به سرعت اکسیده شده و پایداری غشاء یاخته‌ها از بین می‌رود (وانگ و یانگ ۲۰۰٤). 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 (مجیدی هروان ۱۳۷۲). اگرچه پرولین در همه اندام‌های گیاه کامل در طی تنش کم‌آبی تجمع می‌یابد ولی سریعترین انباشت را در برگها نشان می‌دهد (حیدری شریف آباد ۱۳۷۹). قندهای محلول دسته دیگری از تنظیم کننده‌های اسمزی می‌باشندکه در پاسخ به تنش‌های محیطی تجمع می‌یابند. تعیین میزان قندهای محلول نیز روشی مفید در انتخاب گونه‌های مقاوم به خشکی است (پگتر و همکاران ۲۰۰۵). واژه کارایی مصرف آب برای نشان دادن رابطه کمی میان رشد ومصرف آب به کاربرده می‌شود.آگرونومیست‌ها معمولاً کارایی مصرف آب را به صورت (عملکرد واحد سطح بر مقدار آب مصرف شده برای تولید عملکرد) تعریف می‌کنند. در شرایط محیطی مناسب گیاه از توان فتوسنتزی بالایی برخوردار بوده و در نتیجه مقدار زیادی ترکیبات کربوهیدراتی را به ریشه ارسال و از این طریق انرژی لازم جهت تثبیت نیتروژن را فراهم می‌کند، درحالیکه در شرایط تنش کم آبی، به دلیل کاهش فتوسنتز، ترکیبات کربوهیدراتی کمتری به ریشه ارسال شده و انرژی مورد نیاز برای تثبیت نیتروژن فراهم نمی‌شود (دجیکون و پلانچون ۱۹۹۱). محدودیت آب در رشد گیاه، ساختار اندام‌ها و فعالیت آنها اثرات سوئ بجای می‌گذارد (شابالا و همکاران ۲۰۰۰). تغذیه مناسب تحت شرایط تنش می تواند تا حدی به گیاه در تحمل تنش‌های مختلف کمک کند (آلوای ۲۰۰٤). با توجه به محدودیت‌های ایجاد شده در اثر کم‌آبی بر روی تثبیت نیتروژن و نیز جذب آب و آسیمیلاسیون کربن، به نظر می‌رسد تلقیح یونجه با باکتری سینوریزوبیوم و نیز قارچ میکوریز با تاثیر بر تثبیت نیتروژن و افزایش قابلیت جذب آب و برخی عناصر بتواند علاوه بر کاهش اثرات مخرب تنش کم‌آبی باعث افزایش تولید محصول شود. از طرف دیگر از آنجاکه مصرف بی رویه کودهای شیمیایی نه تنها چیزی بر محصول زمین نمی‌افزاید بلکه مشکلات زیادی از جمله آلودگی خاک و محیط زیست و افزایش نهاده‌های شیمیایی به وجود آورده است. استفاده از منابع بیولوژیک (میکروارگانیسم‌ها) می‌تواند از جنبه‌های مختلف اقتصادی، اجتماعی و زیست محیطی مفید بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای نهاده‌های شیمیایی باشد.

مواد و روش

اثر کودهای بیولوژیک در افزایش تحمل گیاه یونجه به تنش کم‌آبی در آزمایشی به صورت فاکتوریل ٤×۳ در قالب طرح پایه بلوکهای کاملا" تصادفی در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی با مختصات جغرافیایی ۳۸/۲۵ شمالی ٤۸/۳۰ شرقی در ارتفاع ۱۵۰۰ متری از سطح دریا با سه تکرار در سال ۱۳۹۰ مطالعه شد. تیمارهای آزمایش شامل تنش کم‌آبی در ۳ سطح ۳۵٪ ، ۵۵٪ و ۷۵٪ FC و تلقیح بذر یونجه (*Medicago sativa* L.) رقم همدانی با مایه تلقیح باکتری (*سینوریزوبیوم ملیلوتی*) ، قارچ میکویز گونه (*گلوموس موسه*) و تلقیح مخلوط (*سینوریزوبیوم ملیلوتی* + *گلوموس موسه*) بود. ظرفیت زراعی خاک به روش وزنی تعیین شد. برای تعیین میزان آب مورد نیاز در هر بار آبیاری، در ابتدا میزان رطوبت خاک در حد FC تعیین و سپس گلدان‌ها روزانه دو نوبت وزن شده و در صورت کمتر بودن وزن گلدان‌ها از حد معین، آب مورد نیاز جهت تامین حد رطوبتی مورد نیاز به هر گلدان اضافه شد (۱۰ درصد از وزن به عنوان تفاوت رشد گیاهان در نظر گرفته شد) (ریاحی‌نیا و همکاران ۲۰۱۳). بذور سالم و یکنواخت یونجه همدانی که از موسسه نهال و بذر کرج تهیه شده بود، به روش دستی جدا شده و سپس توسط آب مقطر استریل، شستشو داده شدند تا گرد و غبار سطحی آنها گرفته شود. سپس به مدت ۳۰ ثانیه در اتانل ۹٦ درصد قرار داده شده 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 شده و ۸ الی ۱۰ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو گردیدند. برای کاهش جمعیت قارچ‌های میکوریز بومی و سایر میکروارگانیسم‌های بومی موجود در خاک اقدام به استریل کردن خاک گردید (داد ۲۰۰۰)، و سپس گلدان‌های پلاستیکی با ظرفیت ٤ کیلوگرم خاک انتخاب و به تمام آنها مقدار مساوی خاک اضافه گردید، نتایج آزمون تجزیه خاک مورد استفاده در بخش نتایج آورده شده است (جدول ۱). در ادامه بسته به تیمار، مایه تلقیح باکتری *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (۸ میلی لیتر برای هر ۲۰۰ عدد بذر) ، قارچ میکوریز *گلوموس موسه* (۲۰ گرم از پودر برای هر ۲۰۰ عدد بذر)، تلقیح مخلوط (*سینوریزوبیوم ملیلوتی* +*گلوموس موسه*) *و شاهد* (۲۰۰ عدد بذر)، لایه ای از خاک سطح گلدانها را کنار زده و تیمارها را کشت کرده و سپس سطح آنها با خاک پوشانده شد. باکتری *سینوریزوبیوم ملیلوتی* از شرکت فناوری زیستی مهر آسیای تهران (یک لیتر برای یک هکتار برای ۲۵ کیلو بذر یونجه) و مایه تلقیح قارچ میکوریز *گلوموس موسه* از فناوری زیستی توران شاهرود (۵۰ اسپور در هر گرم پودر مایه تلقیح) تهیه شد. صفات مورد نظرآزمایش بر روی بوته‌های یونجه در مرحله گلدهی (۷۰ روز بعد از کاشت) اندازه گیری شدند. میزان پتانسیل اسمزی بافت برگ با روش جانارده‌ان و کریشنامورتی (۱۹۷۵) بر اساس هدایت الکتریکی تعیین شد. پرولین به روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) و استخراج کربوهیدرات‌های محلول به روش ایریگوئن و همکاران (۱۹۹۲) اندازه گیری شد. کارایی مصرف آب گیاه به صورت گرم ماده خشک تولید شده بر کیلوگرم آب مصرف شده محاسبه گردید (علیزاده ۱۳۸۰). عملکرد کوانتومی با استفاده از دستگاه فلورومتر (Chlorophyll Fluorometer. OS_30P, USA) اندازه گیری شد. اندازه گیری میزان RWC براساس روش ودرلی (۱۹۹۵) بود. تعیین مقدار پروتئین‌ها به روش براد فورد (برادفورد ۱۹۷۹) با استفاده از اسپکتروفتومتری انجام گرفت و غلظت نیتروژن به روش کجلدال اندازه گیری شد (کجلدال ۱۸۸۳). تجزیه آماری داده های حاصل بعد از انجام تبدیلات لازم و اطمینان از نرمال بودن داده ها توسط نرم افزار SAS انجام گرفت. و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای LSD در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه خاک مورد استفاده در پژوهش در جدول ۱ آورده شده است. اثرات اصلی و متقابل تنش کم‌آبی و تلقیح بذر بر روی صفات اندازه گیری شده معنی‌دار بود (جدول۲، ۱٪= α). با افزایش تنش کم‌آبی در همه سطوح تلقیح، میزان عملکرد کوانتومی، آب نسبی برگ، پروتئین محلول برگ، پتانسیل اسمزی و نیتروژن کاهش، اما پرولین، قندهای محلول و کارایی مصرف آب افزایش یافت.

جدول۱- نتایج تجزیه خاک مورد استفاده در آزمایش

شوری $dsm.m^{-1}$	pH	کربن آلی (٪)	نیتروژن (mg/kg)	فسفر (mg/kg)	پتاسیم (mg/kg)	رس (٪)	سیلت (٪)	شن (٪)	بافت خاک
۰/٦٢٥	۷/۸۸	۰/٦٢	۰/۰٦	۸/۵	۱۷۰	۲	۱٤	۸٤	شن لومی

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمار بذر بر روی برخی صفات فیزیولوژیک یونجه در تنش کم‌آبی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		قندهای محلول	پرولین	پتانسیل اسمزی	پروتئین	محتوای نسبی آب	کارایی مصرف آب	عملکرد کوانتومی	نیتروژن
تکرار	۲	۰/۰۰۸۳	۰/۰۰۲	۰/۰۱۱	۲/۷٦	۰/۱۹۸	۰/۰۰۰۰۰۲۱	۰/۰۱۱	۰/۰۰۳۵
تیمار	۳	۱/۸۸**	۱۳/۱٦**	۱۸/۹٤**	۱٦۹/٤۹**	۲۸٦/۱٤**	۰/۰۰۱۵**	۰/۰٤۹**	۲/۲٦ **
خشکی	۲	۱٦/۱۸**	۲۱/٦۲**	۱۱۲/۳۳**	۹٤۲/۰۷**	۲۸٤٤/۹٤**	۰/۰٤٦**	۰/۰۰۳۳**	۰/۹۷ **
تیمارخشکی*	٦	۳/٦**	۷/۸۱**	۲۷/۷۷**	۵۱۵/۹۸**	٦۱۲/۷۵**	۰/۰۰۸۹**	۰/۰٤٦**	۰/۲۰ **
خطا	۲۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۱۷	۰/۸۱	۰/۵۸	۰/۰۰۰۰۰۲۵	۰/۲۳	۰/۰۰۰۳٤
ضریب تغییرات (٪)	–	۰/ ۸۱	۰/۷۵	۳/۳۲	۲/۱۳	۱/٦٦	۲/۱۳	۱٤/۳۰	۰/۵٤

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

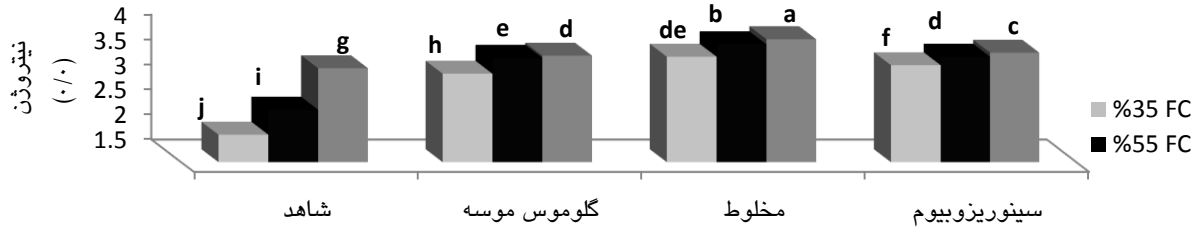
نیتروژن

با افزایش تنش کم‌آبی شاهد کاهش میزان غلظت نیتروژن در گیاه یونجه بودیم. در بین تیمارهای تلقیحی، در هر سه سطح تنش کم‌آبی، تلقیح مخلوط (۰/۲۷، ۰/۲۵ و ۰/۱۷ درصد به ترتیب در ٪۳۵، ٪۵۵ و٪ ۷۵ FC) بیشتر از تلقیح باکتری، و آن نیز (۰/۰۷، ۰/۰۲ و ۰/۱۷درصد به ترتیب در ٪۳۵، ٪۵۵ و٪ ۷۵ FC) بیشتر از تیمار قارچ میکوریز بود. حداقل مقدار غلظت نیتروژن به تیمار شاهد تعلق داشت. جذب عناصر غذایی تحت تاثیر برخی عوامل مانند جریان توده‌ای آب می‌باشد و تنش کم آبی منجر به کاهش جریان توده‌ای آب و در نتیجه موجب اختلال در جذب عناصر غذایی می‌شود (گراهام و همکاران ۱۹۹۱). خشکی با ایجاد تنش کمبود عناصر غذایی در گیاه، موجب اختلال در روند جذب و تجمع عناصر غذایی شده و در نتیجه باعث کاهش عملکرد گیاه می شود (چوگان و همکاران ۱۳۸۳). افزایش غلظت نیتروژن در تلقیح با *سینوریزوبیوم ملیلوتی* توسط فضائلی و همکاران (۱۳۸۹) نیز گزارش شده است. تیمار قارچ میکوریز نسبت

به شاهد دارای نیتروژن بیشتری بود که احتمالا به دلیل افزایش جذب آب و در نتیجه افزایش جذب نیتروژن ناشی از گسترش هیف‌ها باشد.

متابولیت‌های سازگاری (قندهای محلول و پرولین)

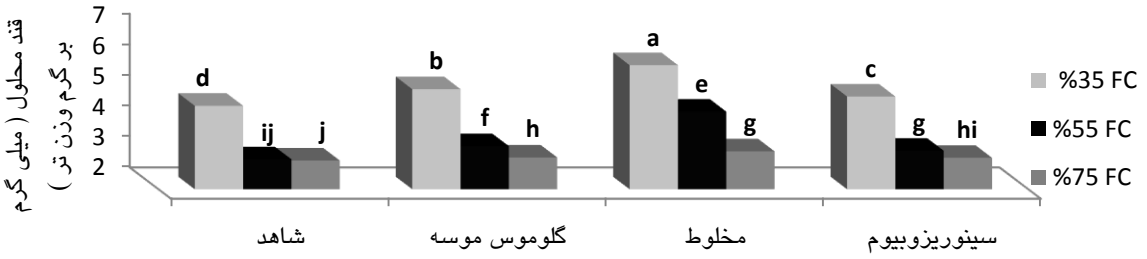
با افزایش تنش کم‌آبی میزان قندهای محلول به شدت افزایش یافت (شکل ۲)، در هر سه سطح تنش کم-آبی تلقیح مخلوط دارای حداکثر مقدار قندهای محلول بود (٦/٠٥، ٤/٥٤ و ٣/٢٤ میلی گرم بر گرم به ترتیب در ٪٣٥، ٪٥٥ و٪ ٧٥ FC) و بعد از آن تیمار قارچ میکوریز نسبت به تیمار باکتری از مقدار قند بیشتری برخوردار بود (٠/٢٤ ، ٠/١٥ و ٠/٠١ میلی گرم بر گرم به ترتیب در ٪٣٥، ٪٥٥ و٪ ٧٥ FC) و حداقل مقدار در هر سطح ٪٣٥، ٪٥٥ و٪ ٧٥ FC به شاهد تعلق داشت (٤/٧٣، ٢/٩٨ و ٢/٩٤ میلی گرم بر گرم).



شکل۱- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی برای مقدار نیتروژن یونجه

میزان پرولین نیز همانند قندهای محلول با تشدید تنش افزایش یافت (شکل ۳). در این نمودار در سطح ٪٣٥ بیشترین میزان پرولین با ٢/٣٧ میکرومول بر گرم اختلاف از شاهد، با مقدار ٧/١٤ میکرومول بر گرم وزن تر متعلق به تلقیح دوگانه بود. در بین دو تیمار تلقیحی دیگر میزان پرولین در تیمار قارچ میکوریز به میزان ٠/٤٧ میکرومول بر گرم بیشتر از *سینوریزوبیوم ملیلوتی* بود. شایان ذکر است که در دو سطح ٪٥٥ و ٪٧٥ FC نیز بیشترین میزان پرولین به ترتیب به تلقیح مخلوط (٥/٦٢ و ٤/٦٤ میکرومول بر گرم)، تیمار قارچ میکوریز (٤/٣٣ و ٣/٢٣)، باکتری (٣/٨ و ٢/٧) و در نهایت به شاهد (٢/٢٣ و ١/٤٩) تعلق داشت. با افزایش شدت تنش کم آبی میزان تولید متابولیت های سازگاری قندهای محلول و پرولین افزایش یافت و بیشترین و کمترین میزان تولید آنها به-ترتیب به تلقیح دوگانه و شاهد تعلق داشت. در هر دو شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌شود که تیمارهای تلقیح بخصوص تلقیح دوگانه با هر کاهش در میزان دسترسی به آب عکس العمل نشان داده و بر میزان تولید متابولیت-های سازگاری افزوده است درحالیکه تیمار شاهد در بین سطوح تنش تنها در FC ٣٥٪ بیشترین میزان متابولیت‌ها را داشت. با مقایسه این دو نمودار چنین به نظر میرسد که میزان تولید پرولین به تولید قندهای محلول ارتباط دارد. 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 چنانچه ایریگوئن و همکاران (١٩٩٢) نیز تشدید بیوسنتز اسیدآمینه پرولین را ناشی از تامین متابولیت α-گلوتارات توسط قندها گزارش کرده اند. شاید دلیل افزایش تولید پرولین و قندهای محلول با افزایش تنش کم‌آبی کاهش میزان غلظت پتاسیم باشد، زیرا با کاهش پتاسیم به عنوان تنظیم کننده اسمزی میزان تولید قندهای محلول و پرولین افزایش می یابد که

بجای پتاسیم نقش تنظیم کننده اسمزی را ایفا کنند این افزایش قندهای محلول و پرولین با کاهش پتاسیم احتمالا ناشی از تخریب پروتئین‌ها و نشاسته می‌باشد که با کاهش پتاسیم صورت گرفته و به ترتیب موجب تولید پرولین و قندهای محلول میشود. بر اساس نتایج پژوهش عزت و همکاران (۲۰۰۵)، پتاسیم نقش زیادی در سنتز پروتئین و متابولیسم کربوهیدرات دارد. بنابراین احتمال دارد با کاهش پتاسیم مقدار پروتیین و نشاسته کاهش یابد. قربانلی و نیاکان (۱۳۸٤) نیز از دلایل تجمع پرولین در شرایط تنش، به تخریب پروتئین‌ها و انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد در جهت تنظیم اسمزی سلول اشاره کرده اند. همچنین رفیعی و همکاران (۲۰۰۸) 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 ممکن است به افزایش جذب عناصر غذایی بخصوص نیتروژن مربوط باشد که در تلقیح دوگانه به دلیل اثر سینرژیستی میکوریز و باکتری میزان جذب نسبت به حالت انفرادی بیشتر بود. به نظر مارشنر (۱۹۹۵) بیشتر این ترکیبها مانند پرولین دارای ساختار نیتروژنی هستند. از این رو افزایش جذب نیتروژن می‌تواند تا حد زیادی سبب افزایش مقدار آنها در گیاه شود. اثر سینرژیستی به این دلیل میباشد که طبق نظر موسه و همکاران (۱۹۸٦) گره-های سینوریزوبیوم به دلیل نیاز شدیدی که به فسفر دارد به تلقیح با AM واکنش مثبت نشان دهد. همچنین طبق نظر بایانسیاتو و همکاران (۲۰۰۱) سینوریزوبیوم‌ها به هیفهای AM چسبیده و از آن به عنوان راه نفوذ به ریشه استفاده میکنند. بنابراین احتمال دارد سینوریزوبیوم ها نیز با گسترش هیفها گسترش یابند و میزان فعالیت آنها افزایش یابد. غلظت عناصر غذایی در تلقیح دوگانه بیشتر از تلقیح انفرادی بود (ظفری و همکاران، ۱۳۹٤). افزایش جذب عناصر ماکرو و میکرو ضروری در اثر تلقیح دوگانه قارچ میکوریز و باکتری همزیست در یافته‌های سلیمان و همکاران (۲۰۱۱) نیز اشاره شده است.

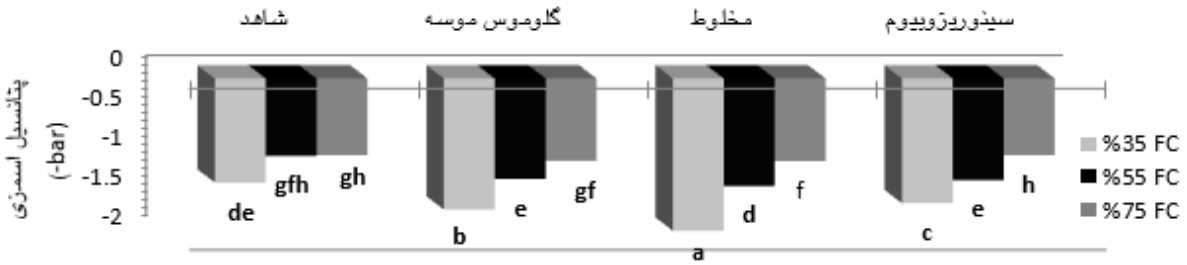


شکل۲- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی برای مقدار قندهای محلول یونجه

شکل۳- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی برای مقدار پرولین یونجه

پتانسیل اسمزی

در سطح ٪۳۵ حداقل و حداکثر پتانسیل اسمزی با مقدار ۱/۸۹ و ۱/۲۹۱ بار منفی به ترتیب به تلقیح توام و شاهد تعلق داشت و تیمار قارچ میکوریز با ۰/۰۸٦ بار منفی کمتر از تیمار باکتری بود. در سطح٪۵۵ نیز حداقل و حداکثر میزان پتانسیل اسمزی با ۱/۳۳٤- و۰/۹۵۹ – متعلق به تلقیح مخلوط و شاهد بود، و تیمارهای میکوریز و باکتری در یک دامنه آماری قرار داشتند. ولی در سطح٪۷۵ ، تیمار شاهد با تیمار قارچ میکوریز و باکتری در یک دامنه آماری قرار داشتند و تیمار تلقیح مخلوط نیز با تیمار قارچ میکوریز در یک دامنه آماری بود، ولی با شاهد و تیمار باکتری به ترتیب ۰/۰۷۳ و ۰/۰۷۵ کاهش نشان داد. با مقایسه تغییرات متابولیت‌های سازگاری پرولین و قندهای محلول با تغییرات پتانسیل اسمزی (شکل ٤) نشان می‌دهد که با افزایش شدت کم آبی و افزایش تولید متابولیت‌های سازگاری میزان پتانسیل اسمزی کاهش یافته و در نتیجه با حفظ آماس سلول موجب حفظ بقای گیاه در شرایط تنش می‌شود.

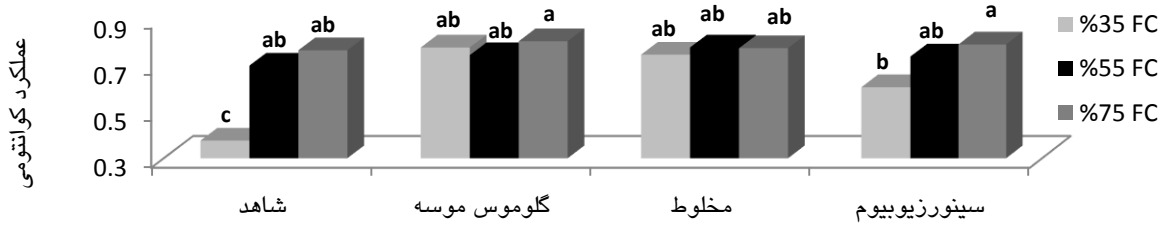


شکل ۴- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی برای مقدار پتانسیل اسمزی یونجه

بیشتر بودن میزان تولید این دو متابولیت سازگاری در تلقیح دوگانه موجب شد پتانسیل اسمزی این تیمار درپایین‌ترین سطح قرار گیرد و بدین‌طریق میزان جذب آب افزایش یابد و آماس سلول در بیشترین باشد. کاهش معنی دار پتانسیل اسمزی می‌تواند به دلیل از دست دادن آب آزاد در سلول‌ها و یا به دلیل وجود سازوکار فعال در جذب و یا تولید و انباشت املاح کاهنده پتانسیل اسمزی درمحیط سلول و یا هر دو باشد. بالا رفتن کربوهیدرات‌های محلول و پرولین برگ در اثر تشدید تنش در پژوهش‌های آرزمجو و همکاران (۱۳۸۹) نیز گزارش شده است.

عملکرد کوانتومی : کمترین عملکرد کوانتومی در سطح ٪۳۵ شاهد مشاهده شد (شکل ۵)، و با کاهش تنش میزان آن افزایش یافت. ممکن است دلیل این کاهش به طور مستقیم به کاهش آماس و جذب عناصر غذایی و غیر مستقیم به کاهش رنگدانه‌های فتوسنتزی مربوط باشد با مقایسه نمودار پرولین متوجه رابطه همبستگی مثبت بین آنها می‌شویم. با توجه به تاثیر قارچهای میکوریزی و سینوریزوبیوم ملیلوتی در افزایش جذب نیتروژن که در ساختمان کلروفیل شرکت دارد(باسول، ۱۹۸۵) و آهن که برای ساختمان کلروفیل ضروری است (ملکوتی و همکاران، ۱۳۸٤) با افزایش رنگدانه‌های کلروفیل میزان نور دریافتی بیشتر و به عبارتی از فلورسانس یا برگشت نور جلوگیری میکند. علاوه بر آن با افزایش جذب آب توسط افزایش تولید تنظیم کننده‌های اسمزی (پرولین و قندهای محلول) آماس سلول‌ها دوباره برقرار شده و متعاقبا رشد سلول‌ها افزایش می‌یابد که به احتمال قوی منجر به افزایش کلروفیل و در نتیجه فتوسنتز می‌شود. با افزایش فتوسنتز از یک طرف و تجمع پرولین از طرف دیگر نسبت $NADPH/NADP^+$ تعدیل

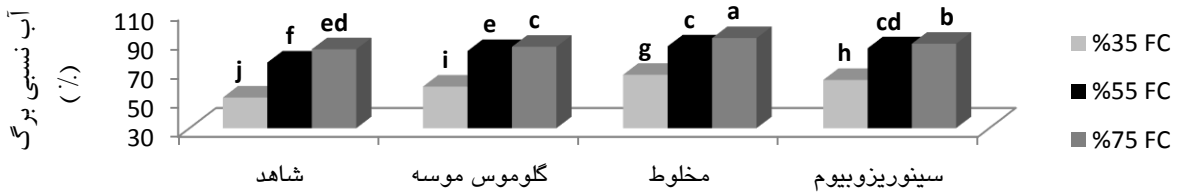
شده که باعث جلوگیری از پدیده بازدارندگی نوری می-شود. زیرا همانطور که پیشتر اشاره شد پرولین باعث خنثی سازی رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. بیشترین عملکرد کوانتومی درحضور تیمار قارچ میکوریز وباکتری *سینوریزوبیوم* به دست آمد، اما اختلاف معنی-داری بین تلقیح انفرادی و مخلوط آنها مشاهده نشد. بسیاری از مطالعات نشان داده است که کاهش دسترسی به نیتروژن عملکرد کوانتومی انتقال الکترون فتوسیستم۲ وحداکثر کارایی آنرا کاهش می‌دهد، همچنین کمبود نیتروژن باعث تخریب فتوسیستم۲ می‌شود (کونمینگ و یانگ، ۲۰۰۰). با افزایش فلورسانس کارآئی فتوسیستم و انتقال الکترون کاهش یافته و تأمین الکترون مورد نیاز برای تثبیت بیولوژیک نیتروژن با اختلال مواجه می‌گردد. براساس گزارش وزان (۲۰۰۰) و محمدیان و همکاران (۲۰۰۳) تنش خشکی موجب کاهش عملکرد کوانتومی(Fv/Fm) در ژنوتیپهای مختلف چغندرقند شد. افزایش عملکرد کوانتومی (F_v/F_m) نشانگر این است که تنش‌های محیطی تاثیری بر کارایی فتوسنتز ندارد (پاکنژاد و همکاران، ۲۰۰۷).



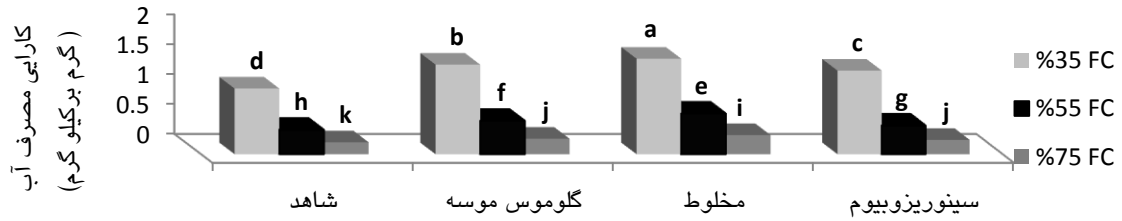
شکل ۵- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی برای عملکرد کوانتومی

آب نسبی برگ : با افزایش تنش کم‌آبی آب نسبی برگ کاهش یافت (شکل ٦). محتوی آب نسبی در تنش شدید(٪۳۵ FC) در هر چهار تیمار با اختلاف معنی دار نسبت به هم به ترتیب تلقیح مخلوط (٦٦/٦٩)، تیمار *سینوریزوبیوم* (٦٣/١٦)، تیمار قارچ میکوریز (٥٨/٥٨) و شاهد (٥١/٠٧ درصد) بود. در سطح ٪٥٥ تیمار تلقیح مخلوط و تیمار باکتری در یک دامنه آماری بوده و به ترتیب بیشتر از تیمار قارچ میکوریز و شاهد بوده و در سطح ٪٧٥ دوباره تیمار تلقیح مخلوط دارای حداکثر، و شاهد دارای حداقل مقدار آب نسبی برگ بودند و بین دو تیمار قارچ میکوریز و تیمار باکتری، تیمار باکتری با ۲/۰۹ درصد اختلاف معنی دار از تیمار قارچ میکویز بیشتر بود. بیشتر بودن آب نسبی برگ در تیمار تلقیح دوگانه و میکوریز را می‌توان به جذب بیشتر آب توسط هیفها اشاره کرد. اما از آنجایی که تیمار سینوریزوبیوم فاقد هیف می‌باشد بایستی عامل دیگری جز افزایش جذب آب نیز در بالا بردن آب نسبی برگ دخیل باشد پس ممکن است جذب نیتروژن نیز دخیل باشد. بنابراین در حضور تلقیح دوگانه با افزایش ساخت نیتروژن توسط باکتری ودرنتیجه افزایش غلظت نیتروژن در گیاه، و همچنین افزایش جذب آب ناشی از گسترش هیف‌های قارچ میکوریز در محیط ریشه بیشترین RWC در حضور تلقیح تیمار قارچ میکوریز و*سینوریزوبیوم* (تلقیح دوگانه) به دست آمد، علاوه بر آن با افزایش پرولین و قند های محلول در حضور تلقیح دوگانه میزان RWC نیز افزایش می‌یابد که احتمالا به دلیل حفظ آماس است. در اثر تغذیه گیاه با نیتروژن (سانوکا و همکاران ٢٠٠٤) آب نسبی برگ افزایش می‌یابد. آلام و هیدر (۲۰۰۷) به افزایش آب نسبی برگ به واسطه‌ی افزایش میزان نیتروژن اشاره کرده‌اند.

کارایی مصرف آب: با افزایش شدت تنش کم‌آبی ، کارایی مصرف آب به شدت کاهش یافت، و در تمامی سطوح تنش، به ترتیب در ٪۳۵، ٪۵۵ و٪۷۵ FC، تیمار تلقیح مخلوط (۰/۲، ۲ و ۰/۸ گرم در کیلوگرم) بیشتر از میکوریز، تیمار قارچ میکوریز (۰/۱ و ۰/۰۸ گرم در کیلوگرم در ٪۳۵ و ٪۵۵ FC) بیشتر از تیمار باکتری، و تیمار باکتری (۰/۳، ۰/۰۷ و ۰/۰٤ گرم در کیلوگرم) با اختلاف معنی دار بیشتر از شاهد بود (شکل ۷). شایان ذکر است که در سطح ٪۷۵ تیمار قارچ میکوریز و باکتری در یک دامنه آماری قرار داشتند. تنش کم‌آبی با کاهش جذب پتاسیم و با توجه به نقش پتاسیم در باز و بسته شدن روزنه‌ها (تراگتون ۱۹۷۵) با کاهش پتاسیم، روزنه-ها بسته شده و میزان هدایت روزنه‌ای و تعرق کاهش، و کارایی مصرف آب افزایش یافته است. همچنین با مقایسه نمودار قندهای محلول و پرولین شکل ۲ و ۳ و این شکل شاهد رابطه متقابل مثبت بین ۳ شکل هستیم. ممکن است با افزایش تولید تنظیم کننده‌های سلولی، آماس سلول حفظ شده و باعث تقسیم سلولی شود و از آنجاییکه تعرق انجام نمی‌گیرد بنابراین میزان تولید نسبت به آب مصرفی افزایش می‌یابد. طبق همه این نتایج بیشترین WUE باید به ترتیب به تلقیح دوگانه، تیمار قارچ میکوریز *گلوموس موسه* و باکتری *سینوریزوبیوم* متعلق باشد که شکل ۷ همین نتایج را نشان می‌دهد. افزایش میزان کارایی مصرف آب در اثر کاهش تعرق در نتایج صنایعی (۱۳۹۰) نیز گزارش شده است. در تنش کم‌آبی میزان بیشترین کارایی مصرف آب در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریز *گلوموس فاسیکولاتوم* در یافته های (ناگاراتنا و همکاران ۲۰۰۷) نیز دیده شده است.



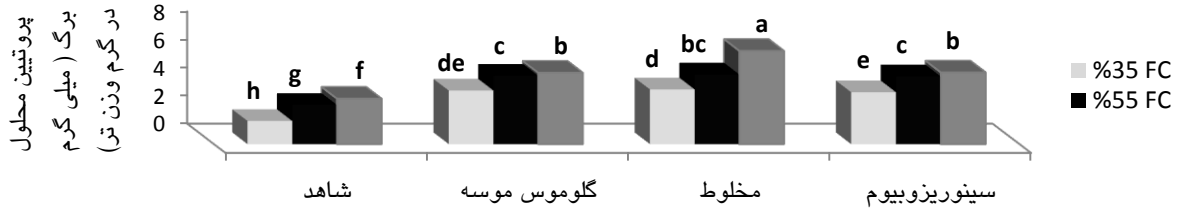
شکل ۶- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی بر RWC



شکل ۷- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی برای کارایی مصرف آب

پروتئین‌های محلول برگ: با افزایش شدت تنش میزان پروتئین‌های محلول برگ به شدت کاهش یافت (شکل ۸). در تنش ٪۳۵، تیمارهای تلقیح مخلوط، با تلقیح قارچ میکوریز اختلاف معنی داری نداشتند و تیمار قارچ میکوریز با تیمار باکتری نیز در یک دامنه آماری بودند، اما تیمار تلقیح مخلوط با ۰/۳ میلی گرم در گرم وزن تر

اختلاف معنی‌دار، بیشتر از تیمار *سینوریزوبیوم* بود. و حداقل پروتئین محلول برگ در این سطح به شاهد با میزان ۱/٦٥ میلی گرم در گرم وزن تر تعلق داشت. میزان پروتئین در تنش ٪۵۵، هر سه تیمار تلقیحی *گلوموس موسه* ، توام و *سینوریزوبیوم* در یک دامنه آماری بوده و از شاهد بیشتر بودند. تیمار شاهد با ۲/۸ میلی گرم در گرم حداقل مقدار پروتئین را در این سطح داشت. در آبیاری نرمال یا ٪۷۵ ، حداکثر و حداقل مقدار پروتئین محلول با مقادیر ٦/٦٥ و ۳/۲٤ میلی گرم در گرم به ترتیب به تلقیح مخلوط و شاهد تعلق داشت و دو تیمار تلقیحی دیگر در یک دامنه قرار گرفتند. این نمودار با نمودار آب نسبی برگ در شکل ٦، رابطه متقابل مثبت و با نمودار پرولین شکل ۳ رابطه عکس دارد. فتحی امیر خیز و همکاران (**۱۳۹۰**) گزارش نمودند که محلول پاشی عنصر آهن به صورت خاکی و برگی، تاثیری مثبت در افزایش مقدار پروتیین‌های محلول برگ در تنش کم‌آبی داشت. تغییر در محتوای پروتئین‌های محلول برای درک اثرات تنش بر روی پروتولیز سلول و سنتز پروتئین بسیار مهم است (سانتوز و کالدریا **۱۹۹۲**). از طرف دیگر همانطور که در بحث پرولین و قندهای محلول ذکر شد پتاسیم در ساخت پروتئین نقش دارد و با کاهش پتاسیم در اثر تنش کم‌آبی، پروتئین ها تخریب شده و بنابراین میزان آنها کاهش می‌یابد. از آنجا که نیتروژن در گیاهان به صورت پروتئین تکامل می‌یابد و یکی از منابع ساخت نیتروژن باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن می‌باشند لذا در تلقیح دوگانه با توجه به تثبیت نیتروژن توسط باکتری و افزایش جذب نیتروژن و پتاسیم توسط هیف های قارچ میکوریز، بیشترین پروتئین حاصل می‌شود. یکی از تغییرات عمده بیوشیمیایی که در اثر کاهش رطوبت خاک در گیاهان زراعی روی می‌دهد، تغییر در میزان تولید پروتئین‌های گیاهی می‌باشد (داسگوپتا و بولی **۱۹۸۴**). تنش رطوبتی وضعیت پلی رایبوزوم های مؤثر در ساخته شدن پروتئین ها را در بافت ها تغییر می دهد . تعداد پلی رایبوزوم ها در شرایط کم آبی کاهش یافته و میزان آن بسته به گونه های مختلف گیاهی متفاوت می باشد (اسکات و همکاران **۱۹۷۹**).



شکل ۸- ترکیب تیماری تلقیح بذر یونجه و سطوح تنش کم‌آبی برای پروتئین‌های محلول برگ

منابع مورد استفاده

آرزمجو ا، حیدری م، قنبری ا، ۱۳۸۹ .بررسی تنش خشکی و سه نوع کود بر عملکرد گل، پارامترهای فیزیولوژیک و جذب عناصر غذایی درگیاه دارویی بابونه (*Matricaria chamomilla* L.). فصلنامهٔ علمی پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۵(٤):٤٩٢-٤٨٢.

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

حیدری شریف آباد ح، ۱۳۷۹. گیاه، خشکی و خشکسالی. انتشارات موسسه تحقیقات جنگلها ومراتع کشور.

صنایعی س، ۱۳۹۰. تاثیر نیتروژن معدنی بر رشد و کارایی مصرف نیتروژن در یونجه تحت شرایط خشکی. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت، دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی.

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

علیزاده ا،۱۳۸۰ . رابطه آب و خاک، انتشارات آستان قدس رضوی.

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(۳): ۵۱۸-۵۰۹.

فضائلی ع، بشارتی ح، پیرولی بیرانوند ن، ۱۳۸۹. تأثیر شوری بر کارایی همزیستی سینوریزوبیومملیلوتی با ارقام مختلف یونجه. مجله پژوهشهای خاک (علوم خاک و آب). ۲۴(۳): ۲۶۳-۲۵۳.

قربانلی م، نیاکان م، ۱۳۸٤ . بررسی اثر تنش خشکی بر روی میزان قندهای محلول، پروتئین، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز گیاه سویا رقم گرگان ۳. نشریه علوم (دانشگاه خوارزمی)، ۵(۲): ۵۵۰-۵۳۷.

ملکوتی م ج، طباطبایی ج، کافی م، ۱۳۸٤. روش‌های نوین تامین به موقع عناصر غذایی در گیاهان. انتشارات سنا.

ظفری م، عبادی ع، پرمون ق، جهانبخش س، ۱۳۹٤. اثر ریز جانداران محرک رشد گیاه بر افزایش کارایی مصرف آب یونجه در شرایط محدودیت آبی. علوم و فنون کشت‌های گلخانه‌ای، ٦(۲۳): ۱۲٤-۱۰۹.

وزان س، .۱۳۸۸ بررسی فلورسانس کلروفیل، کارایی فتوسنتز و رابطه آنها با هدایت روزنه‌ای و عملکرد ژنوتیپ‌های چغندرقند در شرایط تنش خشکی. مجله تنش‌های محیطی در علوم گیاهی، ۱(۱): ۱۰۱-۸۹.

Allam MZ, Haider SA, 2007. Accumulation of Protein, Chlorophyll and Relative Leaf Water Content in Barley (*Hordeum Vulgare* L.) In Relation to Sowing Time and Nitrogen Fertilizer. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 3(3): 149-152.

Alloway BJ, 2004. Zinc in Soils and Crop Nutrition. International Zinc Association, Belgium.

Bewley JD, 1979. Physiological aspects of desication tolerance. Annual Review Plant physiology, 30: 195-233.

BianciottoV, Andreotti S, Balestrini R, Bonfante P and Perotto S, 2001. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. European Journal of Histochemistry, 45: 39-49.

Boswell FC, Meisinger JJ and Case WL, 1985. Production, marketing and use of nitrogen fertilizers. In Fertilizer Technology and Use. 3 rd ed. SSSA Madison, WI. pp. 229-292.

Bradford MM, 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.

Conming L and Zang J, 2000. Photosynthetic CO_2 assimilation chlorophyll fluorescence and photoihibiton as affected by nitrogen deficiency in maize plants. Plant Science, 151: 135-143

Cordovilla MDP, 1999. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia Faba* L.). Applied Soil Ecology, 11:1-7

Dasgupta J and Bewley JD, 1984. Variation in protein synthesis in different regions of greening leaves of barley seedlings and effects of imposed water stress. Journal of Experimental Botany, 35:1450- 1459.

Djekoun A and Planchon C, 1991. Water status effect on dinitrogen fixation and Photosynthesis in soybean. Agronomy Journal, 2:316-392.

Ezzat ZM, Khalil KM, Khalil AA, 2005. Effect of natural potassium fertilizer on yield. Yield components and seed composition of lentil in old and new reclaimed lands. Egypt, Journal of Applied Science, 20: 80-92

Fu J, Fry J and Huang B, 2004. Minimum water requirements of four turfgrasses in the transition zone. HortScience, 39:1740-1744.

Graham RD and Webb MJ. 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.4

Inze D and Van Montagu M, 1995. Oxidative stress in plants. Current Opinion in Biotechnology, 6:153-158

Irigoyen JJ, Emerich DW, Sanchez-Diaz M, 1992. Alfalfa leaf senescence induced by drought stress: photosynthesis, hydrogen peroxide metabolism, lipid peroxidation and ethylene evaluation. Physiologia Plantarum, 84:67-72.

Janardhan K, Krishnamorthy V, 1975. A rapid method for determination of osmotic potential of plant cell Current Science, 44 (1): 390-391

Kawasaki S and Borchert C, 2001. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in Rice. The Plant Cell,13: 889-905.

Kjeldahl J. 1982. A new method for the determination of nitrogen in organic bodies. Analytical Chemistry, 22: 366.

Lichtenthaler HK, 1992. The kaustky effect: 60years of chlorophyll fluorescence induction kinetics. Photosynthetica, 27: 45-55.

Marschner H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd Academic Press. Ltd. London.

Mohammadian R, Rahimian H, Moghaddam M and Sadeghian SY, 2003. Effect of early drought stress on sugar beets chlorophyll fluorescence. Pakistan Journal Biological Sciences, 6(20): 1763-1769

Mosse B, 1986. Mycorrhiza in a sustainable agriculture. Biological Agriculture and Horiculture, 3: 191-209.

Nagarathna TK, Prasad TG, Bagyaraj DJ and Shadakshari YG, 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.

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

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

Paknejad F, Majidiheravan E, Noor mohammadi Q, Siyadat A and Vazan S, 2007. Effects of drought stress on chlorophyll fluorescence parameters, chlorophyll content and grain yield of wheat cultivars. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 5(4):162-169.

Rafiee M, Lari H, and Abdipoor F. 2008. Change of corn cultivars carbohydrate under drought stress. 10th Iranian Cong. of Agronomy and Plant Breeding Science, 318p.

Saneoka H, Moghaieb REA, Premachandra GS 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.

Santos CV and Caldeira G, 1999. Comparative responses of *Helianthus annuus* plants and calli exposed to NaCl. I. Growth rate and osmotic adjustment in intact plants and calli. Journal of Plant Physiology, 155, 769-777.

Scott NS, Munns R and Barlow EWR, 1979. Polyribosome content in young and eged wheat leaves subjected to drought. Journal of Experimental Botany, 30:905- 91.

Shabala S, Babourina O and Newman L, 2000. Ion-specific mechanisms of osmo-regulation in bean mesophyll cells Journal of Experimental Botany,51: 1243 - 1253.

Soliman Amira Sh , Shanan Nermeen T, Massoud Osama N, Swelim DM, 2011. Improving salinity tolerance of *Acacia saligna* (Labill.) plant by Arbuscular mycorrhiza*l* fungi and *Rhizobium* inoculation. Journal of Biotechnology Africa, 11(5): 1259-1266.

Synerri CLM, Pizino C and Navari-Izzo F, 1993. Chemical changes and O2 production in thylakoid membranes under water stress, Plant Physiology, 87: 211-216.

Tarumingkeng RC and Coto Z, 2003. Effects of drought stress on growth and yield of soybean. @2003 Kisman, Science Philosopy PPs 702, Term paper, Graduate School, Borgor Agricultural University (Institut Ppertanian Bogor), December 2003.

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

Vasquez-Tello A, 1990. Electrolyte and Pi leakages and soluble sugar content as physiological test for screening resistance to water stress in *Phaseolus* and *Vigna* species, Journal of Experimental Botany, 41(8):827-832.

Wang Z and Huang B, 2004. Physiological recovery of Kentucky bluegrass from simultaneous drought and heat stress. Crop Science, 44:1729-1736.

Weatherley PE, 1995. Studies in water relation of cotton plants, the field measurement of water deficit in leaves. New Phytology, 49: 81-87.