

بررسی تحمل به تنش خشکی دو رقم گندم تلقیح شده با رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه

(PGPR) تحت شرایط گلخانه

افشین مظفری^{۱*}، داود حبیبی^۲، احمد اصغرزاده^۳ و مسعود مشهدی اکبر بوجار^۴

(۱) استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد ایلام، دانشگاه آزاد اسلامی، ایلام، ایران.

(۲) دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

(۳) عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج، ایران.

(۴) دانشیار گروه علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

* نویسنده مسئول: afshin.mozafari@ilam-iau.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۱/۳۱

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۰۵

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی تحمل به تنش خشکی دو رقم گندم تلقیح شده با رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج اجرا شد. آزمایش به صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار بود. کرت اصلی شامل دو سطح آبیاری مطلوب و تنش خشکی (کم آبیاری در مرحله گرده افشانی تا پایان رسیدگی کامل) و کرت‌های فرعی شامل باکتری‌های PGPR در چهار سطح (۱) تلقیح بذر با *Azotobacter chroococcum*، (۲) تلقیح بذر با *Azospirillum lipoferum*، (۳) مصرف همزمان هردو باکتری *Azospirillum lipoferum* + *Azotobacter* و (۴) عدم کاربرد باکتری (شاهد) و دو رقم گندم شامل سیروان و مرودشت بود. صفات آزمایش شامل فعالیت آنزیم اکسیدانسی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فعالیت بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) میزان کلروفیل a، b و a+b بودند. نتایج آزمایش نشان داد، اثر ساده تیمارهای آبیاری، رقم و باکتری بر کلیه صفات مطالعه شده معنی دار ($P \leq 0.01$) بود. میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) در تیمار تنش خشکی بالاتر از تیمار آبیاری کامل (نرمال) بود. رقم سیروان و مرودشت به ترتیب با ۳/۶ و ۲/۷ واحد بر گرم پروتئین میزان فعالیت آنزیم SOD بیش تر و کم تری را نشان دادند. رقم سیروان در مقایسه با رقم مرودشت از میزان فعالیت بیومارکر MDA (۲۷/۴۲۴ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) کم تر و محتوی کلروفیل a، b و a+b به ترتیب با ۳/۲۵۵، ۱/۵۷۸ و ۴/۸۱۱ (میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بیش تری برخوردار بود. در مقابل، رقم مرودشت در مقایسه با رقم سیروان از میزان بیومارکر MDA (۳۱/۷۵۲ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بیش تر و محتوی کلروفیل a، b و a+b به ترتیب با ۲/۷۴۷، ۱/۳۳۰ و ۴/۰۳۲ (میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) کم تری برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، بیومارکر مالون دی آلدئید و کلروفیل.

مقدمه

گندم یکی از محصولات استراتژیک در دنیا است که بالغ بر ۴۵ درصد پروتئین و ۵۵ درصد از کالری مورد نیاز انسان را تأمین می‌کند (نورمحمدی و همکاران، ۱۳۷۸). خشکی و تنش ناشی از آن از جمله عوامل مهمی است که تولیدات کشاورزی را در ایران با محدودیت روبرو ساخته و بازده استفاده از مناطق خشک را کاهش می‌دهد. کشور ایران با متوسط بارندگی سالانه حدود ۲۲۰ میلی‌متر به استثنای برخی استان‌های واقع در شمال کشور که در مجاورت دریای خزر قرار گرفته‌اند، جزء مناطق خشک دنیا محسوب شده و در اغلب استان‌ها گیاه زراعی گندم با خطر جدی تنش خشکی به‌ویژه پس از مرحله گل‌دهی مواجه می‌باشد (Ehdaie, 1995). رایزوباکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR)، گروهی از باکتری‌ها هستند که قادرند به‌طور فعال ریشه‌های گیاه را آلوده کرده و رشد گیاه را افزایش دهند (Kloepper and Schroth, 1978). در این بین باکتری‌های جنس‌های ازوتوباکتر، آزوسپیریلوم و سودوموناس به‌عنوان باکتری‌های PGPR از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. اخیراً به نقش ریزجانداران در سازگاری گیاهان نسبت به تنش خشکی توجه بیشتری شده است (East, 2013). این راهبرد یعنی استفاده از باکتری‌های آزادزی محرک رشد گیاه (PGPR) جهت افزایش تحمل گیاه زراعی در برابر تنش‌های غیرزنده از جمله تنش خشکی نه تنها آسان، بلکه کم هزینه و اقتصادی نیز است (Kim et al., 2013; Timmusk and Wagner, 1999; Yang et al., 2009). برهمکنش گیاه با ریزجانداران خاک شرایط خوبی را برای گیاه در برابر تنش کم آبی فراهم می‌سازد (Verma et al., 2016). توانایی باکتری‌های PGPR در بالابردن و بهبود رشد گیاه و نقش آن‌ها در افزایش تحمل گیاه به تنش خشکی اولین بار توسط Timmusk و Wagner (۱۹۹۹) گزارش شده است. باکتری‌های PGPR علاوه بر افزایش قدرت محصول‌دهی و ایمنی گیاه باعث فعال شدن سامانه القای تحمل (ISR)^۱ در برابر تنش‌های غیرزنده نظیر تنش خشکی و شوری در گیاه می‌شود (Yang et al., 2009; Timmusk و Wagner (۱۹۹۹) بیان داشتند که در سطوح نسخه‌برداری^۲، باکتریوم PGPR باعث القای ژن‌های مسئول در تنش خشکی^۳ و به دنبال آن افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش خشکی می‌شود. باکتری‌های حل‌کننده فسفر علاوه بر افزایش جذب فسفر در گیاه زراعی ذرت توانستند رشد گیاه را بهبود بخشیده و باعث افزایش تحمل ذرت در برابر تنش خشکی شوند (Ehteshami et al., 2009; Vardharajula و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند باکتری‌های PGPR باعث القای تحمل به تنش خشکی در گیاه ذرت می‌شوند. Kasim و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی به‌منظور کنترل تنش خشکی در گندم با استفاده از باکتری‌های محرک رشد دریافتند که تلقیح باکتریایی به‌طور قابل ملاحظه‌ای میزان آسیب

¹ Induced systemic tolerance, ISR.

² Transcriptional level.

³ Drought-responsive gene.

حاصل از تنش خشکی را در گیاه گندم کاهش داد. آن‌ها نیز اشاره داشتند که باکتری‌های محرک رشد از طریق سازوکارهای متعددی چه به صورت مستقیم و غیر مستقیم باعث افزایش تحمل گیاه گندم در برابر تنش خشکی می‌شوند. آن‌ها نیز بیان داشتند که مکانیزم‌های القاء بیان ژن‌های مسئول تنش خشکی نظیر (SAMS1, APX1 و HSP17.8) در برگ‌های گندم باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های چرخه آسکوربیت-گلوتاتیون ریداکس^۴ می‌شود (Kasim et al., 2013).

باکتری‌های PGPR و قارچ‌های میکوریزا پتانسیل بالا و خوبی جهت تعدیل و تنظیم پاسخ‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه در برابر تنش خشکی داشته و به همین خاطر باعث افزایش بقای گیاه تحت شرایط سخت و متنوع محیطی می‌شوند (Redman et al., 2011; Marasco et al., 2012). باکتری‌های PGPR با تولید بیوفیلیم^۵ و ترشح اگزوپلی ساکاریدها^۶ و نیز تحریک گیاه به تولید حفاظت کننده‌های اسمزی^۷ و پروتئین‌های شوک گرمایی^۸ اثر مثبتی بر سازگاری و تحمل گیاه به تنش خشکی دارند (Grover et al., 2010). اگزوپلی ساکاریدها (EPS) تولید شده توسط ریزجانداران، جزء فعال ماده آلی خاک را تشکیل داده (Verma et al., 2016) و بخش عمده‌ای از فضای خارج سلولی جرم باکتری (دامنه ای بین ۴۰ تا ۹۵ درصد) را در بر می‌گیرند (Wingender and Flemming, 2001). EPS ها وظایف حیاتی در حفاظت نظیر جذب سطحی^۹، تشکیل بیوفیلیم، تشکیل اجتماع میکروبی، افزایش تعامل بین گیاه و ریزجانداران و زیست پالایی^{۱۰} ایفاء می‌کنند (Verma et al., 2016). اگزوپلی ساکاریدها تولید شده توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه نظیر آزوسپریلوم (*Azospirillum*) با بهبود ساختمان و ذرات خاک، باعث تحمل بهتر گیاه به تنش خشکی می‌شود (Verma et al., 2016). برخی از نژادهای باکتری‌های PGPR با رهاسازی ترکیبات آلی فرار (VOCs)^{۱۱} به صورت مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش زیست توده، بالا رفتن تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی و مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شوند (Liu and Zhang, 2015). برخی نژادهای PGPR نظیر *Pseudomonas aeruginosa* سویه Pa2 با تولید اگزوپلی ساکریدها، توانایی باکتری‌ها را جهت حفظ محتوی رطوبت خاک و افزایش تحمل گیاه در برابر تنش خشکی، افزایش می‌دهند (Naseem and Bano, 2014). بعضی ترکیبات آلی فرار باکتریایی^{۱۲} نظیر استیک اسید که جزء اصلی اگزوپلی ساکریدها می‌باشد قادر به القاء تشکیل بیوفیلیم در خاک هستند (Chen et al., 2015). بنابراین این امکان وجود

⁴ Ascorbate–glutathione redox cycle.

⁵ Biofilm.

⁶ Exopolysaccharides.

⁷ Osmoprotectors.

⁸ Heat shock proteins.

⁹ Surface attachment.

¹⁰ Bioremediation.

¹¹ Volatile Organic Compounds, VOCs.

¹² Bacterial VOCs.

دارد که برخی باکتری‌های PGPR حاوی VOCs با تولید اگزوپلی ساکریدها، تحمل گیاه را در برابر تنش خشکی افزایش دهند (Liu and Zhang, 2015). تنش خشکی اثر فیزیولوژیکی و بیولوژیکی متنوعی را در گیاه ایجاد کرده و می‌تواند منجر به ممانعت از فرآیندهای بیوشیمیایی مهمی نظیر فتوسنتز، تنفس و اسیمیلاسیون عناصر غذایی گیاهی شود. برخی گیاهان بر اثر آسیب‌های ناشی از تنش‌های محیطی نظیر خشکی، شوری و غیره، تنش اکسیداتیو^{۱۳} را تحریک می‌کنند که این منجر به تولید و انباشته شدن گونه‌های اکسیژن واکنش‌گر^{۱۴} (ROS) نظیر رادیکال‌های سوپراکسید (O_2^-), رادیکال‌های هیدروکسیل ($\text{OH}^\bullet$), اکسیژن یکتایی ($\text{O}^\bullet$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2), می‌شود (Price and Henry, 1989; Smirnoff, 1993). گونه‌های فعال اکسیژن^{۱۵} (AOS) که در طی تنش تولید می‌شوند قادرند ترکیبات آلی سلولی نظیر کربوهیدرات‌ها، لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک (نظیر DNA) را تخریب کنند. بیومارکرهای بیوشیمیایی مالون‌دی‌آلدهید^{۱۶} (MDA)، دی‌تیروزین^{۱۷} (D-T) و دی‌هیدروکسی‌دی‌گوانوزین^{۱۸} (8-2-OH-dG) به ترتیب حاصل تجزیه لیپید، پروتئین و اسیدهای نوکلئیک ناشی از تنش اکسیداتیو در گیاه هستند. هرچه میزان این نشانگرهای زیستی^{۱۹} در گیاه افزایش یابد نشان دهنده بالا بودن اثر تخریبی ناشی از تنش است (Chen *et al.*, 2000). گیاهان برای مقابله با هجوم این گونه‌های فعال اکسیژن (AOS)، دارای سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی از نوع آنزیمی هستند (Larson, 1988; Price and Henry, 1989; Smirnoff, 1993). آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی نظیر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز^{۲۰} (SOD)، کاتالاز^{۲۱} (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز^{۲۲} (GPX)، پروکسیداز^{۲۳} (POX)، گلوتاتیون ردکتاز^{۲۴} (GR)، آسکوربیک پروکسیداز (APX) و گلوتاتیون S-ترانسفراز (GST) قادرند سلول‌های گیاهی را در برابر دامنه وسیعی از تنش‌های زنده و غیر زنده محافظت کرده و رادیکال‌های اکسیژن فعال (AOS) حاصل از این تنش را در گیاه طی واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء از بین برده یا به اصطلاح جاروب^{۲۵} کرده و آنها را به مولکول‌های آب (H_2O) و اکسیژن (O_2) احیاء کنند (Gill and Tuteja, 2010; Agarwal and Pandey, 2004). در شرایط تنش خشکی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی SOD، POD، CAT و APX جهت مقابله با گونه‌های اکسیژن فعال (AOS) افزایش می‌یابد (Cakmakci *et al.*

¹³ Oxidative stress.

¹⁴ Reactive Oxygen Species.

¹⁵ Active Oxygen Species.

¹⁶ Malondialdehyde.

¹⁷ 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-2-OH-DG).

¹⁸ Oxygen Species.

¹⁹ Phytoindicators.

²⁰ Superoxide dismutase.

²¹ Catalase.

²² Glutathion peroxidase.

²³ Proxidase.

²⁴ Glutathion redoctase.

²⁵ Scavenging.

(Patel and Hemantaranjan, 2012; al., 2009) مقدار بیومارکر مالون دی آلدئید (MDA) و پرواکسید هیدروژن (H_2O_2) به عنوان نشان گرهای فیزیولوژیکی گیاه در برابر تنش به کار رفته و سطوح بالای هردوی آنها در شرایط تنش خشکی شدید، نشان دهنده ایجاد تنش اکسیداتیو می باشد (Erdogan et al., 2016). میزان فعالیت آنزیم های اکسیدانسی POD، SOD و CAT و مقدار بیومارکر MDA نشانگرهای گیاهی مفید جهت ارزیابی درجه تحمل گیاهان زراعی در برابر تنش خشکی می باشد (Zhang et al., 2011). PGPR های القاء کننده تحمل به تنش خشکی نیز می توانند از طریق بالابردن پاسخ های آنتی اکسیدانی در سطح فعالیت آنزیمی و افزایش تجمع متابولیت ها باعث افزایش تحمل گیاه گندم به تنش خشکی شوند (Chakraborty et al., 2013). Erdogan و همکاران (۲۰۱۶) نتیجه گرفتند که بوته های تلقیح شده با باکتری های محرک رشد گیاه از فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانسی (SOD، CAT، GR، POD و APX) بالاتری برخوردار بودند و در مقابل میزان بیومارکر مالون دی آلدئید (MDA) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) آنها پایین بود. Islam و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی اثر باکتری های محرک رشد گیاه بر تحمل گیاه ماش به تنش شوری از طریق تنظیم دفاع آنتی اکسیدانسی نتیجه گرفتند که تحت شرایط تنش، بوته های تلقیح شده با باکتری های PGPR در مقایسه با بوته های تلقیح نشده از میزان کلروفیل، مقدار فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانسی SOD، POD و CAT بالاتر و مقدار بیومارکر MDA و پرواکسید هیدروژن (H_2O_2) کمتری برخوردار بود. Islam و همکاران (۲۰۱۵) نیز نتایج مشابهی در ارتباط با اثر گونه *Pseudomonas aeruginosa* روی تحمل گیاه گندم در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش فلز روی را گزارش کردند. مشاهده شده است که بالا بودن میزان تجمع پرولین و بیان ژن آنزیم های جاروب کننده گونه های اکسیژن واکنش گر^{۲۶} در بوته های تیمار شده با باکتری های PGPR نقش مهمی در بالابردن تحمل آنها نسبت به تنش های مختلف از جمله خشکی، شوری و سمیت فلزات سنگین ایفاء می کند (Gururani et al., 2013). با توجه به مباحث بالا در این پژوهش سعی شد اثر باکتری های محرک رشد گیاه بر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانسی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فعالیت بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) میزان کلروفیل a، b و a+b در دو رقم گندم نان تحت شرایط تنش خشکی و نرمال مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش ها

این تحقیق به منظور بررسی بیومولکولی تحمل به تنش خشکی دو رقم گندم تلقیح شده با رایزوباکتری های محرک رشد گیاه (PGPR) در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲ در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج اجرا شد. آزمایش به

²⁶Gene expression of ROS-scavenging enzymes.

صورت اسپلیت فاکتوریل (جهت مدیریت بهتر و دقیق‌تر آبیاری از این طرح آماری استفاده شد) در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. کرت اصلی شامل دو سطح آبیاری کامل و تنش خشکی (کم آبیاری در مرحله گل‌دهی تا پایان رشد گیاه) بودند و در کرت‌های فرعی، چهار سطح باکتری PGPR (عدم مصرف باکتری (شاهد)، مصرف تکی از تو باکتر کروکوکوم (سویه ۱۲)^{۲۷}، مصرف تکی باکتری آروسپریلوم لیپوفرولم (سویه ۲۸) (of)، مصرف هردوی این باکتری‌ها به عنوان فاکتور اول و دو رقم گندم نان مرودشت (به‌عنوان رقم حساس) و رقم سیروان (به‌عنوان رقم متحمل) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شد. در این پژوهش صفات مورد مطالعه شامل فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، فعالیت بیومارکر بیوشیمیایی مالون‌دی‌آلدهید (MDA) میزان کلروفیل a، b و a+b بودند. خاک مورد مطالعه را از الک دو میلی‌متری عبور داده و یک نمونه از آن را برای تجزیه به آزمایشگاه خاک فرستاده شد. بستر کاشت شامل گلدان‌های پلاستیکی با ارتفاع ۴۰ و قطر ۲۰ سانتی‌متر که حاوی هشت کیلوگرم خاک خشک لومی رسی، کود حیوانی پوسیده و شن به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ بودند. کودهای شیمیایی فسفره و پتاسه و ۱/۳ کود نیتروژن پیش کاشتی مورد نیاز را براساس آزمون خاک (جدول ۱) قبل از کاشت با خاک گلدان‌ها مخلوط کرده و سپس بذرها براساس نوع تیمار به تعداد ۳۰ بذر در هر گلدان کشت شدند.

جدول ۱: مشخصات شیمیایی و فیزیکی خاک محل آزمایش (عمق نمونه برداری ۳۰-۰ سانتی متری خاک)

اسیدیته (pH)	شوری (EC) (Ds/m)	یافت خاک	شن (%)	رس (%)	لای (%)	مواد آلی (%)	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاس قابل جذب (ppm)	نیتروژن کل (%)
۷/۰۴	۱/۲	لوم رسی شنی	۵۶	۲۴	۲۰	۰/۶	۱۱	۳۲۰/۲۳	۰/۰۸

پس از اطمینان از سبز شدن بوته‌های موجود در هر گلدان، عملیات تنک کردن صورت گرفت و تراکم نهایی به ۱۰ عدد بوته در هر گلدان رسید. کود سرک ازته در دو مرحله پنجه زنی و ساقه رفتن به خاک گلدان‌ها اضافه شد. عملیات آبیاری در هر دو تیمار آبیاری کامل و تنش خشکی تا مرحله گرده‌افشانی و باروری (مقیاس زادوکس GS69) با توجه به مراحل رشد، وضعیت ظاهری گیاه و رطوبت موجود در خاک شبیه هم بود. اما در تیمار تنش خشکی، آبیاری پس از مرحله GS69 تا پایان دوره رشد گیاه و رسیدگی کامل دانه به‌صورت کم‌آبیاری (حجم آب آبیاری در این تیمار بر اساس ۳۰ درصد از کل آب مورد نیاز جهت آبیاری کامل معین شد) اعمال شد. مبارزه با علف‌های هرز نیز به‌صورت مکانیکی (وجین دستی) به‌صورت هم‌زمان و یک‌نواخت انجام گرفت. سویه‌های باکتری‌ها به‌صورت خالص (فرموله شده در موسسه تحقیقات خاک و آب کرج) قبل از کاشت با بذور گندم تلقیح شد و بلافاصله پس از کاشت، آبیاری صورت گرفت. جهت سنجش

²⁷ *Azotobacter chroococcum* strain 12.

²⁸ *Azospirillum lipoferum* strain of.

صفات آزمایشی، در مرحله شیری-خمیری دانه از هر گلدان چند نمونه برگ سبز (ترجیحا برگ پرچم) انتخاب و پس از قرار گرفتن در مخازن ازت مایع و فریز شدن جهت اندازه‌گیری صفات بیومولکولی به آزمایشگاه منتقل شدند. سنجش فعالیت SOD براساس روش Minami و Yoshikawa (۱۹۷۹) انجام گردید. محلول واکنش شامل بافر تریس با غلظت ۵۰ میلی‌مول (mM) با $\text{pH} = 8/2$ به همراه ۰/۱ میلی‌مول (mM) از EDTA، مقدار ۱/۴۲ درصد از Triton X-100 و ۰/۰۵ میلی‌مول (mM) از نیترو بلو تترازولیم و پیرگالول با غلظت ۱۶ میلی‌مول (mM) بود که به دو میلی‌لیتر (mL) از آبن محلول برای انجام واکنش ۱۰۰ میکرولیتر (μL) عصاره بافت گیاه اضافه شد و در دمای آزمایشگاه بعد از یک دقیقه تغییر جذب نوری آن در ۵۲۰ نانومتر (nm) با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. بر اساس منحنی استاندارد، مقدار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) مشخص گردید. بیومارکر مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با روش Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) ارزیابی شد. جهت اندازه‌گیری مالون‌دی‌آلدئید دو برگ از گیاه استخراج و با آب مقطر شستشو داده شد، سپس ۰/۲ گرم بافت گیاهی (برگ یا ریشه)، به قطعات کوچک تقسیم و با هموژنایزر در دو میلی‌لیتر محلول تری کلرو استیک اسید پنج درصد در مجاورت یخ هموژن گردید. سپس در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و محلول روئی برداشت شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از این محلول با ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول تیوباربیتوریک اسید و تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد مخلوط و در ۹۶ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ دقیقه خوابانده (انکوبه) شد. سپس در شرایط سرد در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ گردید. جذب محلول روئی در ۵۳۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. از محلول تیوباربیتوریک اسید و تری‌کلرواستیک ۲۰ درصد به‌عنوان شاهد استفاده شد. مقدار بیومارکر مالون دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از منحنی استاندارد تعیین گردید.

جهت اندازه‌گیری کلروفیل a و b ابتدا ۰/۲ گرم برگ (ترجیحا برگ پرچم) از هر گلدان انتخاب و درون یک هاون چینی ریخته و به آن یک گرم سولفات منیزیم و ۱۰ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد اضافه گردید و آنقدر در هاون ساییده شد تا خمیری شل حاصل گردید. هاون مربوطه را در داخل ظرف آب و یخ قرار گرفت. ضمناً آزمایشگاه حتی‌الامکان باید تاریک باشد تا فعل و انفعالات شیمیایی به حداقل برسد. سپس خمیر شل حاصله را برداشته و در داخل سانتریفوژ با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت پنج دقیقه قرار داده و سانتریفیوژ گردید، سپس مقدار یک سی‌سی از این عصاره هموژن (سوپرناتانت) را با نه میلی‌لیتر استن داخل سل‌های دستگاه اسپکتروفتومتر ریخته و در طول موج‌های ۶۴۷ نانومتر (nm) برای کلروفیل a و ۶۶۳ نانومتر (nm) برای کلروفیل b میزان جذب نور قرائت شد و از فرمول‌های زیر مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل a+b به‌دست آمد، ضمناً دستگاه قبل از آزمایش با استون خالص کالیبره گردید (Porra et al., 1989; Zhang, 1990).

رابطه ۱: $\text{Chl a (mg/L)} = (12.25 \times A_{663}) - (2.79 \times A_{647})$

رابطه ۲: $\text{Chl b (mg/L)} = (21.5 \times A_{647}) - (5.1 \times A_{663})$

رابطه ۳: $\text{Chl a+b (mg/L)} = (7.15 \times A_{663}) - (18.71 \times A_{647})$

کلیه محاسبه‌های آماری و تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۱۶، و همچنین مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. تمامی نمودارها و جداول به ترتیب از طریق نرم افزارهای Excel و Word نسخه ۲۰۱۰ ترسیم شدند.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج جدول ۲، اثر ساده تیمارهای آبیاری، رقم، و باکتری‌های PGPR بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز معنی دار ($P \leq 0.01$) شد. بر اساس جدول ۳، فعالیت آنزیم SOD در تیمار تنش خشکی (۴/۲۳۹ واحد بر گرم پروتئین) بیش‌تر از تیمار آبیاری کامل (۲/۰۸۶ واحد بر گرم پروتئین) بود (شکل ۱). این مسئله نشان دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) تحت شرایط تنش خشکی و فعال شدن سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی جهت از بین بردن آن‌ها است (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰). بر اساس جدول ۳، رقم سیروان با ۳/۵۹۵ واحد بر گرم پروتئین نسبت به رقم مرودشت با ۲/۷۳ واحد بر گرم پروتئین از نظر مقدار فعالیت آنزیم SOD برتر بود (شکل ۲). بالاتر بودن فعالیت آنزیم SOD رقم سیروان نسبت به رقم مرودشت نشان‌گر توان دفاع آنتی اکسیدانتی آنزیمی بالای این رقم در برابر تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی می‌باشد. بر اساس نتایج جدول ۳، تیمار مصرف توام و عدم مصرف باکتری‌های PGPR به ترتیب با ۴/۱۱ و ۲/۳ واحد بر گرم پروتئین بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم SOD را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریلوم هردو در یک گروه آماری مشترک (b) قرار گرفتند (شکل ۵). به‌طورکلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های PGPR به‌ویژه مصرف توام آن‌ها در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR باعث شد تا میزان فعالیت آنزیم SOD گیاه گندم افزایش یابد که این بیان‌گر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش میزان تحمل گیاهان زراعی در برابر تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی است. با توجه به نتایج جدول ۲، برهمکنش دوگانه باکتری و آبیاری بر میزان فعالیت آنزیم SOD معنی دار ($P \leq 0.01$) تشخیص داده شد. در شرایط تنش خشکی مصرف توام باکتری‌های PGPR و عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۵/۷۳۷ و ۲/۸۰۷ (واحد بر گرم پروتئین) بالاترین و پایین‌ترین میزان فعالیت آنزیم SOD را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). به‌طور کلی هم در شرایط نرمال و هم تنش خشکی مصرف باکتری‌های PGPR باعث ارتقای میزان فعالیت آنزیم SOD شد. بالا بودن میزان فعالیت آنزیم SOD در

تیمار مصرف توام باکتری بیان گر اثر سینرژیستی (هم افزایی) بین آن ها است. این باکتری ها از سازوکارهای مختلف جهت بهبود رشد و افزایش تحمل گیاه نسبت به شرایط تنش خشکی استفاده می کنند.

جدول ۲: نتایج تجزیه واریانس صفات آزمایش در تیمارهای مورد مطالعه

میانگین مربعات					درجه آزادی (df)	منابع تغییرات (SOV)
کلروفیل (a+b)	کلروفیل (b)	کلروفیل (a)	مالون دی آلدئید (MDA)	سوپراکسید دیسموتاز (SOD)		
۰/۷۷۶ ^{ns}	۰/۰۱۸ ^{ns}	۰/۴۶۳ ^{ns}	۳۶/۰۷۱ ^{ns}	۰/۲۶۸ ^{ns}	۲	تکرار
۳۸/۸۰۸ ^{oo}	۳/۷۸۶ ^{oo}	۱۹/۳۱۷ ^{oo}	۶۴۶/۲۸۷ ^{oo}	۵۵/۶۲۵ ^{oo}	۱	آبیاری
۱/۵۹۸	۰/۱۵۴	۰/۶۹۴	۶۰/۷۳۶	۰/۰۵۰	۲	اشتباه (a)
۷/۲۸۵ ^{oo}	۰/۷۳۵ ^o	۳/۰۹۶ ^{oo}	۲۲۴/۷۷۰ ^o	۸/۹۸۴ ^{oo}	۱	رقم
۰/۱۶۸ ^{ns}	۰/۰۱۶ ^{ns}	۰/۰۳۹ ^{ns}	۳۶/۱۴۰ ^{ns}	۰/۱۰۶ ^{ns}	۱	آبیاری × رقم
۹/۴۳۷ ^{oo}	۰/۷۹۹ ^{oo}	۴/۳۱۶ ^{oo}	۳۰۹/۷۰۹ ^{oo}	۶/۷۹۴ ^{oo}	۳	باکتری
۰/۳۳۶ ^{ns}	۰/۰۶۹ ^{ns}	۰/۰۶۳ ^{ns}	۱۱۹/۶۵۳ ^o	۲/۵۶۳ ^{oo}	۳	آبیاری × باکتری
۰/۲۳۵ ^{ns}	۰/۰۳۳ ^{ns}	۰/۱۳۵ ^{ns}	۲۳/۳۲۰ ^{ns}	۰/۳۳۱ ^{ns}	۳	رقم × باکتری
۰/۰۵۹ ^{ns}	۰/۰۲۹ ^{ns}	۰/۰۲۴ ^{ns}	۲/۴۵۷ ^{ns}	۰/۰۴۵ ^{ns}	۳	آبیاری × رقم × باکتری
۰/۶۶۸	۰/۰۹۳	۰/۳۵۷	۳۵/۷۸۷	۰/۳۴۳	۲۴	اشتباه
۱۸/۴۸	۸/۷۰	۱۹/۹۰	۲۰/۲۲	۷	-	ضریب تغییرات (درصد)

ns، * و **: به ترتیب بیان گر عدم اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطح پنج و یک درصد هستند.

جدول ۳: مقایسه میانگین صفات آزمایش در سطوح مختلف تیمارهای مورد مطالعه

کلروفیل a+b (mg/g.Fw)	کلروفیل b (mg/g.Fw)	کلروفیل a (mg/g.Fw)	مالون دی آلدئید (MDA) (μg/g.Fw)	سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (U/g.protein)	تیمارهای آزمایشی
۵/۳۲۰ a	۱/۷۳۵ a	۳/۶۳۵ a	۲۵/۹۱۹ b	۲/۰۸۶ b	نرمال
۳/۵۲۲ b	۱/۱۷۳ b	۲/۳۶۷ b	۳۳/۲۵۷ a	۴/۲۳۹ a	تنش
۴/۰۳۲ b	۱/۳۳۰ b	۲/۷۴۷ b	۳۱/۷۵۲ a	۲/۷۳۰ b	مروودشت
۴/۸۱۱ a	۱/۵۷۸ a	۳/۲۵۵ a	۲۷/۴۲۴ b	۳/۵۹۵ a	سیروان
۳/۴۸۰ c	۱/۱۶۴ c	۲/۳۸۳ c	۳۵/۹۴۵ a	۲/۳۰۰ c	عدم مصرف
۴/۴۱۹ b	۱/۴۷۰ b	۲/۹۴۱ b	۲۹/۵۸۱ b	۳/۲۹۵ b	مصرف ازوتوباکتر
۴/۱۷۶ b	۱/۳۹۳ bc	۲/۸۵۸ bc	۲۹/۳۱۷ b	۲/۹۴۷ b	مصرف آروسپیریوم
۵/۶۱۰ a	۱/۷۸۸ a	۳/۸۲۲ a	۲۳/۵۱۰ c	۴/۱۰۶ a	مصرف توام

در هر ستون، میانگین هایی که حروف غیر مشترک دارند، دارای اختلاف معنی دار به روش دانکن در سطح احتمال خطای پنج درصد هستند.

نتایج آزمایشات نشان داده که میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز SOD و میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی‌آلدید (MDA) در تیمار تنش خشکی بیشتر از تیمار آبیاری نرمال (آبیاری کامل) بوده که این نشان‌دهنده بالا رفتن مقدار گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) در گیاه در شرایط تنش خشکی می‌باشد (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰، Jaleel et al., 2007a; Mozafari, 2014). آنزیم آنتی‌اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز SOD یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی است که با شناسایی رادیکال سوپراکسید (O_2^-) آنرا به مولکول‌های آب (H_2O) و اکسیژن (O_2) تجزیه می‌کند.

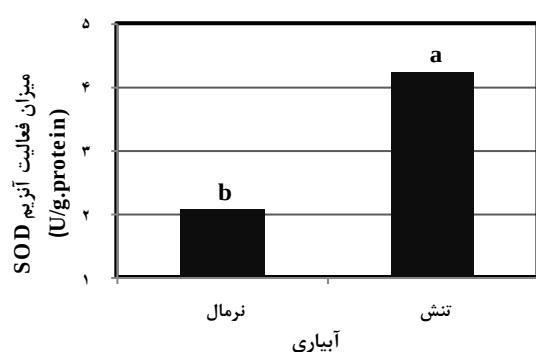
آزمایشات متعدد در گونه‌های مختلف گیاهان در گلخانه و مزرعه وجود افزایش قابل توجهی در فعالیت این آنزیم‌ها را در مقابله با تنش خشکی تایید کرده است. در صورتی‌که این دفاع موفق به از بین بردن رادیکال‌ها نشود، تخریب‌های اکسیداتیو توسعه پیدا کرده و محصولات تخریبی شامل مالون دی‌آلدید (MDA) (حاصل تخریب لیپیدها) و دی‌هیدروکسی‌دی‌اکسی‌گوانوزین (8-2-OH-DG) (حاصل تخریب اسیدهای نوکلئیک) و دی‌تیروزین (D-T) (حاصل تخریب پروتئین‌ها) افزایش می‌یابند (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰). افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در بررسی‌های Diaz و همکاران (۲۰۰۵) بروی گیاه لوتوس ژاپنی و بررسی‌های Jaleel و همکاران (۲۰۰۷b) که اثرات خشکی بروی گیاه *Aatharanthus roseus* را مورد بررسی قرار داده‌اند نیز گزارش شده است. در تحقیق ما، باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR) به‌ویژه تیمار مصرف توام با تقویت سیستم دفاع آنزیم آنتی‌اکسیدانتی و افزایش کلروفیل باعث افزایش تحمل ارقام گندم نسبت به شرایط تنش خشکی شدند. Mozafari (۲۰۱۴) در مطالعه‌ای با عنوان تاثیر باکتری‌های PGPR بر فعالیت آنزیم SOD، بیومارکر MDA و پرولین در دو رقم گندم تحت شرایط تنش خشکی نتیجه گرفتند که تنش خشکی با افزایش ROS باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم SOD در مقایسه با تیمار آبیاری کامل (نرمال) شد.

مصرف باکتری‌های PGPR به‌ویژه مصرف توام آن‌ها (*Azotobacter*+*Azospirillum*+*Pseudomonas*) باعث افزایش فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتی SOD و کاهش میزان بیومارکر بیوشیمیایی MDA در ارقام گندم شد.

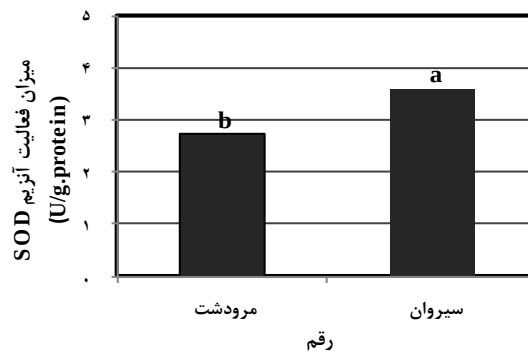
بر اساس جدول ۳، میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی‌آلدید (MDA) تیمار تنش خشکی (۳۳/۲۵۷ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) بیش‌تر از تیمار آبیاری کامل (۲۵/۹۱۹ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) بود (شکل ۳). این مسئله نشان‌دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن (AOS) تحت شرایط تنش خشکی و تخریب غشاهای زیستی در اثر هجوم گونه‌های اکسیژن‌واکنش‌گر (ROS) می‌باشد (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰). به عبارت دیگر در شرایط تنش خشکی میزان تولید ROS بالا رفته و این اکسیژن‌های سمی باعث پراکسیده شدن فسفولیپیدهای موجود در غشاء سیتوپلاسمی شده و نهایتاً میزان مالون دی‌آلدید (MDA) که حاصل تخریب چربی‌ها است، افزایش می‌یابد. براساس جدول ۲، عامل

رقم اثر معنی داری ($P \leq 0.05$) بر میزان بیومارکر MDA گذاشت. با توجه به جدول ۳، رقم سیروان میزان بیومارکر MDA (با ۲۷/۴۲۴ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) کمتری را در مقایسه با رقم مرودشت (با ۳۱/۷۵۲ میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) به خود اختصاص داد (شکل ۴). پایین بودن مقدار بیومارکر MDA در رقم سیروان نسبت به رقم مرودشت نشان-دهنده توان دفاع آنتی اکسیدانتی آنزیمی بالای این رقم در برابر تنش اکسیداتیو و کاهش میزان تخریب اکسیداتیو غشاءهای زیستی در بود. بنابراین می توان نتیجه گرفت که رقم سیروان در مقایسه با رقم مرودشت از میزان تحمل بالایی در برابر تنش خشکی برخوردار است. همچنین نتایج آزمایش نشان داد که تیمار مصرف توام باکتری های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۲۳/۵۱۰ و ۳۵/۹۴۵ (میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) کم ترین و بیش ترین میزان بیومارکر MDA را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آروسپیریوم در یک گروه آماری مشترک (b) قرار گرفتند (جدول ۳ و شکل ۶). به طور کلی در شرایط تنش خشکی، مصرف منفرد و توام باکتری های PGPR باعث شد تا میزان بیومارکر MDA گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) کاهش بیشتری یابد که این بیانگر اثر مثبت باکتری های PGPR در افزایش میزان تحمل گیاهان زراعی در برابر تنش های محیطی به ویژه تنش خشکی است. برهمکنش دوگانه باکتری و آبیاری بر میزان بیومارکر MDA معنی دار ($P \leq 0.05$) بود (جدول ۲). در شرایط تنش خشکی، مصرف توام باکتری و عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۲۵/۴۵۳ و ۴۴/۳۴۸ (میکروگرم بر گرم وزن تازه بافت) پایین ترین و بالاترین میزان بیومارکر MDA را به خود اختصاص دادند. به طور کلی هم در شرایط نرمال و هم تنش خشکی مصرف باکتری های PGPR باعث کاهش میزان بیومارکر MDA شد. پایین بودن میزان بیومارکر MDA در تیمار مصرف توام باکتری به دلیل استفاده این باکتری ها از سازوکارهای مختلف جهت بهبود رشد و تحمل گیاه در شرایط تنش خشکی می باشد. بسیاری از محققان به این نتیجه رسیدند که تحت شرایط تنش های محیطی نظیر تنش خشکی، شوری، گرما، فلزات سنگین میزان گونه های فعال اکسیژن (AOS) یا گونه های اکسیژن واکنش گر (ROS) در گیاه افزایش یافته و نهایتاً این گونه های سمی اکسیژن در گیاه باعث ایجاد تنش اکسیداتیو می شود (مشهدی اکبر بوجار، ۱۳۹۰، مظفری و همکاران، ۱۳۹۴، Mozafari, 2012). ROS ها با تخریب لیپیدها، پروتئین ها، اسیدهای نوکلئیک (DNA)، کلروفیل و دیگر ترکیبات آلی در گیاه، باعث کاهش رشد و قدرت محصول دهی گیاه می شوند (Mozafari et al., 2015). گونه های اکسیژن واکنش گر (ROS) با پراکسیداسیون لیپیدهای غشاءهای سلولی باعث شکسته شدن پیوندهای بین مولکول گلیسرول و اسیدهای چرب شده که به دنبال آن بیومارکر مالون دی آلدید (MDA) تولید می شود که هر چه میزان آن در گیاه افزایش یابد نشان دهنده شدت آسیب تنش ها از جمله تنش خشکی است. جهت مقابله با ROS ها و تنش اکسیداتیو

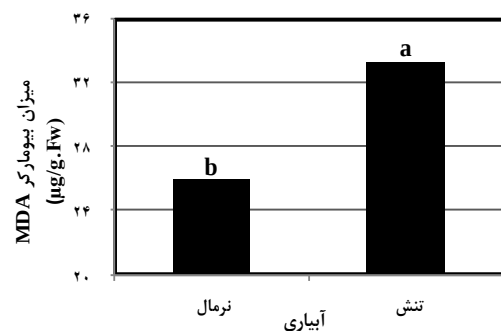
ناشی از تنش خشکی گیاه با استفاده از سیستم دفاع آنزیمی باعث جاروب کردن گونه های فعال اکسیژن (AOS) می شوند.



شکل ۱: اثر آبیاری بر میزان فعالیت آنزیم SOD



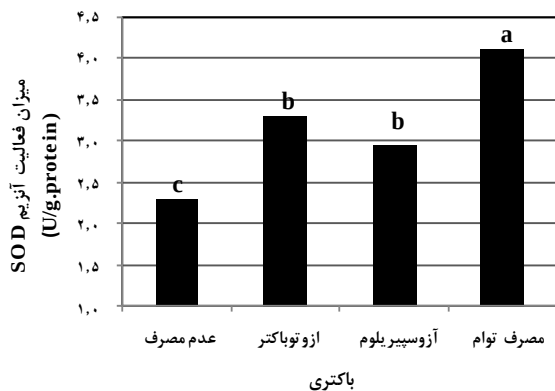
شکل ۲: اثر رقم بر میزان فعالیت آنزیم SOD



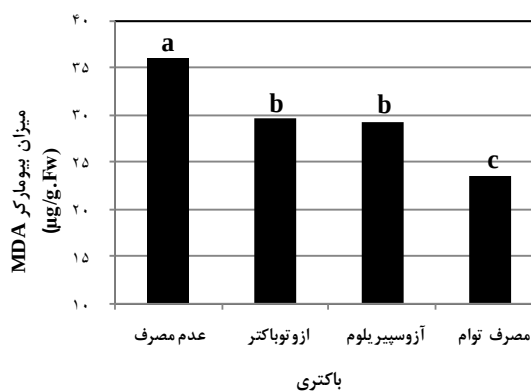
شکل ۳: اثر آبیاری بر بیومارکر MDA



شکل ۴: اثر رقم بر بیومارکر MDA



شکل ۵: اثر باکتری بر میزان فعالیت آنزیم SOD



شکل ۶: اثر باکتری بر میزان بیومارکر MDA

بر اساس جدول ۲، اثر اصلی آبیاری، ارقام گندم و باکتری بر روی محتوی کلروفیل a بسیار معنی‌دار ($P \leq 0.01$) تشخیص داده شد. بر اساس جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۳)، محتوی کلروفیل a در تیمار تنش خشکی (۲/۳۶۷ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) کمتر از تیمار آبیاری کامل (۳/۶۳۵ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بود.

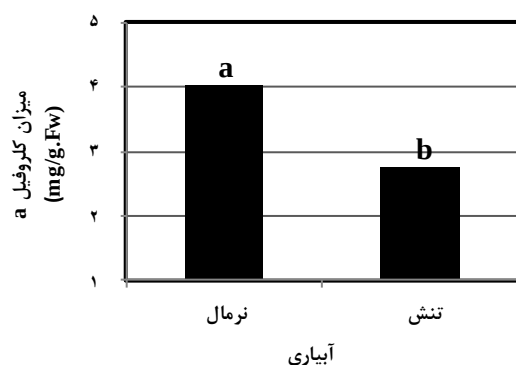
(شکل ۷). این مسئله نشان دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش خشکی و هجوم رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و تخریب پروتئین‌های گیاهی از جمله کلروفیل‌ها می باشد. مظفری و همکاران (۱۳۹۴) نتایج مشابهی را گزارش کردند.

با توجه به جدول ۳، رقم سیروان (با ۳/۲۵۵ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) از نظر میزان کلروفیل a نسبت به رقم مرودشت (با ۲/۷۴۷ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) برتر بود (شکل ۸). نتایج نشان داد که تیمار مصرف توام باکتری‌های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۳/۸۲۲ و ۲/۳۸۳ (میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین‌ترین محتوی کلروفیل a را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریوم اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۳ و شکل ۱۳). به‌طور کلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های PGPR به‌ویژه مصرف توام آن‌ها باعث شد تا محتوی کلروفیل a گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR افزایش یابد که این بیان‌گر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش رشد گیاه از طریق سازوکارهای مستقیم و غیر مستقیم است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، کلیه برهمکنش دوگانه و سه گانه بین عوامل آزمایش بر میزان کلروفیل a معنی دار نبود (جدول ۲).

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اثر اصلی آبیاری، ارقام گندم و باکتری بر محتوی کلروفیل b معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بود (جدول ۲). بر اساس جدول ۳، محتوی کلروفیل b در تیمار تنش خشکی (۱/۱۷۳ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) کم‌تر از تیمار آبیاری کامل (۱/۷۳۵ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بود (شکل ۹). این مسئله نشان دهنده افزایش میزان گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش خشکی و هجوم رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS) و تخریب پروتئین‌های گیاهی از جمله کلروفیل‌ها می باشد.

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، عامل رقم اثر معنی‌داری ($P \leq 0.05$) بر میزان کلروفیل b گذاشت (جدول ۲). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال پنج درصد، رقم سیروان (با ۱/۵۷۸ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) از نظر محتوی کلروفیل b نسبت به رقم مرودشت (با ۱/۳۳۰ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) برتر بود (جدول ۳ و شکل ۱۰). بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس، در بین سطوح مختلف باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR) اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0.01$) از نظر محتوی کلروفیل b مشاهده شد (جدول ۳). نتایج نشان داد که تیمار مصرف توام باکتری‌های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۱/۷۸۸ و ۱/۱۶۴ (میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین‌ترین محتوی کلروفیل b را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریوم اختلاف معنی داری با هم نداشتند (جدول ۳ و شکل ۱۴). به‌طور کلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های

PGPR به‌ویژه مصرف توام آنها باعث شد تا میزان کلروفیل b گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR افزایش یابد که این بیانگر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش رشد گیاه از طریق سازوکارهای مستقیم و غیرمستقیم است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، کلیه برهمکنش دوگانه و سه گانه بین عوامل آزمایش بر میزان کلروفیل b معنی دار نشد (جدول ۲).



شکل ۷: اثر آبیاری بر میزان کلروفیل a



شکل ۸: اثر رقم بر میزان کلروفیل a



شکل ۹: اثر آبیاری بر کلروفیل b



شکل ۱۰: اثر رقم بر کلروفیل b



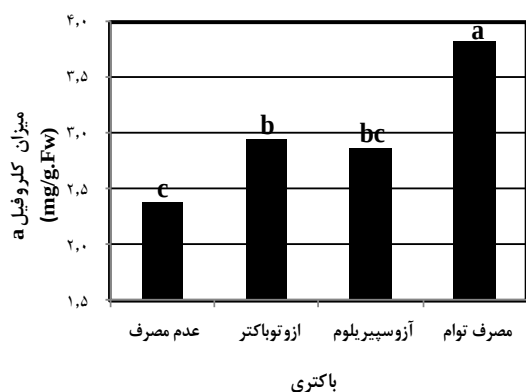
شکل ۱۱: اثر آبیاری بر کلروفیل a+b



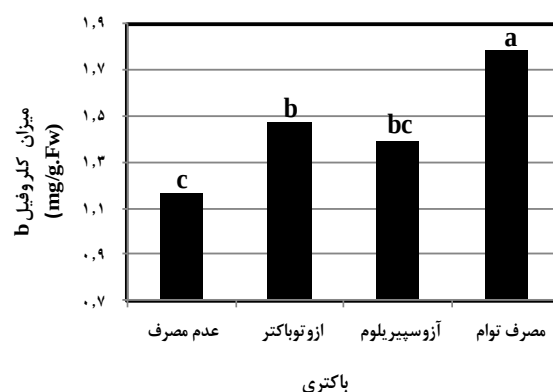
شکل ۱۲: اثر رقم بر کلروفیل a+b

با توجه به نتایج جدول ۲، اثر اصلی عوامل آزمایش بر روی میزان کلروفیل a+b معنی دار ($P \leq 0.01$) تشخیص داده شد. میزان کلروفیل a+b در تیمار تنش خشکی (۳/۵۲۲ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) کمتر از تیمار آبیاری نرمال

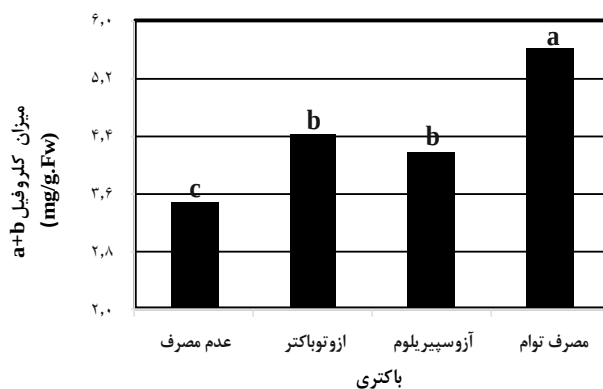
(۵/۳۲۰ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بود (جدول ۳ و شکل ۱۱). با توجه به جدول ۳، رقم سیروان (با ۴/۸۱۱ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) از نظر میزان کلروفیل $a+b$ نسبت به رقم مروداشت (با ۴/۰۳۲ میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) برتر بود (شکل ۱۲). نتایج آزمایش نشان داد، تیمار مصرف توام باکتری‌های PGPR و تیمار عدم مصرف باکتری (شاهد) به ترتیب با ۵/۶۱۰ و ۳/۴۸۰ (میلی گرم بر گرم وزن تازه بافت) بالاترین و پایین‌ترین محتوی کلروفیل $a+b$ را به خود اختصاص دادند و تیمارهای مصرف تکی ازوتوباکتر و آزوسپیریوم اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و هر دو در یک گروه آماری مشترک قرار گرفتند (جدول ۳ و شکل ۱۵). به‌طور کلی نتایج آزمایش نشان داد که مصرف باکتری‌های PGPR به-ویژه مصرف توام آن‌ها باعث شد تا محتوی کلروفیل $a+b$ گیاه گندم در مقایسه با تیمار عدم مصرف باکتری‌های PGPR افزایش یابد که این بیان‌گر اثرات مثبت باکتری‌های PGPR در افزایش رشد گیاه از طریق سازوکارهای مستقیم و غیر مستقیم است. با توجه به نتایج تجزیه واریانس، کلیه برهمکنش دوگانه و سه گانه بین عوامل آزمایش بر میزان کلروفیل $a+b$ معنی دار تشخیص داده نشد (جدول ۲). Moslemi و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی تعدادی از سویه‌های PGPR در شرایط تنش خشکی نشان دادند که تلقیح بذر با باکتری‌های آزوسپیریوم لیپوفروم + سودوموناس پوتیدا، میزان کلروفیل a و b را افزایش می‌دهد.



شکل ۱۳: اثر باکتری بر میزان کلروفیل a



شکل ۱۴: اثر باکتری بر میزان کلروفیل b



شکل ۱۵: اثر باکتری بر میزان کلروفیل a+b

نتیجه‌گیری

رقم سیروان به دلیل محتوی کلروفیل و فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانتی SOD بالا و میزان کم بیومارکر MDA نسبت به رقم مروداشت از تحمل به تنش خشکی بیش‌تری برخوردار بود. بالاترین میزان آنزیم SOD و MDA و پایین‌ترین محتوی کلروفیل a, b و a+b متعلق به تیمار تنش خشکی بود. باکتری‌های بهبود دهنده رشد گیاه (PGPR) به‌ویژه کاربرد توام آن‌ها با افزایش میزان فعالیت آنزیم SOD و محتوی کلروفیل a, b و a+b و کاهش بیومارکر تخریب مالون دی آدهید MDA اثرات مخرب تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی را در گندم کاهش دادند.

منابع

- مشهدی اکبر بوجار، م. ۱۳۹۰. فلزات سنگین و تنش اکسیداتیو در گیاهان. اولین کارگاه تنش اکسیداتیو. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی.
- مظفری، ا.، دانشیان، ج.، حبیبی، د.، شیرانی راد، ا.ح. و اصغر زاده، ا. ۱۳۹۴. بررسی تاثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) بر برخی صفات مرفوفیزیولوژیکی گندم نان تحت شرایط تنش خشکی انتهایی، مجله فیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد ۷، شماره ۱۲، صفحه ۳۶-۲۱.
- نورمحمدی، ق.، سیادت، ع. و کاشانی، ع. ۱۳۷۶. زراعت، جلد اول غلات، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز.
- Çakmakçi, R., Erat, M., Oral, B., Erdogan, U., Şahin, F. 2009. Enzyme activities and growth promotion of spinach by indole-3-acetic acid-producing rhizobacteria. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 84: 375–380.
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Chakraborty, A. P., and Dey, P. L. 2013. Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 29: 789–803.
- Chen, W. P., Li, P. H. and Chen, T. H. 2000. Glycine betaine increase chilling tolerance and reduce chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. *Plant, Cell and Environment* 23: 609–618.
- Diaz, P., Monza, J. and Marquez, A. 2005. Drought and Saline stress , *Lotuse japinicus*. Handbook 39-50.
- East, R. 2013. Microbiome: Soil science comes to life. *Nature* 50: S18-9.
- Ehdaie, B. 1995. Variation in water use efficiency and its components in wheat. II. Pot and field experiments. *Crop Science* 35: 1617–1626.

Ehteshami, S. M. R., Aghaalkhani, M., Khavazi, K. and Chaichi, M. R. 2007. Effect of Phosphate Solubilizing Microorganisms on quantitative and qualitative characteristics of Maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10: 3585-3591.

Erdogan, U., Cakmakci, R., Varmazyari, A., Turan, M., Erdogan, Y. and Kitir, N. 2016. Role of inoculation with multi-trait rhizobacteria on strawberries under water deficit stress. *Zemdirbyste-Agriculture* 103 (1): 67-76.

Flemming H. C. and Wingender, J. 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-parts I: structural and ecological aspects. *Water Science Technology*. 43: 1-8.

Gill, S. S. and Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

Grover, M., Ali, S. Z., Sandhya, V., Rasul, A. and Venkateswarlu, B. 2010. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27: 1231-1240.

Islam, F., Yasmeen, T., Ali, Q., Ali, S., Arif, M.S., Hussain, S., Rizvi, H. 2015. Influence of *Pseudomonas aeruginosa* as PGPR on oxidative stress tolerance in wheat under Zn stress. *Ecotoxicol. Environment Saf.* DOI:10.1016/j.ecoenv.2014.03.008.

Islam, F., Yasmeen, T., Arif, M. S., Ali, S., Ali, B., Hameed, S. and Zhou, W. 2016. Plant growth promoting bacteria confer salt tolerance in *Vigna radiata* by up-regulating antioxidant defense and biological soil fertility. *Plant Growth Regulation* 80:23-36.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007a. *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids Surf B Biointerfaces* 60: 7-1.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2007b. Induction of drought stress tolerance by ketoconazole in *catharanthus roseus* is mediated by enhanced antioxidant potentials and secondary metabolite accumulation, *Colloids Surf B Biointerfaces* 60: 201-206.

Jaleel, C. A., Manivannan, P., Wahid, A., Farooq, M., Al-Juburi, H. J., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. 2009. Drought stress plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. *International Journal of agriculture and biology* 11: 100-105.

Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., Abd El-Daim, I. A., Abd El-Daim, I. A., Bejai, S. and Meijer, J. 2013. Control of Drought Stress in Wheat Using Plant-Growth- Promoting Bacteria. *Journal of Plant Growth Regulation* 32: 122-130.

Kim, Y. C., Glick, B., Bashan, Y. and Ryu, C. M. 2013. Enhancement of plant drought tolerance by microbes. In: Aroca R, editor. Plant responses to drought stress. 2013. Berlin: Springer Verlag.

Kloepper, J.W. and Schroth, M. N. 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. IV. International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Angers France 2: 879-882.

Liu, X-M and Zhang, H. 2015. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers Plant Science*. 6: 1-6, 774.

Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., Abou-Hadid, A.F., El-Behairy, U. A., Sorlini, C., Cherif, A. 2012. A drought resistance promoting microbiome is selected by root system under desert farming. 7: 1-14.

Minami, M., Yoshikawa, H., 1979. A simplified assay method of superoxide dismutase activity for clinical use. *Clinica Chimica Acta* 92: 337-342.

Moslemi, Z., Habibi, D., Asgharzadeh, A., Ardakani, M. R., Mohammadi A. and Sakari A. 2011. Effects of super absorbent polymer and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components of maize under drought stress and normal conditions. *African Journal of Agricultural Research* 6: 4471-4476.

Mozafari, A. 2012. Evaluation of Some Crop Species for Remedation of Lead (Pb) In Contaminated Soils Under Greenhouse condition. EUROSOI2012. The 4th International Congress of the European Confederation of Soil Science Societies (ECSSS), 2-6 July, Bari, Italy.

Mozafari, A. 2014. Evaluation the effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on SOD, MDA and Proline content in two wheat cultivar. 20th World Congress of Soil Science. June 8-13, Jeju, Korea.

Mozafari, A., Siadat, S. A. and Abdali, M. 2015. The study of lead accumulation, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde biomarker content in two barely species. e-proceedings of the 6th European Bioremediation Conference (ebc-vi 2015). Chania, Crete, Greece, June 29-July 2.

Naseem, H., and Bano, A. 2014. Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interaction* 9: 689-701.

Ohkawa, H., Ohishi, N. and Y. Yagi, 1979. Assay of lipid peroxides in tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annual Biochemistry* 95: 51-358.

Patel, P.K. and Hemantaranjan, A. 2012. Antioxidant defence system in chickpea (*Cicer arietinum* L.): influence by drought stress implemented at pre- and post-anthesis stage. *American Journal of Plant Physiology*, 7: 164-173

Price, A. H. and Henry, G. A. F. 1989. Stress and the role of activated oxygen scavengers and protective enzymes on plants subjected to drought. *Biochemical Society Transactions* 17: 493-493

Porra, R. J., Thompson, W. A. and Kriedemann, P. E. 1989. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 975: 384–94.

Redman, R. S., Kim, Y. O., Woodward, C. J. D. A., Greer, C. and Espino, L. 2011. Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: A strategy for mitigating impacts of climate change. <http://dx.doi.org/10.1371/>.

Smirnoff, N. 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.

Timmusk, S. and Wagner, E. G. H. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 12: 951–959.

Vardharajula, S., Zulfikar Ali, S., Grover, M., Reddy, G. and Bandi, V. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus spp.*: effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interaction* 6:1–14.

Verma, P., Saxena, R. and Tomar, R. S. 2016. Rhizobacteria: A Promising Tool for Drought Tolerance in Crop Plants. *Proceeding of International Conference on Recent Advances in Biotechnology (Int-BIONANO-2016)*.

Yang, J., Kloepper, J. W. and Ryu, C. M. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Science* 14: 1–4.

Zhang, Z. L. 1990. Guide to plant physiology experiments. Beijing: Higher Education Press.

Zhang, L. X., Wang, K., Zhang, X. F., Lu, L. X., Li, Y. F., Gao, M., Wang, C. Y., Hu J. J., Liang, Z. S. 2011. Role of nitrate nutrition in alleviation of the adverse effects of drought stress on maize cultivars: biomass production and antioxidative capacity. *Pakistan Journal of Botany*, 43: 2869–2874.