https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en
IRANIAN JOURNAL OF PLANT BIOLOGY
E-ISSN: 2322-2204
Vol. 13, Issue , No. 3, Autumn 2021
Document Type: Research Paper
Received: 12/11/2021 Accepted: 20/04/2022

Effect of biofertilizers and putrescine on biomass and some physiological and biochemical traits of vetch (*Vicia villosa* Roth) under rainfed condition

Raouf Seyed Sharifi*, Hamed Narimani
Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

Abstract
Water limitation is the most severe stress factor limiting plant growth and crop production in arid and semi-arid regions. Several strategies have been developed in order to decrease water limitation effects caused by the rainfed condition on plant growth. Among them, the use of putrescine and bio-fertilizers such as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Mycorrhiza* play a significant role in yield improvement. Therefore, to study biofertilizers and putrescine's effect on biomass and some physiological and biochemical traits of vetch (*Vicia villosa*) under rainfed conditions, a factorial experiment was conducted based on a randomized complete block design with three replications in a research farm at the University of Mohaghegh Ardabili in 2019. Experimental factors included biofertilizers (no biofertilizer as control, application of *Rhizobium*, *Mycorrhiza*, combined application of *Mycorrhiza* and *Rhizobium*, *Rhizobium* and *Azotobacter*, *Mycorrhiza* and *Azotobacter*, *Rhizobium* with *Mycorrhiza* and *Azotobacter*) and foliar application of putrescine in three levels (water as control, 0.5 and 1mM putrescine). The results showed that both application of *Azotobacter* with *Mycorrhiza* and *Rhizobium* and foliar application of 1 mM putrescine increased catalase, peroxidase and polyphenol oxidase enzymes activity (37.08, 37.54 and 34.41% respectively) , maximum fluorescence and anthocyanin content (56.94 and 4.57% respectively) compared to no application of biofertilizers and foliar application of putrescine. Also, both application of *Azotobacter* with *Mycorrhiza* and *Rhizobium* and foliar application of 1 mM putrescine increased total biomass by about 56.9% compared to no application of biofertilizer and putrescine. It seems that the application of biofertilizers and putrescine can increase the total biomass of *Vica villosa* under rainfed conditions due to improving the physiological and biochemical traits.

Keywords: *Azotobacter*, Chlorophyll content, Hydrogen peroxide, *Mycorrhiza*, *Rhizobium*

*Corresponding author: raouf_ssharifi@yahoo.com

2322- 2204/ © 2021 University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2022.131436.1267

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال سیزدهم، شمارهٔ چهل و نهم، پاییز ۱۴۰۰، صفحهٔ ۲۰-۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۰۸/۲۱
تاریخ بررسی مجدد: ۱۴۰۰/۰۹/۲۶
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۰۱/۳۱
مقاله پژوهشی

تأثیر کودهای زیستی و پوترسین بر بیوماس و برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ماشک گل‌خوشه‌ای (*Vicia villosa* Roth) تحت شرایط دیم

رئوف سید شریفی*، حامد نریمانی
دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

چکیده

محدودیت آبی شدیدترین عامل تنشی است که رشد و تولید گیاهان زراعی را در مناطق خشک و نیمه‌خشک محدود می‌کند. راهکارهای متعددی به‌منظور کاهش آثار محدودیت آبی ایجادشده تحت شرایط دیم در رشد گیاهی توسعه یافته‌اند. در میان آن‌ها استفاده از پوترسین و کودهای زیستی (همانند میکوریزا و باکتری‌های محرک رشد) نقش بسیار مهمی در بهبود عملکرد ایفا می‌کنند. در این راستا به‌منظور بررسی تأثیر کودهای زیستی و پوترسین بر بیوماس و برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ماشک گل‌خوشه‌ای تحت شرایط دیم، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. فاکتورهای مورد بررسی کودهای زیستی (عدم کاربرد کودهای زیستی به‌عنوان شاهد، کاربرد ریزوبیوم (*Rhizobium legominuzarum*)، میکوریزا (*Glomus mosseae*)، کاربرد توأم میکوریزا با ریزوبیوم، ریزوبیوم و ازتوباکتر، میکوریزا و ازتوباکتر (*Azotobacter chrocoocom strain 5*)، ریزوبیوم با ازتوباکتر و میکوریزا) و محلول‌پاشی پوترسین در سه سطح (محلول‌پاشی با آب به‌عنوان شاهد و محلول‌پاشی ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار پوترسین) را شامل می‌شدند. نتایج نشان داد که کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز را به‌ترتیب ۳۷/۰۸، ۳۷/۵۴ و ۳۴/۴۱ درصد، فلورسانس بیشینه و محتوای آنتوسیانین را به‌ترتیب ۴۹/۶۸ و ۸۷/۷۴ درصد نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و پوترسین افزایش داد. همچنین، کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین بیوماس کل را حدود ۵۶/۹ درصد نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و عدم محلول‌پاشی با پوترسین افزایش داد. به‌نظر می‌رسد کاربرد کودهای زیستی و پوترسین می‌تواند بیوماس کل ماشک گل‌خوشه‌ای تحت شرایط دیم را به‌واسطه بهبود صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: ازتوباکتر، پراکسیدهیدروژن، ریزوبیوم، محتوای کلروفیل، میکوریزا

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: raouf_ssharifi@yahoo.com، شمارهٔ تماس: ۰۹۱۴۳۵۵۶۵۸۵

2322- 2204/ © 2021 University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses BY-NC-ND 4.0)

DOI. 10.22108/IJPB.2022.131436.1267

مقدمه

ماشک گل‌خوشه‌ای (*Vicia villosa* Roth) یکی از مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای است که ضمن حفاظت و اصلاح ساختار خاک، به‌عنوان کود سبز، سیلو، علوفه سبز و خشک در تغذیه دام‌ها کاربرد فراوانی دارد (Seyed Sharifi and Hokmalipour, 2013). محدودیت آبی در بیشتر مناطق خشک و نیمه‌خشک تحت شرایط دیم، ضمن کاهش رشد و عملکرد گیاهان (Reddy *et al*., 2004)، می‌تواند به کاهش جمعیت میکروبی در خاک یک منطقه منجر شود (Elliott and Wildung, 1992)، در چنین شرایطی کاربرد کودهای زیستی نه تنها ریزجانداران از بین رفته خاک را جبران می‌کند (Seyed Sharifi and Namvar, 2017)، بلکه می‌تواند مقاومت گیاهان را به تنش رطوبتی افزایش داده (Mayaka *et al*., 2004) و به‌عنوان یک راهکار مفید به‌منظور کاهش و یا تعدیل هرچه بیشتر آثار ناشی از تنش در اکثر گیاهان زراعی مطرح باشد. یکی از کودهای زیستی مهم، قارچ‌های میکوریزایی هستند که در پایداری سلول در برابر رادیکال‌های آزاد و ایجاد سیستم قوی مهارکننده در برابر ROS نقش مهمی داشته (Ashraf and Foolad, 2007) و با افزایش سطح تماس ریشه با خاک و فراهمی بیشتر عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، به بهبود رشد، حفظ فعالیت آنزیم، افزایش محتوای کلروفیل و تحمل گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی منجر می‌شوند (Al-Karaki *et al*., 2004). Moghadasan و همکاران (۲۰۱۶) اظهار داشتند کاربرد میکوریزا با ایجاد رابطه همزیستی با گیاه و جذب کارآمد برخی عناصر مانند فسفر که به‌عنوان عنصر کلیدی در انتقال انرژی طی فرآیند فتوسنتز مطرح است و یا تسهیل جذب عناصری مانند نیتروژن و منیزیم (جز اصلی ساختار مولکول کلروفیل)، موجب افزایش محتوای کلروفیل و بهبود فتوسنتز می‌شود.

باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) گروه ویژه‌ای از باکتری‌های خاک هستند که با اتصال به ریشه‌های گیاهان تحت تنش به‌عنوان منبع ACC (1-Amino Cyclopropane-1-Carbocylate) عمل کرده (Glick, 2014) و به‌طور چشم‌گیری اثر اتیلن تولیدی را که در نتیجه‌ی شرایط خشکی ساخته می‌شود، کاهش می‌دهند (Zahir *et al*., 2007). از این‌رو تلقیح بذر با این باکتری‌ها می‌تواند ساخت اتیلن درونی را کاهش و تحمل گیاهان به تنش را افزایش دهد (Glick, 2014). Chandrasekhar و همکاران (۲۰۰۵) گزارش داند که کاربرد این باکتری‌ها با افزایش تثبیت نیتروژن و افزایش دسترسی به این عنصر، موجب بهبود محتوای کلروفیل می‌شود. Gururani و همکاران (۲۰۱۲) اظهار داشتند کاربرد باکتری با افزایش بیان ژن mRNA آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، ضمن افزایش فعالیت این آنزیم‌ها، موجب کاهش محتوای پراکسیدهیدروژن می‌شود. در بررسی اثر کودهای زیستی، شیمیایی و آلی بر برخی ویژگی‌های کیفی ماشک گل‌خوشه‌ای در شرایط گلخانه‌ای، بهترین تیمار کودی مخلوط قارچ میکوریزا و ریزوبیوم گزارش شده است (Kamaei *et al*., 2017).

گیاهان در شرایط نامناسب محیطی با تجمع برخی هورمون‌ها با وزن مولکولی کم مانند پلی‌آمین‌ها، به آن پاسخ می‌دهند. پلی‌آمین‌ها دسته‌ای از ترکیبات طبیعی با وزن مولکولی کم و

دارای گروه‌های نیتروژن‌دار خطی هستند که تقریباً در همه موجودات زنده یافت می‌شوند (Groppa and Benavides, 2008) و نقش تعدیل‌کننده پلی‌آمین‌هایی مانند اسپرمین، پوترسین و اسپرمیدین در فرآیندهای سلولی و فیزیولوژیک در طول دوره رشد و نمو گیاه از جمله در زمان گلدهی، ریشه‌دهی، تکثیر سلولی، جنین‌زایی و حفاظت در برابر تنش‌ها مشخص شده است. این ترکیبات به‌علت طبیعت کاتیونی خود، به راحتی با DNA، RNA و پروتئین‌ها باند می‌شوند (Rangan *et al*., 2014) و می‌توانند به فرم آزاد یا متصل با ترکیبات دیگر وجود داشته باشند. پلی‌آمین‌ها موجب برداشت رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Liu *et al*., 2007) و ماهیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها احتمالاً مربوط به مهار آنزیم NADPH اکسیداز و فعالیت آنزیم ACD (Arginine Decarboxylase) است (Martin-Tanguy, 2001). Fornazier و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که مکانیسم دفاع سلولی پلی‌آمین‌ها در برابر تنش، از طریق فعال‌سازی بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود. Cohen و همکاران (۲۰۰۴) اظهار داشتند پوترسین به‌علت ویژگی آنتی‌اکسیدانی که دارد با ممانعت از تخریب ساختار غشای کلروپلاست، موجب افزایش محتوای کلروفیل می‌شود. بررسی‌های Nayyar و همکاران (۲۰۰۵) نشان داند کاربرد پوترسین و اسپرمیدین اثر سوء ناشی از محدودیت آبی را در گیاهانی مانند سویا و نخود کاهش و عملکرد را در شرایط تنش افزایش می‌دهند. نتایج بررسی تأثیر توأم کودهای زیستی و پوترسین در شرایط محدودیت شدید آبی گندم (قطع آبیاری در مرحله چکمه‌ای شدن) نشان داد که محتوای نسبی آب، شاخص کلروفیل، هدایت روزنه‌ای و عملکرد کوانتومی با کاربرد توأم میکوریز با سودوموناس و فلاوباکتریوم و محلول‌پاشی پوترسین در مقایسه با عدم کاربرد کودهای زیستی و عدم محلول‌پاشی پوترسین افزایش یافته که بیانگر نقش مثبت کودهای زیستی و پوترسین در ارتقای فعالیت فتوسنتزی و بهبود سیستم حفاظتی گیاه بود (Mohseni Mohammadjanlou *et al* ., 2021). نتایج یک بررسی نشان داد کاربرد توأم باکتری‌ها و میکوریز به همراه محلول‌پاشی پوترسین با افزایش وزن و حجم ریشه، ضمن کمک به افزایش تعداد و وزن گره به ازای هر بوته و کاهش ۹۹ درصدی هدایت الکتریکی و ۱۲۵/۳۹درصدی محتوای مالون‌دی‌آلدئید، به افزایش بیوماس کل ماشک و بهبود مقاومت گیاه در شرایط محدودیت آبی منجر می‌شود (Seyed Sharifi *et al*., 2020). برخی محققان گزارش کردند که کاربرد توأم کودهای زیستی (میکوریز با سودوموناس و فلاوباکتریوم) و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین در شرایط قطع آبیاری در مراحل رشد زایشی گندم، توانست با بهبود محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل و همچنین مؤلفه‌های پر شدن دانه، عملکرد دانه گندم را تحت شرایط محدودیت آبی افزایش دهد (Mohseni Mohammadjanlou *et al*., 2021).

عملکرد ماشک در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور تحت شرایط دیم، به‌علل مختلفی از جمله کمبود مواد آلی در خاک و ناکافی بودن نزولات، پایین است. در این راستا به‌علت نقش میکوریز در افزایش سطح تماس ریشه با خاک و فراهمی بیشتر رطوبت و عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، توانایی باکتری‌های محرک رشد در تولید ترکیبات مختلف

(مثل فیتوهورمون‌ها، ویتامین‌ها و سیدروفورها)، تثبیت نیتروژن اتمسفری و انحلال فسفات معدنی و آلی و تأثیر پوترسین در تعدیل شرایط نامساعد محیطی ناشی از محدودیت آبی، پایداری غشا و برداشت‌کننده مؤثر گونه‌های فعال اکسیژن و از طرفی بررسی‌های محدود انجام‌شده در خصوص برهمکنش توأم این عوامل بر بیوماس ماشک، از جمله مواردی بودند که موجب شد تا اثر این عوامل بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی صفات فیزیولوژیک ماشک به کاربرد پوترسین و کودهای زیستی در شرایط دیم بررسی شود.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه محقق اردبیلی با مختصات جغرافیایی ۳۸ درجه و ۱۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۸ درجه و ۲۰ دقیقه طول شرقی و ارتفاع ۱۳۵۰ متر از سطح دریا در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. محل اجرای آزمایش دارای اقلیم نیمه‌خشک و سرد است. نتایج حاصل از تجزیه خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه آزمایشی در جدول (۱) و شرایط اقلیمی منطقه مورد کشت در جدول (۲) آورده شده است.

مواد و روش‌ها

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1. Soil physicochemical properties

مشخصه	اسیدیته	عصاره اشباع	آهک	رس	سیلت	شن	بافت	کربن آلی	نیتروژن کل	فسفر	پتاسیم	روی
			%				لومی	%		mg/kg		
مقادیر	۷/۸	۴۹	۱۴/۴	۲۳	۴۲	۳۵		۰/۶۲	۰/۰۶	۸/۲۹	۲۱۲	۱۸

جدول ۲- مشخصات جوی در طول دوره رشدی ماشک گل‌خوشه‌ای

Table 2. Atmospheric characteristics during *Vicia villosa* growth

ماه‌های سال / شاخص‌های اقلیمی	فروردین	اردیبهشت	خرداد	تیر	مرداد	شهریور
بارندگی	۴۰	۲۹/۵	۱۳	۰/۱	صفر	۱۸/۸
میانگین دما	۸	۱۲/۴	۱۷/۶	۱۸/۸	۱۹/۷	۱۶/۳
جمع ساعات آفتابی	۱۶۳	۲۵۸/۱	۲۸۷/۷	۳۳۶	۳۱۴/۱	۲۱۳/۲
متوسط رطوبت نسبی	۷۳	۶۳	۵۸	۶۲	۶۱	۷۱

فاکتورهای مورد بررسی شامل کاربرد کودهای زیستی (عدم کاربرد کودهای زیستی به‌عنوان شاهد، کاربرد ریزوبیوم، کاربرد میکوریزا، کاربرد توأم میکوریزا با ریزوبیوم، ریزوبیوم و ازتوباکتر، میکوریزا و ازتوباکتر، ریزوبیوم با ازتوباکتر و میکوریزا) و محلول‌پاشی با پوترسین (عدم محلول‌پاشی پوترسین به‌عنوان شاهد و محلول‌پاشی ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار) بودند. محلول‌پاشی با پوترسین در دو مرحله در طول دوره رشد رویشی انجام شد. نخستین محلول‌پاشی دو هفته پس از کاشت و

اطمینان از استقرار کامل گیاه در مزرعه و مرحله دوم محلول‌پاشی ده روز پس از مرحله اول انجام شد. در این بررسی قارچ *Glomus mosseae* به‌صورت پودر از شرکت زیست فناوران توران تهیه و به مقدار ۲۰ گرم در هر متر مربع خاک (۲۰۰ کیلوگرم در هر هکتار) بر اساس توصیه شرکت یادشده استفاده شد. تعداد اسپور زنده در هرگرم آن حدود ۱۰۰ اسپور بود. سویه خالص آماده و به شکل مایع باکتری‌های ریزوبیوم و ازتوباکتر از مؤسسه خاک و آب تهیه شدند. ریزوبیوم مورد استفاده *Rhizobium legominuzarum* و ازتوباکتر از نوع *Azotobacter chrocoocom strain 5* بود. هر گرم از مایه تلقیح این باکتری‌ها حاوی 10^{7} عدد باکتری (CFU, Colony Forming Units) زنده و فعال بود. از محلول صمغ عربی برای چسبندگی بهتر مایه تلقیح به بذرها استفاده شد (Kheirizadeh and Seyed Sharifi, 2018; Khalilzadeh *et al.*, 2017). این مخلوط به‌مدت دو تا سه ساعت در محل خشک و تاریک قرار داده شد و سپس نسبت به کشت اقدام شد. آزمایش در قطعه زمینی انجام شد که دو سال قبل از اجرا، گیاهی کشت نشده بود و در سال‌های گذشته گندم و جو کشت شده بود. در بهار به محض مساعد شدن شرایط اقلیمی و در سیزدهم اردیبهشت‌ماه، کشت به روش دستی انجام شد. هر واحد آزمایشی شامل پنج خط کاشت به طول ۲/۵ متر و با فاصله بین ردیفی ۲۰ سانتی‌متر و فاصله بذر از هم روی ردیف ۱۰ سانتی‌متر بود. در این بررسی از ماشک رقم محلی بنام لامعی استفاده شد. کنترل علف‌های هرز در طول دوره رشد به روش دستی انجام شد. در مرحله گلدهی اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز) از روش Sudhakar و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۰/۲ گرم نمونه تر برگی در هاون چینی در مجاورت نیتروژن مایع پودر شد و با یک میلی‌لیتر بافر تریس- کلریدریک ۰/۰۵ مولار با اسیدیته ۷/۵ هموژن گردید. همگنای حاصل را به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ کرده و محلول شناور رویی برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز استفاده شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، ۲/۵ میلی‌لیتر بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۷) و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه (۵ میلی‌مولار) تهیه شده و سپس ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در حمام یخ به آن اضافه شد و میزان جذب در طول موج ۲۴۰ نانومتر قرائت شد. برای مقایسه فعالیت آنزیم نیز یک نمونه به عنوان شاهد (Blank) استفاده شد که در این نمونه به جای ۶۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی از بافر تریس- کلریدیریک ۰/۰۵ مولار استفاده شد. فعالیت آنزیم بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین بر دقیقه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز به روش Karo و Mishra (۱۹۷۶)انجام شد. طوری که ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به ۲/۵ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل تریس- کلریدریک ۱۰۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۵ میلی‌مولار و پیروگالل ۱۰ میلی‌مولار در حمام یخ اضافه شد و میزان جذب تغییرات در

طول موج ۴۲۵ نانومتر قرائت شد. برای مقایسه فعالیت آنزیم نیز یک نمونه به‌عنوان شاهد (Blank) استفاده شد که در این نمونه به جای ۵۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی از بافر تریس- کلریدریک ۰/۰۵ مولار استفاده شد. فعالیت آنزیم بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین بر دقیقه محاسبه گردید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز محلول واکنش شامل ۱/۵ میلی‌لیتر بافر تریس (۵۰ میلی‌مولار، اسیدیته ۷) و ۰/۳ میلی‌لیتر پیروگالول (۵ میلی‌مولار) تهیه شده و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به آن اضافه نموده و سپس محلول حاصل در بن‌ماری به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر قرائت شد. برای مقایسه فعالیت آنزیم نیز یک نمونه به عنوان شاهد (Blank) استفاده شد که دراین نمونه به جای ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی از بافر تریس- کلریدریک ۰/۰۵ مولار استفاده شد. فعالیت آنزیم بر اساس میزان تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین بر دقیقه محاسبه گردید.

برای سنجش محتوای کلروفیل از روش Arnon (۱۹۶۷) استفاده شد. بدین منظور ۰/۲گرم از بافت برگ را با استون ۸۰٪ به تدریج سائیده شد تا کلروفیل وارد محلول استونی شود و در نهایت حجم محلول با استون ۸۰٪ به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۴۰۰ دور سانتریفیوژ شد و سپس جذب نوری محلول رویی در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. محتوای کلروفیل و کارتنوئید بر اساس روابط ۱ تا ۴ برآورد شد.

رابطه ۱:

$$\text{کلروفیل a} = (۱۹/۳ \times A_{۶۶۳} - ۰/۸۶ \times A_{۶۴۵})\ V/۱۰۰\ W$$

رابطه ۲:

$$\text{کلروفیل b} = (۱۹/۳ \times A_{۶۴۵} - ۳/۶ \times A_{۶۶۳})\ V/۱۰۰\ W$$

رابطه ۳:

$$\text{کلروفیل کل} = \text{کلروفیل a} + \text{کلروفیل b}$$

رابطه ۴:

$$\text{کارتنوئید} = (۱۰۰۰\ A_{۴۷۰} - ۱/۸۲\ C_a - ۸۵/۰۲\ C_b)/۱۹۸$$

برای سنجش محتوای آنتوسیانین از روش Wagner (۱۹۷۹) استفاده شد. بدین منظور ۰/۲ گرم از اندام هوایی گیاه در سه میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و اسید کلریدریک به نسبت ۹۹ به ۱) خوب سائیده و سپس عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ × gسانتریفیوژ شد. محلول رویی به‌مدت یک شب در تاریکی قرار داده شد و جذب آن در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (UV 2100, UNICO USA) قرائت شد. محتوای پراکسیدهیدروژن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Alexieva *et al.*, 2001). همچنین F_0 (فلورسانس کمینه)، F_m (فلورسانس بیشینه)، F_v (فلورسانس متغیر) توسط دستگاه (Chlorophyll fluorometer; Optic Science-OS-30 USA) از هر تیمار به‌طور تصادفی چهار برگ با رعایت اثر حاشیه‌ای و از خطوط اصلی هر کرت در مرحله گلدهی (در فاصله زمانی ساعت ۱۰-۸ صبح) انتخاب و پس از ۳۰ دقیقه تاریکی توسط کلیپس‌های مخصوص اندازه‌گیری شد (Seyed Sharifi *et al.*, 2016). عملکرد علوفه با رعایت اثر حاشیه‌ای، از سه ردیف اصلی هر کرت

از سطحی معادل ۰/۶ متر مربع برداشت شد. نمونه مورد نظر در آزمایشگاه تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۵±۷۰ درجه سانتیگراد به‌مدت ۴۸ ساعت خشک و سپس توزین گردید. برای تجزیه داده‌ها و رسم نمودارها از نرم افزاره SAS (نسخه ۹/۱) استفاده شد. میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد کودهای زیستی و پوترسین بر فلورسانس متغیر (F_v)، فلورسانس کمینه (F_0) و محتوای پرولین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). برهمکنش توأم این دو عامل بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز)، آنتوسیانین، محتوای پراکسیدهیدروژن، کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در سطح احتمال یک درصد و بر فلورسانس بیشینه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی

بر اساس جدول مقایسه میانگین‌ها، محلول‌پاشی نیم و یک میلی‌مولار پوترسین با کاربرد تک تک کودهای زیستی همانند کاربرد توأم این کودها (میکوریز با باکتری‌های ریزوبیوم و ازتوباکتر) از افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در مقایسه با عدم کاربرد پوترسین وکودهای زیستی برخوردار بود، هر چند که بیشینه فعالیت این آنزیم‌ها به کاربرد توأم کودهای زیستی با مقادیر بالای محلول‌پاشی پوترسین تعلق داشت (جدول ۴). به طوری که کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین موجب افزایش به‌ترتیب ۳۷/۰۸، ۳۷/۵۴ و ۳۴/۴۱ درصدی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین شد (جدول ۴). شرایط اقلیمی حاکم به‌ویژه از نظر میزان نزولات در طول دوره رشدی ماشک در منطقه مورد کشت (جدول ۲) به تشدید آثار ناشی از محدودیت آبی تحت شرایط دیم منجر می‌شود. در چنین شرایطی محدودیت آبی می‌تواند با تولید گونه‌های فعال اکسیژن به آسیب به رنگدانه‌های کلروفیل (جدول ۴) و سیستم انتقال الکترون فتوسنتزی و در نهایت به کاهش بیوماس منجر شود. در حالت کلی گیاهان برای مقابله با آثار نامطلوب گونه‌های فعال اکسیژن ناشی از شرایط نامساعد محیطی، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی را توسعه می‌دهند (Wu *et al*., 2012)، که در برخی گیاهان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مثل آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز در شرایط محدودیت آبی افزایش می‌یابد (Abdel Latef, 2010). برخی محققین معتقدند استفاده از میکوریزا به‌علت افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در همزیستی ریشه گیاه با قارچ میکوریزا (Zare Hassanabdi *et al*., 2020) و افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه، ساخت برخی آنزیم‌ها از جمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد که موجب کاهش انباشت

رادیکال‌های آزاد می‌شود (Ageeb Akladious and Mohamed, 2018). از طرفی کاربرد باکتری‌های محرک رشد نیز با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، رادیکال‌های سمّی پراکسیدهیدروژن تولیدشده در اثر تنش را حذف می‌نمایند. به طوری که در این آزمایش نیز، کاهش ۴۱/۳۷ درصدی محتوای پراکسیدهیدروژن در کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین در مقایسه با عدم کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین به دست آمد (جدول ۴). Sepehri و همکاران (۲۰۱۵) اظهار داشتند که باکتری‌های محرک رشد با تولید متابولیت‌ها و هورمون‌های محرک رشد، نقش ویژه‌ای در تحریک و بیان ژن پروتئین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند. گرچه سازوکار تأثیر پلی‌آمین‌ها بر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تاکنون به‌طور کامل مشخص نشده است، بااین‌حال احتمالاً پلی‌آمین‌ها واکنش‌های دفاعی را راه‌اندازی نموده که افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان یکی از نتایج آن است (Toumi *et al*., 2010). در این بررسی نیز با افزایش غلظت پوترسین مورد استفاده، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بیشتر شد و کاربرد توأم پوترسین با کودهای زیستی به تشدید فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسید هیدروژن تولیدشده منجر گردید (جدول ۴). Fornazier و همکاران (۲۰۰۲) اظهار داشتند که مکانیسم دفاع سلولی پلی‌آمین‌ها در برابر تنش، از طریق جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن و فعال‌سازی بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است.

همچنین، Hassanpour Nejad و Ranjber (۲۰۱۸) گزارش دادند که کاربرد پوترسین با بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود.

محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید

کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین موجب افزایش به‌ترتیب ۱۱۲/۲۳، ۵۶/۱۶، ۹۶/۴ و ۵۷/۲۸ درصدی محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین شد (جدول ۴). البته در مورد محتوای کلروفیل a و b در سطح ثابت از محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین، بین کاربرد توأم هر سه کود زیستی میکوریزا با ازتوباکتر و ریزوبیوم با کاربرد دو گانه میکوریزا با ریزوبیوم، ازتوباکتر با میکوریزا اختلاف آماری معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود نداشت (جدول ۴). به نظر می‌رسد میکوریزا با تسهیل روند جذب عناصری مانند نیتروژن و منیزیم (جز اصلی ساختار مولکول کلروفیل) و از طریق ایجاد رابطه همزیستی با گیاه و جذب کارآمد برخی عناصر مانند فسفر که به‌عنوان عنصر کلیدی در انتقال انرژی طی فرآیند فتوسنتز مطرح است، موجب افزایش محتوای کلروفیل می‌شود (Moghadasan *et al*., 2016)، در ضمن کاربرد باکتری‌ها به‌علت دسترسی بالاتر نیتروژن به‌واسطه تثبیت نیتروژن در گیاه (Chandrasekhar *et al*., 2005) می‌تواند علتی دیگر در افزایش محتوای کلروفیل تحت چنین شرایطی باشد.

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیرکودهای زیستی و پوترسین بر برخی صفات بیوشیمیایی ماشک گل‌خوشه‌ای تحت شرایط دیم

Table 3. Variance analysis for the effects of biofertilizers and putrescine on some biochemical traits of vetch under rainfed condition

منابع تغییر	درجه آزادی	بیوماس کل	کاتالاز	پراکسیداز	پلی‌فنل-اکسیداز	آنتوسیانین	پراکسید هیدروژن	پرولین	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	فلورسانس بیشینه	فلورسانس متغیر	فلورسانس کمینه
		میانگین مربعات													
تکرار	۲	۵۵۰۷۱/۰۳**	۱۸۴۵**	۲۷۹۱/۶**	۴۹۱۹/۵**	۰/۰۰۰۴**	۰/۱**	۵۵/۳**	۶/۹**	۰/۶**	۱۱/۹**	۱/۳**	۲۲۲۷۹۰/۵**	۵۰۳۹۱۸/۳**	۵۷۶۱۴/۸**
پوترسین (P)	۲	۶۷۲۴۲/۹**	۴۳/۲**	۲۵۲/۲**	۳۵۴/۸**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۶**	۵/۳۲**	۲/۸**	۰/۱**	۴**	۰/۲**	۲۰۰۲۶/۵**	۳۹۷۰۰/۴**	۳۴۱۵/۵**
کودهای زیستی (B)	۶	۱۸۴۹۶۴/۸**	۱۷۷/۹**	۲۶۷/۲**	۳۵۴/۱**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۱۹**	۱۲/۵**	۳/۷**	۰/۱**	۵**	۰/۱**	۲۴۱۳۹/۳**	۴۹۲۹۶/۷**	۴۶۰۲/۵**
P×B	۱۲	۲۰۲۱/۳۳**	۲/۲**	۶/۵**	۷/۵**	۰/۰۰۰۰۰۳**	۰/۰۰۰۳**	ns۰/۰۸	۰/۱**	۰/۰۰۲**	۰/۱**	۰/۰۰۲**	۲۲۲*	ns۳۷۶/۷	ns۹۲/۴
خطا	۴۰	۴۸۷/۷۶	۰/۷	۱/۴	۱/۹	۰/۰۰۰۰۰۰۶	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۵	۰/۰۱	۰/۰۰۰۵	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۱۰۶/۹	۹۱۳/۱	۴۰۸/۱
ضریب تغییرات	–	۶/۹۵	۸/۱۹	۹/۰۲	۸/۱۲	۷/۳	۶/۲۲	۷/۹۶	۴/۸۷	۸/۶	۴/۳۳	۶/۲	۹/۹	۷/۵۹	۸/۱۶

ns، * و ** به‌ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

ns, * and ** show no significant and significant differences at 0.05, 0.01 probability level, respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین بر برخی صفات بیوشیمیایی و ریخت‌شناختی ماشک گل‌خوشه‌ای تحت شرایط دیم

Table 4. Means comparison of the effects of biofertilizers and putrescine on some biochemical and morphology traits of vetch under rainfed condition

تیمار	بیوماس کل	کاتالاز	پراکسیداز	پلی‌فنل‌اکسیدار	آنتوسیانین	پراکسید هیدروژن	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	فلورسانس بیشینه
	(گرم در متر مربع)	(تغییرات جذب در میکروگرم پروتئین بر دقیقه)			(میکرومول بر گرم وزن تر برگ)		(میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ)				
$P_1 \times B_1$	۶۳۴/۸^{m}	۳۹/۶۷^{f}	۴۸/۴^{i}	۶۴/۱۶^{i}	۰/۰۱۵۵^{g}	۰/۵۳۳^{a}	۱/۸۱۵^{j}	۰/۷۱۴^{k}	۲/۵۲۹^{m}	۰/۹۸۸^{j}	۴۲۲^{h}
$P_1 \times B_2$	۶۵۳/۹۳^{lm}	۴۰/۱۸^{f}	۴۹/۴^{hi}	۶۵/۸۱^{i}	۰/۰۱۷۴^{f}	۰/۵۰۴^{b}	۲/۰۴۴^{ij}	۰/۷۲^{k}	۲/۷۶۴^{lm}	۱/۰۵۸^{i}	۴۴۳^{g}
$P_1 \times B_3$	۶۱۸/۸۷^{jk}	۴۵/۰۱^{d}	۵۱/۲^{gh}	۶۸/۶۵^{h}	۰/۰۱۷۵^{f}	۰/۴۸۲^{c}	۲/۱۱۴^{hi}	۰/۷۶۸^{ij}	۲/۸۸۲^{kl}	۱/۰۷۲^{i}	۴۵۲^{g}
$P_1 \times B_4$	۶۶۹/۲۷^{i}	۴۶/۱۵^{d}	۵۳/۰۸^{fg}	۷۱/۰۲^{g}	۰/۰۱۹۷^{e}	۰/۴۷۵^{c}	۲/۳۴۵^{gh}	۰/۷۷۲^{hij}	۳/۱۱۷^{jk}	۱/۲۰۴^{g}	۴۷۴^{f}
$P_1 \times B_5$	۷۴۰/۸^{fg}	۴۸/۰۸^{c}	۵۶/۴۳e	۷۵/۴۲^{f}	۰/۰۲۲^{d}	۰/۴۴۸^{d}	۲/۸۰۲^{de}	۰/۸۵۱^{g}	۳/۶۵۳^{gh}	۱/۲۲۵^{fg}	۵۲۲^{d}

$P_1 \times B_6$	۸۰۰/۹۳^{e}	۴۸/۹۵^{c}	۵۸/۸^{d}	۷۸/۲۲^{e}	۰/۰۲۲۲^{d}	۰/۴۳۱^{e}	۲/۸۵۱^{d}	۰/۹۲۵^{f}	۳/۷۷۶^{fg}	۱/۳۳۸^{d}	۵۳۸^{d}
$P_1 \times B_7$	۹۱۹/۹۳^{c}	۵۲/۱۲^{b}	۶۲/۹۹^{bc}	۸۳/۲۳^{b}	۰/۰۲۴۶^{c}	۰/۳۸۵^{g}	۳/۶۳۲^{a}	۰/۹۷۴^{de}	۴/۶۰۶^{c}	۱/۴۱۸^{c}	۵۶۴^{c}
$P_2 \times B_1$	۵۵۶/۰۷^{lm}	۴۰/۱۶^{f}	۴۹/۱۴^{i}	۶۶/۰۳^{i}	۰/۰۱۵۷^{g}	۰/۵۱۲^{b}	۱/۸۳۵^{j}	۰/۷۶۱^{j}	۲/۵۹۶^{m}	۱/۰۵۵^{i}	۴۴۴^{g}
$P_2 \times B_2$	۶۲۶/۳۳^{j}	۴۲/۸۴^{e}	۵۳/۴۶^{f}	۷۰/۸۱^{gh}	۰/۰۱۷۸^{f}	۰/۴۸۵^{c}	۲/۰۹۵^{i}	۰/۸۰۵^{hi}	۲/۹^{kl}	۱/۱۳۵^{h}	۴۷۳^{f}
$P_2 \times B_3$	۶۸۷/۸^{hi}	۴۵/۷۷^{d}	۵۳/۵۴^{f}	۷۴/۶۳^{f}	۰/۰۱۹۷^{e}	۰/۴۷۴^{c}	۲/۵۴۳^{fg}	۰/۸۵۸^{g}	۳/۴۰۱^{hi}	۱/۲۲^{fg}	۵۰۰^{e}
$P_2 \times B_4$	۷۵۲/۲^{fg}	۴۶/۱۲^{d}	۵۸/۴۷^{d}	۷۸/۰۷^{e}	۰/۰۱۹۸^{e}	۰/۴۳^{e}	۳/۰۸۸^{c}	۰/۸۶۳^{g}	۳/۹۵۱^{ef}	۱/۲۷۵^{ef}	۵۲۱^{d}
$P_2 \times B_5$	۸۰۰/۰۷^{e}	۴۸/۳۶^{c}	۶۱/۰۸^{c}	۷۷/۹۶^{e}	۰/۰۲۱۹^{d}	۰/۴۰۸^{f}	۳/۱۱۵^{bc}	۰/۹۶۵^{e}	۴/۰۸^{de}	۱/۲۸۸^{de}	۵۳۴^{d}
$P_2 \times B_6$	۸۵۵/۳۳^{d}	۴۹/۱۵^{c}	۶۱/۱۸^{c}	۸۳/۰۴^{bc}	۰/۰۲۶۷^{b}	۰/۴۰۱^{f}	۳/۶۵۵^{a}	۰/۹۸۸^{de}	۴/۶۴۳^{bc}	۱/۴۱۵^{c}	۵۶۱^{c}
$P_2 \times B_7$	۹۶۰/۶۷^{ab}	۵۲/۱۸^{b}	۶۴/۶۷^{ab}	۸۵/۸۸^{a}	۰/۰۲۷^{b}	۰/۳۸۴^{g}	۳/۸۴۶^{a}	۱/۰۳۵^{bc}	۴/۸۸۱^{ab}	۱/۴۸۵^{b}	۵۷۷^{c}
$P_3 \times B_1$	۵۸۳/۵۳^{kl}	۴۲/۳۸^{e}	۵۱/۳^{gh}	۷۱/۸۷^{g}	۰/۰۱۹۵^{e}	۰/۵۰۵^{b}	۲/۵۱۱^{fg}	۰/۸۰۴^{hi}	۳/۳۱۵^{ij}	۱/۱۴۴^{h}	۴۷۷^{f}
$P_3 \times B_2$	۶۵۲/۷۳^{ij}	۴۳/۰۷^{e}	۵۶/۱۶^{e}	۷۵/۶۱^{f}	۰/۰۲۱۹^{d}	۰/۴۵۲^{d}	۲/۵۸۸^{ef}	۰/۸۱۱^{h}	۳/۳۹۹^{hi}	۱/۲۷۱^{ef}	۵۰۱^{e}
$P_3 \times B_3$	۷۱۰/۰۷^{gh}	۴۶/۳۸^{d}	۵۹/۰۶^{d}	۸۰/۱۳^{de}	۰/۰۲۴۵^{c}	۰/۴۵^{d}	۲/۸۲۵^{d}	۰/۹۱۹^{f}	۳/۷۴۴^{fg}	۱/۴^{c}	۵۲۶^{d}
$P_3 \times B_4$	۸۵۷/۵۳^{d}	۴۸/۰۸^{c}	۶۳/۴۱^{b}	۸۰/۸۵^{cd}	۰/۰۲۴۶^{c}	۰/۴۴۹^{d}	۳/۳۲۲^{b}	۱/۰۱۲^{cd}	۴/۳۳۴^{d}	۱/۴۰۲^{c}	۵۳۵^{d}
$P_3 \times B_5$	۸۷۹/۸^{d}	۵۱/۰۴^{b}	۶۵/۸۹^{a}	۸۳/۳۷^{b}	۰/۰۲۶۸^{b}	۰/۴۰۸^{f}	۳/۸۲^{a}	۱/۰۳^{bc}	۴/۸۵^{abc}	۱/۴۲۲^{c}	۵۷۴^{c}
$P_3 \times B_6$	۹۵۰/۸^{bc}	۵۴/۰۱^{a}	۶۶/۳^{a}	۸۵/۹۹^{a}	۰/۰۲۷۲^{b}	۰/۳۸۴^{g}	۳/۸۲۵^{a}	۱/۰۵۵^{b}	۴/۸۸^{ab}	۱/۵۴۸^{a}	۶۰۲^{b}
$P_3 \times B_7$	۹۹۶/۲۷^{a}	۵۴/۳۸^{a}	۶۶/۵۷^{a}	۸۶/۲۴^{a}	۰/۰۲۹۱^{a}	۰/۳۷۷^{g}	۳/۸۵۲^{a}	۱/۱۱۵^{a}	۴/۹۶۷^{a}	۱/۵۵۴^{a}	۶۳۱/۶۷^{a}
LSD	۳۶/۴۴	۱/۴۶۴	۱/۹۹۲	۲/۳۰۴	۰/۰۰۱۳	۰/۰۱۵۶	۰/۲۳۱	۰/۰۳۹۵	۰/۲۶۹	۰/۰۵۵۲	۱۷/۰۶۲

P_1، P_2 و P_3 به‌ترتیب عدم محلول‌پاشی، محلول‌پاشی ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار پوترسین.

B_1، B_2، B_3، B_4، B_5، B_6، B_7 به‌ترتیب عدم مصرف کودهای زیستی، کاربرد ریزوبیوم، میکوریزا، ریزوبیوم با ازتوباکتر، میکوریزا با ازتوباکتر، ریزوبیوم با میکوریزا، ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم.

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری بر اساس آزمون LSD با هم ندارند.

P_1, P_2 and P_3 are no putrescine, foliar application 0.5 and 1 mM putrescine, respectively.

B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, and B_7 are no application of biofertilizers, application of rhizobium, mycorrhiza, rhizobium with azotobacter, mycorrhiza with azotobacter, rhizobium with mycorrhiza, azotobacter with mycorrhiza and rhizobium, respectively

Means with similar letters in each column are not significantly different based on LSD test.

برخی محققان معتقدند کاربرد میکوریزا از طریق بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب افزایش محتوای کلروفیل می‌شود (Zare *et al.*, 2015). از این‌رو، در این بررسی علت دیگر افزایش محتوای کلروفیل با کاربرد توأم کودهای زیستی (به ویژه کاربرد توأم میکوریز با ریزوبیوم و ازتوباکتر) می‌تواند ناشی از افزایش به‌ترتیب ۳۷/۰۸، ۳۷/۵۴ و ۳۴/۴۱ درصدی فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین باشد (جدول ۴) که با کاهش گونه‌های فعال اکسیژن، مانع از تخریب کلروفیل می‌شود.

یکی از علل تجزیه کلروفیل و یا کاهش محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید می‌تواند اتیلن تولیدی در شرایط محدودیت آبی ناشی از زراعت دیم باشد، ولی پلی‌آمین‌ها به‌علت نقش ضد اتیلنی که دارند، مانع از تولید آنزیم‌های مداخله‌کننده در ساخت اتیلن می‌شوند و از تولید رادیکال‌های آزاد که موجب تجزیه کلروفیل می‌شوند، جلوگیری می‌کنند. همچنین، پلی‌آمین‌ها از تخریب کلروفیل از طریق کاهش فعالیت آنزیم‌های هیدرولیتیک روی غشای تیلاکوئید جلوگیری می‌کنند (Valero *et al.*, 2002). پوترسین به‌علت ویژگی آنتی‌اکسیدانی که دارد با ممانعت از تخریب ساختار غشاء کلروپلاست، موجب افزایش محتوای کلروفیل می‌شود (Cohen *et al.*, 2004). در بررسی Hussein و همکاران (۲۰۰۶) نیز کاربرد پوترسین با افزایش تقسیم سلولی و محتوای سایر هورمون‌های گیاهی از قبیل اکسین و جیبرلین و کاهش مقدار اسید آبسیزیک موجب افزایش محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید شد. همچنین، کاربرد پوترسین با بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد موجب کاهش نشت یونی و افزایش محتوای کلروفیل استویا شده است (Gerami *et al.*, 2019). به نظر می‌رسد کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین با کاهش محتوای پراکسید هیدروژن (جدول ۴) به‌واسطه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز) (جدول ۴)، موجب افزایش محتوای کلروفیل برگ و به تبع از آن به افزایش بیوماس ماشک منجر شد (جدول ۴).

محتوای آنتوسیانین

بر اساس جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۴) ملاحظه می‌شود که با کاربرد پوترسین و کودهای زیستی محتوای آنتوسیانین بیشتر می‌شود و محلول‌پاشی مقادیر بالایی از پوترسین (یک میلی‌مولار پوترسین) به همراه کاربرد توأم هر سه کود زیستی (ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم) و حتی کاربرد دو گانه میکوریزا با ریزوبیوم، ازتوباکتر با میکوریزا در مقایسه با عدم کاربرد این کودهای زیستی، از محتوای آنتوسیانین بالاتری برخوردار بود. به طوری که بیشترین محتوای آنتوسیانین (۰/۰۲۹۱ میکرومول برگرم وزن تر برگ) در کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین به دست آمد (جدول ۴)، که این ترکیب تیماری

افزایش ۸۷/۷۴ درصدی نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین داشت (جدول ۴). از آنجایی که واحدهای سازنده فلاونوئیدها نیاز مبرم به ATP و NADPH دارند و حضور عناصری نظیر نیتروژن و فسفر برای تشکیل ترکیب‌های فوق ضروری است، ازاین‌رو به نظر می‌رسد کودهای زیستی با انحلال بیشتر فسفات و تثبیت نیتروژن و کمک به جذب کارآمد فسفر و نیتروژن توسط ریشه، موجب افزایش محتوای آنتوسیانین شده اند (Hassan, 2009). همچنین، در شرایط تنش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز PLA به‌عنوان آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنیل پروپانوئیدی افزایش می‌یابد و به افزایش تولید ترکیبات فنلی از جمله آنتوسیانین منجر می‌شود (Keutgen and Pawelzik, 2007). بخشی از افزایش محتوای آنتوسیانین در کاربرد کودهای زیستی به‌ویژه میکوریزا می‌تواند ناشی از تأثیر این کودها در افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی باشد (جدول ۴). محققان دیگر نیز افزایش محتوای آنتوسیانین‌ها در گیاهان تیمارشده با میکوریزا را به افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی به‌منظور کاهش رادیکال‌های آزاد و نیز القا بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی فلاوونوئیدها نسبت دادند (Tofighi *et al*., 2016).

در پژوهش حاضر، محتوای آنتوسیانین با کاربرد پوترسین افزایش یافت، در این راستا محققان معتقدند تیمار گیاهان با پلی‌آمین‌ها می‌تواند ژن‌های درگیر در سنتز آنتوسیانین مثل فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز و چالکولن‌ایزومراز را تحریک کنند. علاوه بر آن، تجمع پلی‌آمین در بافت‌های گیاهی در معرض تنش با اتصال به ترکیبات آنتوسیانینی از اکسایش آن‌ها جلوگیری کرده و محتوای آن‌ها را بالا می‌برد (Valero *et al*., 1998). در این بررسی نیز به نظر می‌رسد کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین با کاهش محتوای پراکسیدهیدروژن (جدول ۴) به‌واسطه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز) (جدول ۴)، موجب افزایش محتوای آنتوسیانین (جدول ۴) شده است.

محتوای پراکسیدهیدروژن (H_2O_2)

بیشترین محتوای پراکسیدهیدروژن به عدم کاربرد پوترسین و کودهای زیستی تعلق داشت (جدول ۴). با افزایش غلظت محلول‌پاشی با پوترسین و کاربرد توأم کودهای زیستی در مقایسه با کاربرد انفرادی این کودها، محتوای پراکسیدهیدروژن با شدت بیشتری کاهش یافت (جدول ۴). به طوری که کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین موجب کاهش ۴۱/۳۷ درصدی محتوای پراکسیدهیدروژن نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و پوترسین شد (جدول ۴). به نظر می‌رسد کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین با بهبود فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز(جدول ۴) موجب کاهش محتوای پراکسیدهیدروژن ماشک شد (جدول ۴). کاهش محتوای پراکسیدهیدروژن می‌تواند از تخریب کلروفیل به‌واسطه کاهش گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری کرده و همین امر زمینه لازم برای بهبود

فتوسنتز و افزایش بیوماس ماشک را فراهم نماید. در واقع قارچ‌های میکوریزا با تولید جاروب‌کننده‌های رادیکال پروکسیل نظیر افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (جدول ۴)، پایداری سلولی در برابر رادیکال‌های آزاد و ایجاد سیستم قوی مهارکننده در برابر ROS نقش مهمی دارند (Ashraf and Foolad, 2007). باکتری‌ها نیز با افزایش بیان ژن mRNA آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ضمن افزایش فعالیت این آنزیم‌ها موجب کاهش محتوای پراکسیدهیدروژن می‌شوند (Gururani *et al.*, 2012). Fornazier و همکاران (۲۰۰۲) اظهار داشتند که مکانیسم دفاع سلولی پلی‌آمین‌ها در برابر تنش، از طریق فعال‌سازی بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌شود.

فلورسانس کلروفیل (فلورسانس بیشینه (F_m)، فلورسانس متغیر (F_v) و فلورسانس کمینه (F_0))

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین موجب افزایش ۴۹/۶۸ درصدی فلورسانس بیشینه نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین شد (جدول ۵). همچنین، کاربرد ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین به‌ترتیب موجب افزایش ۶۴/۹ و ۲۴/۱۷ درصدی فلورسانس متغیر و کاهش ۶۷/۲۴ و ۲۳/۴۶ درصدی فلورسانس کمینه نسبت به شرایط عدم کاربرد کودهای زیستی و عدم محلول‌پاشی پوترسین شد (جدول ۵). کاربرد توأم میکوریز با ریزوبیوم و ازتوباکتر در مقایسه با کاربرد دوگانه ریزوبیوم با ازتوباکتر، میکوریزا با ازتوباکتر، ریزوبیوم با میکوریزا اثر بیشتری در کاهش فلورسانس کمینه داشت. روند مشابهی نیز در محلول‌پاشی پوترسین مشاهده شد. به طوری که مقادیر بالای محلول‌پاشی پوترسین در مقایسه با مقادیر پایین و عدم محلول‌پاشی، فلورسانس کمینه را بیشتر کاهش داد. هر چقدر مقدار فلورسانس کمینه کمتر باشد، فعالیت‌های فتوسنتزی به‌نحو مطلوبی در جریان است (Andrews *et al.*, 1995) و همین امر می‌تواند یکی از علل اصلی افزایش بیوماس تولیدی در چنین ترکیبات تیماری باشد. فلورسانس کمینه توسط تنش‌های محیطی دچار تغییر می‌شود که علت آن دگرگونی ساختار و تغییر در رنگدانه‌های فتوسیستم II است (Bhardway and Singhal, 1981). کاهش در فلورسانس بیشینه در شرایط تنش نشان‌دهنده اکسیداسیون کمتر QA است که موجب کاهش واکنش‌های فتوشیمیایی در شرایط تنش می‌شود (Wilson and Greaves, 1993). محدودیت آبی ناشی از زراعت دیم با تأثیر منفی که بر آسیمیلاسیون کربن می‌گذارد، ظرفیت پذیرش و انتقال الکترون را کاهش داده، در نتیجه سیستم به سرعت به Fm می‌رسد که نتیجه آن کاهش فلورسانس متغیر (Fv) خواهد بود (جدول ۵). ریزجانداران مفید خاکزی از جمله قارچ‌های همزیست مانند میکوریزا در زمان وقوع تنش‌های محیطی با تولید موادی از قبیل اکسین، آنتی‌اکسیدان‌ها، سیتوکنین‌ها و آنزیم ACC دآمیناز به رشد بهتر گیاه و تحمل شرایط نامساعد کمک

می‌کنند (Jungwook *et al*., 2009)، از این رو به کارگیری کودهای زیستی نظیر قارچ میکوریز و باکتری‌های ریزوبیوم و ازتوباکتر تحت شرایط تنش توانست تأثیر مثبتی بر شاخص‌های فلورسانس کلروفیل داشته باشد.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر اصلی کاربرد کودهای زیستی و پوترسین بر فلورسانس متغیر و کمینه

Table 5. Means comparison of the main effect biofertilizers and putrescine application on variable and minimum fluorescence

کودهای زیستی				سطوح محلول‌پاشی پوترسین			
سطوح کودهای زیستی	فلورسانس متغیر	فلورسانس کمینه	محتوای پرولین ($\mu g.g^{-1}FW$)	سطوح محلول‌پاشی پوترسین	فلورسانس متغیر	فلورسانس کمینه	محتوای پرولین ($\mu g.g^{-1}FW$)
B_1	۳۰۶/۶۴^{e}	۱۴۲/۵۱^{a}	۶/۵۱^{g}	P_1	۳۵۷/۵۲^{c}	۱۳۰/۳۴^{a}	۷/۶۸^{c}
B_2	۳۲۹/۸۲^{e}	۱۴۱/۰۳^{a}	۷/۰۲^{f}	P_2	۳۹۲/۴۹^{b}	۱۲۳/۲۲^{a}	۷/۹۹^{b}
B_3	۳۵۹/۵۳^{d}	۱۳۳/۱۴^{a}	۷/۶۴^{e}	P_3	۴۴۳/۹۶^{a}	۱۰۵/۵۷^{b}	۸/۶۶^{a}
B_4	۳۸۰/۷۸^{d}	۱۲۹/۲۲^{ab}	۷/۹۵^{d}				
B_5	۴۳۲/۷۵^{c}	۱۱۰/۵۸^{bc}	۸/۶۱^{c}				
B_6	۴۷۰/۷۴^{b}	۹۶/۲۵^{cd}	۹/۲۵^{b}				
B_7	۵۰۵/۶۷^{a}	۸۵/۲۱^{d}	۹/۷۸^{a}				
LSD	۲۸/۷۹	۱۹/۲۴۸	۰/۲۲۹	LSD	۱۸/۸۴۷	۱۲/۶۰۱	۰/۱۵

P_1، P_2 و P_3 به‌ترتیب عدم محلول‌پاشی، محلول‌پاشی ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار پوترسین.

B_1، B_2، B_3، B_4، B_5، B_6، B_7 به‌ترتیب عدم مصرف کودهای زیستی، کاربرد ریزوبیوم، میکوریزا، ریزوبیوم با ازتوباکتر، میکوریزا با ازتوباکتر، ریزوبیوم با میکوریزا، ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم. میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون اختلاف آماری معنی‌داری بر اساس آزمون LSD با هم ندارند.

P_1, P_2 and P_3 are no putrescine, foliar application 0.5 and 1 mM putrescine, respectively.
B_1, B_2, B_3, B_4, B_5, B_6, and B_7 are no application of bio fertilizers, application of rhizobium, mycorrhiza, rhizobium with azotobacter, mycorrhiza with azotobacter, rhizobium with mycorrhiza, azotobacter with mycorrhiza and rhizobium, respectively. Means with similar letters in each column are not significantly different based on LSD test.

محتوای پرولین

با افزایش غلظت پوترسین محتوای پرولین افزایش یافت به طوری که بیشترین و کمترین محتوای پرولین به محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین و عدم کاربرد پوترسین (به‌ترتیب ۸/۶۶ و ۷/۶۸ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) تعلق داشت (جدول ۵). روند مشابهی نیز در کاربرد کودهای زیستی مشاهده گردید. بدین صورت که عدم کاربرد کودهای زیستی از کمینه محتوای پرولین برخوردار بود و با کاربرد کودهای زیستی، محتوای پرولین افزایش یافت. در ضمن کاربرد دوگانه کودهای زیستی (میکوریزا با ریزوبیوم، ازتوباکتر با میکوریزا) از محتوای پرولین کمتری در مقایسه با کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریز و ریزوبیوم داشت (جدول ۵). بر اساس جدول مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵)، بیشترین محتوای پرولین (۹/۷۸ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) در کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریز و ریزوبیوم و کمترین آن (۶/۵۱ میکروگرم بر گرم وزن تر برگ) در عدم کاربرد کودهای زیستی به دست آمد (جدول ۵). بر اساس شرایط اقلیمی منطقه مورد کشت، به‌ویژه از

نظر نزولات، مشخص می‌شود که ماشک مورد کشت در طول دوره رشدی با محدودیت آبی مواجه است و از آنجایی که گلوتامات پیش ماده کلروفیل و پرولین است، در چنین شرایطی به پرولین تبدیل شده و از محتوای کلروفیل کاسته می‌شود (جدول ۴). همچنین، در شرایط محدودیت آبی به‌علت تخریب پروتئین‌ها، انباشت برخی آمینواسیدهای آزاد به‌منظور تنظیم اسمزی سلول می‌تواند علتی بر افزایش تولید پرولین باشد. بخشی از افزایش محتوای پرولین در کاربرد پوترسین را می‌توان به نقش حمایت‌کننده پلی‌آمین‌ها از پروتئین‌ها و آنزیم‌های دخیل در سنتز پرولین، حفظ فتوسنتز و تعدیل عناصر غذایی نسبت داد (Kianmehr and Mehdizadeh, 2014).

بیوماس کل

مقایسه میانگین‌ها نشان داد بیشترین بیوماس کل (۹۹۶/۲۷ گرم در متر مربع) در ترکیب تیماری کاربرد توأم ازتوباکتر با میکوریزا و ریزوبیوم و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین و کمترین آن (۵۳۴/۸ گرم در متر مربع) در عدم کاربرد کودهای زیستی و پوترسین به دست آمد (جدول ۴). به نظر می‌رسد بخشی از بهبود بیوماس کل در کاربرد کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین ناشی از افزایش محتوای کلروفیل و آنتوسیانین (جدول ۴) و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش محتوای پراکسید هیدروژن (جدول ۴) باشد. نتایج مشابهی نیز توسط Zare Hassanabdi و همکاران (۲۰۲۰) مبنی بر اینکه همزیستی ریشه گیاه با قارچ میکوریزا با بهبود توانایی گیاه در جذب آب و مواد غذایی و افزایش محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی موجب افزایش وزن خشک گیاه می‌شود، گزارش شده است. از آنجایی که کاربرد توأم میکوریز با ریزوبیوم و ازتوباکتر در مقایسه با کاربرد دوگانه ریزوبیوم با ازتوباکتر، میکوریزا با ازتوباکتر، ریزوبیوم با میکوریزا اثر بیشتری در افزایش بیوماس کل در واحد سطح داشت (جدول ۴)، در این راستا به نظر می‌رسد بخشی از افزایش بیوماس ماشک به‌واسطه کاربرد قارچ میکوریزا می‌تواند ناشی از افزایش جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم (Shirali *et al*., 2020) و بهبود محتوای کلروفیل (جدول ۴) و بخش دیگری از افزایش به‌واسطه کاربرد باکتری‌ها، ناشی از افزایش توان تثبیت زیستی نیتروژن و افزایش دسترسی به این عنصر توسط گیاه باشد (Chandrasekhar *et al*., 2005) که در افزایش محتوای کلروفیل و ارتقای سیستم فتوسنتزی گیاه و در نهایت بیوماس کل نقش اساسی دارند. به نظر می‌رسد بخشی از افزایش بیوماس در کاربرد پوترسین می‌تواند ناشی از تأثیر این ماده بر هورمون‌های گیاهی از قبیل اکسین و جیبرلین و کاهش مقدار اسید آبسیزیک باشد (Hussein *et al*., 2006) که موجب بهبود محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید و در نهایت افزایش وزن خشک اندام های هوایی می‌شود. بخش دیگری از افزایش بیوماس در کاربرد پوترسین می‌تواند ناشی از تأثیر این ماده در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی باشد (جدول ۵). در این زمینه Hassanpour Nejad و Ranjber (۲۰۱۸) افزایش بیوماس گیاه شاهی در کاربرد پوترسین را به بهبود

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نسبت دادند. Farsari و Moghaddam (۲۰۱۹) نیز افزایش بیوماس ریحان سبز به‌واسطه کاربرد میکوریزا و پوترسین را به افزایش محتوای کلروفیل a، b، کل و کاروتنوئید و بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی نسبت دادند.

جمع‌بندی

کاربرد توأم کودهای زیستی و محلول‌پاشی یک میلی‌مولار پوترسین با افزایش محتوای پرولین و کمک به جذب بهتر آب در شرایط دیمی که گیاه با محدودیت آبی مواجه است و همچنین بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز) در کمک به کاهش گونه‌های فعال اکسیژن تولیدی در شرایط دیم به افزایش محتوای کلروفیل و بهبود سیستم فتوسنتزی گیاه، کاهش محتوای پراکسیدهیدروژن و افزایش بیوماس کل ماشک گل‌خوشه‌ای منجر شد. بر اساس نتایج آزمایش حاضر، به نظر می‌رسد استفاده از کودهای زیستی و محلول‌پاشی پوترسین با بهبود صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی و تعدیل آثار ناشی از محدودیت آبی در شرایط دیم، می‌تواند به‌منظور بهبود بیوماس کل ماشک گل‌خوشه‌ای روشی مناسب باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از طرح پژوهشی مصوب در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی است که نویسندگان مراتب تشکر و سپاسگزاری خود را از یکایک همکاران ارجمند در حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده اعلام می‌کنند.

References

Abdel Latef, A. A. (2010) Changes of antioxidative enzymes in salinity tolerance among different wheat cultivars. Cereal Research Communications, 38: 43-55 (in Persien).

Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. and Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. Plant, Cell and Environment 24(12): 1337-1344.

Al-Karaki, G. N., Mc-Michael, B. and Zak, J. (2004) Field response of wheat to *Arbuscular mycorrhizal* fungi and drought stress. Mycorrhiza 14(4): 263-269.

Ageeb Akladious, S. and Mohamed, H. I. (2018) Ameliorative effects of calcium nitrate and humic acid on the growth, yield component and biochemical attribute of pepper (*Capsicum annuum*) plants grown under salt stress. Scientia Horticulturae, 236: 244-250

Andrews, J. R., Fryer, M. J. and Baker, N. R. (1995) Characterization of chilling effects on photosynthetic performance of maize crops during early season growth using chlorophyll fluorescence. Journal of Experimental Botany 46: 1195-1203.

Arnon, A. N. (1967) Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal 23: 112-121.

Ashraf, M. and Foolad, M. R. (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany 59(2): 206-216.

Bhardway, R. and Singhal, G. (1981) Effect of water stress on photochemical activity

of chloroplasts during greening etiolated barley seedlings. Plant and Cell Physiology, 22: 155-162.

Chandrasekhar, B. R., Ambrose, G. and Jayabalan, N. (2005) Influence of biofertilizer and nitrogen source level on the growth and yield of *Echinochloa frumentacea* (Roxb.) link. Journal of Agricultural Technology 1(2): 223-234.

Cohen, A. S., Popovic, R. B. and Zalik, S. (2004) Effects of polyamines on chlorophyll and protein content, photochemical activity and chloroplast ultrastructure of barley leaf discs during senescence. Plant Physiology 64(5): 717-720.

Elliott, L. F. and Wildung, R. E. (1992) What biotechnology means for soil and water conservation? Journal of Soil Water Conservation 47(1): 17-20.

Farsari, S. and Moghaddam, M. (2019) Effect of mycorrhizal fungi and foliar application of putrescine on some biochemical characteristics and biomass of basil (*Ocimum ciliatum* L.) in two different harvesting times. Journal of Plant Environmental Physiology 14(53): 47-58 (in Persian).

Fornazier, R. F., Ferreira, R. R., Pereira, G. J. G., Molina, S. M. G. and Smith, R. J. (2002) Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 71(2): 125-131.

Gerami, M., Mohammadian, A. and Akbarpour, V. (2019) The effect of putrescine and salicylic acid on physiological characteristics and antioxidant in *Stevia Rebaudiana* B. under salinity stress. Journal of Crop Breeding 11(29): 40-54 (in Persian).

Glick, B. R. (2014) Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169(1): 30-39.

Groppa, M. D. and Benavides, M. P. (2008) Polyamines and abiotic stress: recent advances. Amino Acids 34(1): 35-45.

Gururani, M., Upadhyaya, C., Baskar, V., Venkatesh, J., Nookaraju, A. and Park, S. (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of rosscavenging enzymes and improved photosynthetic performance. Journal of Plant Growth Regulation 32(2): 245-258.

Hassan, F. A. S. (2009) Response of *Hibiscus sabdariffa* L. plant to some biofertilization treatments. Annals of Agricultural Science 54: 437-446.

Hassanpour Nejad, F. and Ranjber, M. (2018) Effect of lead and putresine interactions on cress (*Lipidium sativum*) seedling physiological and biochemical factors. Journal of Plant Ecophysiology 10(35): 38-51 (in Persian).

Hussein, M. M., EL-Gereadly, N. H. M. and El-Desuki, M. (2006) Role of putrescine in resistance to salinity of pea plants (*Pisum sativum* L.). Journal of Applied Science Research 2(9): 598-604.

Jungwook, Y., Kloepper, J. W. and Ryu, C. M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends in Plant Science, 14: 1-4.

Karo, M. and Mishra, D. (1976) Catalase, peroxidase and polyphenol oxidase activity during rice leaf senescence. Plant Physiology, 57: 315-319.

Kamaei, R., Parsa, M., Jahan, M., Rajari Sharifabadi, H. and Naserian, A. A. (2017) The effects of biological fertilizers, chemical fertilizers and manure application on some qualitative characteristics of *Vicia villosa* roth forage under greenhouse condition. Iranian Journal of Field Crops Research 14(4): 699-710 (in Persian).

Keutgen, A. J. and Pawelzik, E. (2007) Modifications of strawberry fruit antioxidants pools and fruit quality under NaCl stress. Journal of Agriculture and Food Chemistry 55(10): 4066-4072.

Khalilzadeh, K. (2017) Effects of plant growth promoting bacteria and cycocel growth regulator on yield and some physiological traits of wheat under salinity and water limitation condition. Ph. D. Thesis, University of Mohaghegh Ardabili. Ardabil. Iran (in Persian).

Khalilzadeh, R., Seyed Sharifi, R. and Jalilian, J. (2017) Growth, physiological status and yield of salt-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) plants as affected by application of bio fertilizer and cycocel. Arid Land Research and Management, 31(1): 1-18.

Kheirizadeh, Y. and Seyed, Sharifi, R. (2018) Effects of biofertilizers and zinc on yield, variations of quantum yield, stomatal conductance and some physiological traits of triticale (*Triticosecale*) under withholding conditions. Journal of Plant Process and Function, 7(26): 57-74 (in Persian).

Kianmehr, A. S. and Mehdizadeh, R. (2014) Phylogenic study of proline dehydrogenase producing *Pseudomonas putida* bacterium and bioinformatics analysis of isolated enzyme. Journal of Cellular and Molecular Researches, 27: 285-295 (in Persian).

Liu, J. H., Kitashiba, H., Wang, J., Ban, Y. and Moriguchi, T. (2007) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. Plant Biotechnology 24(1): 117-126.

Martin-Tanguy, J. (2001) Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). Plant Growth Regulation 34(1): 135-148.

Mayaka, S., Tirosh, T. and Glick, B. R. (2004) Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. Plant Science 166(2): 525-530.

Moghadasan, S., Safipour Afshar, A. and Saeid Nematpour, F. (2016) The role of mycorrhiza in drought tolerance of Marigold (*Calendula officinalis* L.). Journal of Crop Ecophysiology 9(4): 521-532 (in Persian).

Mohseni Mohammadjanlou, A., Seyed Sharifi, R. and Khomari, S. (2021) Effects of holding irrigation at reproductive stages and putrescine and biofertilizers application on grain filling period, chlorophyll content and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.). Iranian Journal of Field Crops Research. 19(2): 153-167 (in Persian).

Mohseni Mohammadjanlou**,** A., Seyed Sharifi, R. and Khomari, S. (2021). Effect of putrescine and biofertilizers on grain yield and some physiological indices of wheat (*Triticum aestivum* L.) at various irrigation levels. Journal of Crop Improvement, 24(1): 67-83 (in Persian).

Nayyar, H., Satwinder, K., Kumar, S., Singh, K. J. and Dhir, K. (2005) Involvement of polyamines in the contrasting sensitivity of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and soybean (*Glycine max* (L.) Merrill.) to water deficit stress. Botanical Bulletin of Academia Sinica 46(4): 333-338.

Rangan, P., Subramani, R., Kumar, R., Singh, A. K. and Singh, R. (2014) Recent advances in polyamine metabolism and abiotic stress tolerance. BioMed Research International, Article ID 239621, 9 pages

Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. and Vivekanandan, M. (2004) Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. Journal of Plant Physiology 161(11): 1189-1202.

Sepehri, M., Alah Jahandideh Mahjen Abadi, V., Asadi Rahmani, H. and Sadeghi Hosni, A. (2015) Influence of *Rhizobium leguminosarum* b.v. phaseoli bacteria on growth, activity of antioxidant enzymes and nutrient uptake of common bean (*Phaseolus vulgaris*)

under salinity stress. Electronic Journal of Soil Management and Sustainable Production 5(2): 165-180 (in Persian).

Seyed Sharifi, R. and Hokmalipour, S. (2013) Forage crops. 2nd edition, University of Mohaghegh Ardabili Press and Amidi Publication, Tabriz (in Persian).

Seyed Sharifi, R. and Namvar, A. (2017) Biofertilizers in agronomy. University of Mohaghegh Ardebili Press. Iran. Ardebil (in Persian).

Seyed Sharifi, R. and Khavazi, K. (2011) Effects of seed priming with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and yield attributes of maize (*Zea mays* L.) hybrids. Journal of Food Agriculture and Enviromental. 9: 496-500.

Seyed Sharifi, R., Khalilzadeh, R. and Jalilian, J. (2016) Effects of biofertilizers and cycocel on some physiological and biochemical traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salinity stress. Archives of Agronomy and Soil Science 63(3): 308-318.

Seyed Sharifi, R., Seyed Sharifi, R. and Narimani, H. (2020) Effect of bio-fertilizers and putrescine on biomass, nodulation and some morphological and biochemical traits of Vetch (*Vicia villosa*) under rainfed condition. Journal of Crop Improvement 22(4): 513-529.

Shirali, F., Almasi, R. and Fattahi, B. (2020) Effects of symbiosis with two species of *Arbuscular mycorrhiza* on some morphological and physiological characteristics of rangeland grass, *Agropyron elongatum* (Host). Beauv. Rangeland 9(2): 159-169 (in Persian).

Sudhakar, C., Lakshmi, A. and Giridara Kumar, S. (2001) Changes in the antioxidant enzyme efficacy in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba* L.) under NaCl salinity. Plant Science 167(3): 613-619.

Tofighi, K., Khavari Nejad, R., Najafi, F., Razavi, K. and Rejali, F. (2016) Interaction effect investigation of *Arbuscular mycorrhizal* fungi and plant growth regulator brassinolide on enhancing to wheat tolerance to salinity tension. Crop Physiology Journal 8(30): 5-19 (in Persian).

Toumi, I., Moschou, P. N., Paschalidis, K. A., Bouamama, B., Salem-fnayou, A. B., Ghorbel, A. W., Mliki, A. and Roubelakis-Angelakis, K. A. (2010) Abscisic acid signals reorientation of polyamine metabolism to orchestrate stress responses via the polyamine exodus pathway in grapevine. Journal of Plant Physiology 167(7): 519-525.

Valero, D., Martinez-Romero, D. and Riquelme, F. (1998) Polyamine response to external mechanical bruising in two mandarin cultivars. Horticultural Science 33(7): 1220-1223.

Valero, D., Martnes-Romero, D. M. R. and Serrano, M. S. (2002) The role of polyamines in the improvement of the shelf life of fruit. Trends in Food Science and Technology 13: 228-234.

Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars free amino acids, and anthocyanin in protoplast. Plant Physiology 64(1): 88-93.

Wilson, J. M. and Greaves, J. A. (1993) Development of fluorescence-based screening programs for temperature and water stress in crop plant. In: Adaptation of food crop to temperature and water stress. 389-398, AVRDC, Shanhua, Taiwan.

Wu, H., Wu, X., Li, Z., Duan, L., and Zhang, M. (2012) Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleraceavar* Botrytis.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine. Journal of Plant Growth Regulation, 31: 113-123.

Zahir, Z. A., Munir, A., Asghar, H. N., Shaharoona, B. and Arshad, M. (2007) Effectiveness of rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of pea (*Pisum sativum*) under drought conditions. Journal of Microbiology and Biotechnology 18: 958-963.

Zare Hassanabdi, M., Dashti, M. and Akhondi, M. (2020) The effect of two species of *Arbuscular mycorrhiza* fungi on the activity of antioxidant enzymes and morphophysiological characteristics of *Mentha pulegium* L. in drought stress. Iranian Medicinal Plants Technology 2(2): 83-100 (in Persian).

Zare, M., Siroosmehr, A. and Abdkhani, S. (2015) Effects of mycorrhizal fungi on morphological and physiological parameters of Sorghum (*Sorghum bicolor* L.) under chrome stress. Rangeland 14(4): 731-741 (in Persian).

Zare, H. R., Ghanbarzadeh, Z., Behdad, A. and Mohsenzadeh, S. (2015) Effect of silicon and nanosilicon on reduction of damage caused by salt stress in maize (*Zea mays*) seedlings. Iranian Journal of Plant Biology, 26(7): 59-74 (in Persian).