به زراعی کشاورزی
دوره ۲۰ ■ شماره ٤ ■ زمستان ۱۳۹۷
صفحه‌های ۸۱۵-۸۰۱

بررسی اثر منابع مختلف کودی بر عملکرد علوفه، اسمولیت‌ها، رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی یونجه (*Mdicago sativa* L.) در شرایط کم‌آبیاری

کامبیز خوارزمی[۱]، رضا امیرنیا[۲*]، جلال جلیلیان[۲]، مهدی تاجبخش[۳]

۱. دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۲. دانشیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۳. استاد، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۰۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۸/۳۰

چکیده

با توجه به نیاز بالای یونجه به آبیاری، تحقیق در مورد نقش انواع کودهای آلی- زیستی و شیمیایی در تعدیل اثر تنش کم‌آبی حائز اهمیت می‌باشد، لذا این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوی در دو سال زراعی (۱۳۹٤ و ۱۳۹۵) انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل آبیاری }آبیاری در حد ظرفیت زراعی (شاهد)، آبیاری در ۸۰ درصد ظرفیت زراعی، آبیاری در٦۰ درصد ظرفیت زراعی} و منابع مختلف کودی در شش سطح {میکوریزا، نیتروکسین، ورمی‌کمپوست، کود مرغی، کود شیمیایی NPK (توصیه‌شده براساس آزمون خاک) و تیمار بدون مصرف کود (شاهد)} بود. نتایج تجزیه مرکب داده‌ها نشان داد که تیمار آبیاری اثر معنی‌دار بر عملکرد علوفه، کلروفیلa ، b و کلروفیل کل، پرولین، کاروتنوئیدها، کربوهیدرات‌های محلول و فعالیت آنزیم پراکسیداز داشت. همچنین، نتایج نشان داد که کاربرد کود زیستی میکوریزا در شرایط آبیاری کامل عملکردی معادل کاربرد کود شیمیایی داشت، ولی در هر دو شرایط کم آبیاری به‌طور میانگین منجر به افزایش ۱۰/۱۸ درصدی عملکرد علوفه در مقایسه با تیمار کاربرد کود شیمیایی گردید. سایر تیمارهای کودی از نظر تأثیر بر عملکرد علوفه، روند متفاوتی در سطوح مختلف آبیاری نشان دادند. به‌طوری‌که در شرایط آبیاری در ٦۰ درصد ظرفیت زراعی تیمارهای کودی ورمی‌کمپوست، مرغی، شیمیایی و شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند. لذا با توجه به مضرات استفاده از کودهای شیمیایی می‌توان کود زیستی میکوریزا را که دارای سودمندی اکولوژیکی و زیست‌محیطی می‌باشد در زراعت یونجه به‌کار برد.

کلیدواژه‌ها: پراکسیداز، کلروفیل، کم‌آبیاری، میکوریزا، نیتروکسین.

* نویسنده مسئول
Email: r.amirnia@urmia.ac.ir

مقدمه

یونجه با نام علمی *Medicago sativa* مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای در ایران و بسیاری از نقاط جهان به‌شمار می‌رود. این گیاه به‌دلیل بالا بودن ارزش غذایی و امکان کاشت در اقلیم‌های مختلف به ملکه نباتات علوفه‌ای مشهور است (Radović *et al.*, 2009). از مهم‌ترین عواملی که می‌توانند ساختار و عملکرد گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند، مقدار آب قابل دسترس برای گیاه و آب در سطح سلول است. خشکی موجب تغییر در مسیر برخی فرآیندهای متابولیک می‌گردد (Abdeli & Pakniyat, 2010). کاهش آب در بافت‌های گیاهی سبب لوله شدن و پیچ خوردن برگ‌ها، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز، کاهش فضای بین سلولی، تخریب پروتئین‌ها، تولید مواد سمی، اختلالات هورمونی از جمله افزایش اسید آبسیزیک، افزایش تولید انواع اکسیژن واکنش‌گر، کاهش تشدیدکننده‌های رشد و تجمع پرولین و قند می‌شود (Auge *et al.*, 2015; Miller *et al.*, 2010). همچنین، تنش خشکی سبب آسیب به رنگیزه‌ها و پلاستیدها، کاهش کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها و کاهش ضخامت تیلاکوئیدها در اغلب گیاهان می‌گردد. همه این آثار مخرب خشکی باعث کاهش عملکرد محصول می‌شود (Xiao *et al.*, 2008; Zafari *et al.*, 2017).

تجمع گونه‌های فعال اکسیژن در سلول موجب آسیب رساندن به لیپیدهای غشا، پروتئین‌ها و اسید نوکلئیک می‌شود. در طی فتوسنتز تحت وضعیت کم‌آبی، نشت بالای الکترون به سمت O_2 اتفاق می‌افتد و انواع مختلف ROS نظیر سوپراکسید، پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل و رادیکال اکسیژن تولید می‌کند. گیاهان جهت مقابله با تنش اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن، سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی دارند (Miller *et al.*, 2010). مطالعات فراوانی حاکی از افزایش تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تحت تنش خشکی گزارش شده است. گیاهان از طریق سازوکارهای آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیرآنزیمی گونه‌های فعال اکسیژنی ایجادشده را کاهش می‌دهند (Hasanuzzaman *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2010).

از جمله سازوکارهای پاسخ به تنش‌های محیطی، تنظیم اسمزی است. تنظیم اسمزی، نوعی سازگاری با تنش کمبود آب است که از طریق تجمع مواد محلول درون سلول، می‌تواند به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرآیندهای وابسته به آن در پتانسیل‌های پایین آب منجر شود. در زمان تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، مولکول‌های آلی با وزن مولکولی کم‌تر مانند قندهای محلول، پرولین، پروتئین، بتائین در ریشه‌ها و اندام‌های هوایی گیاهان به منزله تنظیم‌کننده‌های اسمزی عمل می‌کنند (Lokhande *et al.*, 2010). قندهای محلول به منزله تنظیم کننده‌های اسمزی، ثبات‌دهنده غشاهای سلولی و حفظ‌کننده تورژسانس سلول‌ها عمل می‌کنند. در حقیقت، در گیاهانی که قندهای محلول در پاسخ به تنش خشکی تجمع می‌یابند، تنظیم اسمزی بهتر صورت می‌گیرد (Slama *et al.*, 2007).

قارچ‌های میکوریزا و هم‌زیستی آنها با گیاهان اثرات متعددی در راستای بهبود رشد و نمو آنها دارند. به‌طوری‌که قارچ‌های میکوریزا می‌تواند سبب تغییراتی در روابط آبی گیاه و بهبود مقاومت به خشکی یا تحمل در گیاه میزبان شود (Habibzadeh *et al.*, 2015). قارچ‌های میکوریزا بر جذب عناصر غذایی مثل فسفر، نیتروژن و همچنین جذب آب در شرایط تنش، تولید هورمون‌های گیاهی، تعدیل اثر تنش‌های محیطی، افزایش مقاومت نسبت به عوامل بیماریزا در گیاه، کاهش آسیب‌های ریشه‌ای، تأثیر بر دانه‌بندی خاک، تشدید فعالیت تثبیت زیستی نیتروژن، هم‌چنین بهبود خواص کمی مؤثر هستند.

از مهم‌ترین عناصری که توسط میکوریزا به‌طور فعال در سطح وسیع جذب می‌شود عنصر فسفر است (Baum *et al*., 2015). افزایش مقاومت به تنش خشکی توسط قارچ میکوریزا می‌تواند به‌دلیل بالاتر بردن سرعت فتوسنتز برگ و افزایش تجمع کربوهیدرات‌های غیرساختمانی و در نتیجه کاهش پتانسیل اسمزی باشد (Rapparini & Penuelas, 2014). از طرف دیگر باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن که قابلیت هم‌زیستی با ریشه بسیاری از محصولات زراعی را دارند، علاوه بر تثبیت زیستی نیتروژن سبب افزایش تقسیم سلولی در ریشه، تغییر مورفولوژی ریشه، افزایش تارهای کشنده و افزایش جذب مواد غذایی می‌شوند (Mirzakhani *et al*., 2010). هم‌چنین این باکتری‌ها باعث کاهش بیماری‌ها، بهبود ساختمان خاک، تحریک بیش‌تر رشد گیاه و افزایش کمی و کیفی محصول و افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی می‌شوند (Nagananda *et al*., 2010).

از دیگر منابع کودی آلی می‌توان به کود ورمی‌کمپوست اشاره کرد. ورمی‌کمپوست یک ترکیب آلی است که از لحاظ میکروبیولوژیکی فعال و غنی از عناصر ماکرو و میکرو است و محصول تعامل بین کرم‌های خاکی و میکروارگانیسم‌ها برای تجزیه مواد آلی است (Yang *et al*., 2015). استفاده از آن در کشاورزی پایدار برای بهبود وضعیت تخلخل خاک و در نتیجه فراهم کردن بیشتر عناصر غذایی بسیار مفید است (Zang *et al*., 2004). ورمی‌کمپوست سرشار از انواع میکروارگانیسم‌هایی است که قادرند تعدادی از اسیدهای آلی، از جمله اسید اگزالیک را آزاد کرده و منجر به حلالیت عناصر به‌ویژه پتاسیم و فسفر شوند، هم‌چنین افزایش نیتروژن خاک می‌تواند به‌دلیل فعالیت بیش‌تر اسید فسفاتاز و پروتئاز خاک تیمار شده با ورمی‌کمپوست باشد (Adak *et al*., 2014). همچنین ورمی‌کمپوست غنی از هورمون‌های رشد و ویتامین‌هایی است که باعث افزایش جمعیت میکروبی خاک و نگهداری طولانی‌مدت عناصر غذایی بدون اثرات منفی بر محیط می‌گردد (Cremeneac & Boclaci, 2011; Padmavathiamma *et al*., 2008). با توجه به اهمیت گیاه یونجه و مصرف گسترده آن جهت تغذیه دام و همچنین کمبود آب در کشور، در این تحقیق تأثیر منابع مختلف کودی بر عملکرد و برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی یونجه در شرایط کم آبیاری ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۲۴ تیمار و ۳ تکرار در دو سال زراعی (۱۳۹۴ و ۱۳۹۵) در مزرعه ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوی (با موقعیت جغرافیای ۳۸ درجه و ۵ دقیقه عرض شمالی و ۴۶ درجه و ۱۷ دقیقه طول شرقی با ۱۳۶۰ مترارتفاع از سطح دریا) انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل آبیاری در سه سطح (آبیاری در ظرفیت زراعی (شاهد)، آبیاری در ۸۰ درصد ظرفیت زراعی، آبیاری در ۶۰ درصد ظرفیت زراعی) و منابع مختلف کودی در شش سطح میکوریزا[1]، نیتروکسین، ورمی‌کمپوست، کود مرغی، کودشیمیایی (NPK توصیه‌شده براساس آزمون خاک) و بدون مصرف کود (شاهد) بودند. قبل از کشت، جهت تعیین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه، از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری و ۳۰ تا ۶۰ سانتی‌متری خاک نمونه‌برداری انجام گرفت (جدول ۱).

1. *Rhizophagus intraradices*

جدول ۱. مشخصات فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه آزمایشی

عمق خاک زراعی (cm)	شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	pH	کربن آلی (درصد)	مواد خنثی‌شونده (درصد)	هدایت الکتریکی (dS/m)	فسفر قابل جذب (ppm)	پتاسیم قابل جذب (ppm)
۰-۳۰	٤۰	۲۳	۳۷	۸/٤۸	۰/۵۷	۱۱/۵	۱/۰۲	٤/٦٦	۱٦۸
۳۰-٦۰	۳۵	۳۰	۳۵	۸/۳۲	۰/۳۹	۱۳	۰/۷۹۵	۱/۳۱	۱۲۱

پس از تسطیح زمین، اقدام به کرت‌بندی هر واحد آزمایشی به مساحت ۱٤ مترمربع گردید هر کرت دارای هفت خط کشت و به فاصله ۳۵ سانتی‌متر بین خطوط بود. میزان بذر بر مبنای ۲۵ کیلوگرم در هکتار کشت گردید. در این آزمایش از قره یونجه (اکوتیپ قارقلوق)، با قوه نامیه ۹۸ درصد و خلوص ۹۹ درصد استفاده شد. تاریخ کاشت، نیمه دوم اسفند سال ۱۳۹۳ بود.

به‌منظور تلقیح بذور با کود زیستی نیتروکسین، در سایه، بذرها با صمغ عربی و نیتروکسین (شامل دو باکتری آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن ازتوباکتر[1] و آزوسپیریلوم[2]) به‌میزان ۲ لیتر در هکتار به‌طور کامل مخلوط و به هم زده شدند تا سطح تماس صمغ عربی و باکتری با بذر یونجه افزایش یابد. برای تلقیح یونجه با میکوریزا یک گرم از خاکی که حاوی حدود ۱۰۰۰ اسپور بود در زیر بذر قرار داده شد. برای اعمال کودهای آلی (کود مرغی و ورمی‌کمپوست) (جدول ۲) برحسب نیاز غذایی یونجه به‌ترتیب بر مبنای ۲/۵ و ۱۰ تن در هکتار، در هنگام کاشت در سطح کرت‌های موردنظر به‌طور یکنواخت پخش و بلافاصله توسط بیل دستی وارد خاک شدند.

جدول ۲. نتایج تجزیه کودهای آلی مصرف‌شده

نوع کود آلی	نیتروژن (درصد)	فسفر (درصد)	پتاسیم (درصد)
کود مرغی	۲/۱٤	۲/۳۵	۰/۷۸
کود ورمی‌کمپوست	۱/٦۳	۱/۵۳	۰/۹٦

1. *Azotobacter chorococum*
2. *Azospirillum lipoferoum*

کلیه مراقبت‌های زراعی در مورد تمامی تیمارها به‌صورت یکنواخت انجام گرفت. جهت اجرای دقیق آزمایش در خصوص اعمال تیمارهای آبیاری، نمونه‌ای از خاک مزرعه تهیه و جهت تعیین ظرفیت زراعی، نقطه پژمردگی دائم و وزن مخصوص خاک به آزمایشگاه ارسال شد. نتایج آزمایش خاک نشان داد که وزن مخصوص ظاهری خاک ($1/42 g/cm^3$) بود و میزان رطوبت وزنی خاک در ظرفیت زراعی (۱۹٪) و در نقطه پژمردگی دائم (۹٪/٦) بود. نحوه اعمال تیمارهای آبیاری با استفاده از فرمول اندازه‌گیری آب سهل‌الوصول، میزان آب مورد نیاز برای هر کرت آزمایشی در شرایط نرمال (ظرفیت زراعی) محاسبه شد و این عدد با حاصل‌ضرب در اعداد ۸۰ و ٦۰، مقدار آب مورد نیاز برای تیمارهای ۸۰ درصد ظرفیت زراعی و ٦۰ درصد ظرفیت زراعی به‌دست آمد.

$$RAW=[(FC - PWP)/100 \times \rho.b] \times D \times MAD$$

که در آن: RAW= آب سهل‌الوصول، FC= ظرفیت زراعی مزرعه، PWP= نقطه پژمردگی دائم، ρ.b= وزن مخصوص خاک، D= عمق توسعه ریشه برحسب میلی‌متر، MAD= حداکثر تخلیه مجاز (برای گیاه یونجه ۰/۵۵ در نظر گرفته شد).

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در مرحله گلدهی کامل، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره الکلی با سه میلی‌لیتر آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون + ۱۰۰ میلی‌لیتر سولفوریک‌اسید ۷۲ درصد) مخلوط گردید. این محلول ده دقیقه در حمام آب جوش قرار داده شد تا واکنش انجام و رنگی شود. سپس میزان جذب آن با اسپکتروفتومتر (مدل

UV-Vis Camspec M 350، ساخت شرکت Double Beam Camspec M 350) در طول موج ٦٢٥ نانومتر قرائت و مقدار قندهای محلول محاسبه شد (Irigoyen *et al*., 1992). برای اندازه‌گیری پرولین، ۰/۲۵ گرم از بافت گیاهی تازه توزین و با استفاده از نیتروژن مایع در هاون به‌صورت پودر در آمد. به پودر حاصل ۵ میلی‌لیتر از اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد اضافه شد. یک میلی‌لیتر از مواد فیلترشده با حجم مساوی از اسید استیک گلاسیال و معرف نین‌هیدرین مخلوط شد و به‌مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۱۰۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از سرد شدن، به محلول دو میلی‌لیتر تولوئن اضافه شد که دو لایه مجزا تشکیل شد. سرانجام جذب لایه رنگی فوقانی (حاوی پرولین محلول در تولوئن) در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و سپس منحنی استاندار آن رسم و معادله ریاضی آن محاسبه شد (Paquin & Lechasseur, 1979). برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقدار ۰/۵ گرم از برگ تازه با استفاده از نیتروژن مایع در هاون به خوبی له شد و سپس ۲۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد به نمونه‌ها اضافه شد، و در دستگاه سانتریفیوژ (مدل SIGMA ساخت آمریکا) با سرعت ٦٠٠٠ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. عصارهٔ فوقانی حاصل از سانتریفیوژ به فالکون منتقل و مقداری از نمونهٔ داخل فالکون در کووت اسپکتروفتومتر ریخته و سپس مقدار جذب به‌طور جداگانه در طول موج‌های ٦٦٣ نانومتر برای کلروفیل a ، ٦٤٥ نانومتر برای کلروفیل b و ٤٧٠ برای کاروتنوئیدها توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد (Arnon, 1967). سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، با افزودن بافر سدیم فسفات ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته ٦/٨، گایاکول با غلظت نهایی ۲۸ میلی‌مولار و پراکسید هیدروژن با غلظت نهایی ۵ میلی‌مولار به عصاره آنزیمی در طول موج ٤٧٠ نانومتر انجام شد. فعالیت بخش محلول آنزیمی به‌صورت مول بر دقیقه در میلی‌لیتر بیان شد (Fridovich, 1989). تجزیه مرکب داده‌ها، پس از اطمینان از نرمال بودن آنها، با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) انجام گرفت، همچنین برای مقایسه میانگین داده‌ها از روش چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

عملکرد علوفه

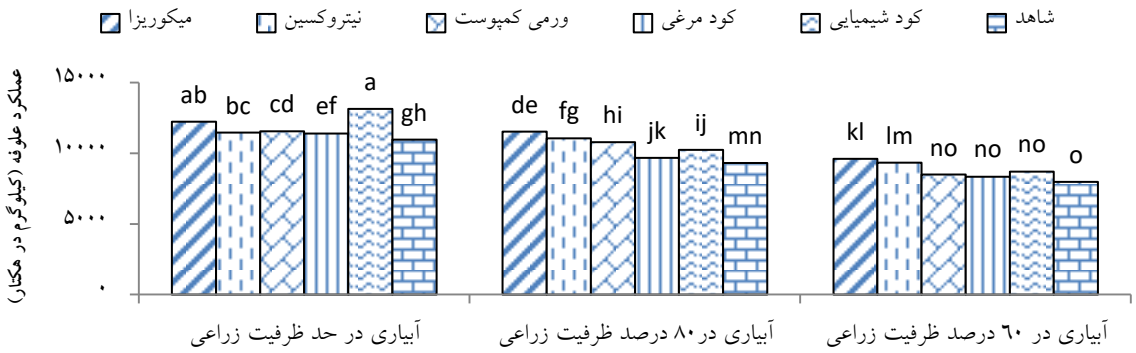
نتایج تجزیه مرکب نشان داد که عملکرد علوفه تحت تأثیر متقابل تیمارهای آزمایشی (سطوح آبیاری × منابع مختلف کودی) قرار گرفت (جدول ۳).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که در شرایط آبیاری کامل بیش‌ترین عملکرد علوفه در تیمارهای کود شیمیایی و کاربرد کود میکوریزا به‌دست آمد. اما در شرایط کم‌آبیاری (آبیاری در ۸۰ و ٦٠ درصد ظرفیت زراعی) بالاترین میزان عملکرد علوفه در تیمارهای کودی میکوریزا و نیتروکسین به‌دست آمد (شکل ۱). شرایط آبیاری در ۸۰ و ٦٠ درصد ظرفیت زراعی در گیاهان تحت تیمار کود میکوریزا به‌ترتیب منجر به افزایش ۱۱/۰۷ و ۹/۳۰ درصدی عملکرد علوفه در مقایسه با تیمار کاربرد کود شیمیایی گردید که با توجه به مشکلات زیست‌محیطی ناشی از استفاده از کودهای شیمیایی می‌توان کود زیستی میکوریزا را که دارای سودمندی اکولوژیکی و زیست‌محیطی می‌باشد در زراعت یونجه به‌کار برد. مصرف کودهای زیستی می‌تواند کمبود عناصر غذایی را جبران و از طریق تولید تنظیم‌کننده‌های رشد در محیط ریشه، باعث بهبود رشد گیاه شود، زیرا این میکروارگانیسم‌ها موجب تحریک توسعه ریشه و در نتیجه جذب بهتر آب و مواد غذایی از خاک می‌شوند (Soliman *et al*., 2012). در مطالعه‌ای در گیاه یونجه نتایج نشان داد که تیمارهای دارای ریزوبیوم و باکتری بیش‌ترین میزان ماده خشک و عملکرد را دارا بودند (Guo & Huang, 2010).

جدول ۳. تجزیه واریانس مرکب صفات فیزیولوژیکی یونجه تحت تأثیر سطوح آبیاری و منابع مختلف کودی

منابع تغییرات	درجه آزادی	عملکرد علوفه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	پرولین	کاروتنوئید	کربوهیدرات‌های محلول	فعالیت آنزیم پراکسیداز
سال	۱	۵۴۸۳۲۱۶۲۷/۸**	۰/۷۱^{ns}	۱۴۰/۲**	۱۲۰/۹۹**	۵/۰۵**	۸۳/۴۶**	۱۱۵/۲۲**	۰/۰۸**
سال/ تکرار	۴	۵۹۰۳۰۷/۳	۲۷/۵	۱۰/۴۲	۲۰/۵۹	۰/۰۶	۷/۷۲	۲/۶۲	۰/۰۱
آبیاری	۲	۸۴۰۳۳۸۸۴**	۴۸۰۸/۴۹**	۱۵۹۳/۳۸**	۱۱۸۲۳/۴۴**	۴۵/۴۸**	۹۴۷/۶۴**	۲۲۲/۵۸**	۸/۷۶**
سال×آبیاری	۲	۱۵۷۹۱۵۰۸/۵**	۴۴/۲۲^{ns}	۲۴/۶۴**	۴۹/۱۸^{ns}	۰/۳۷**	۲۰/۳۷*	۷۹/۴۵**	۱/۶۹**
کود	۵	۷۰۴۲۱۱۹/۱**	۳۸/۶۴^{ns}	۱۲/۶۹*	۸۰/۸۱*	۰/۱۴^{ns}	۵/۸۶^{ns}	۰/۶^{ns}	۰/۰۶^{ns}
سال×کود	۵	۲۴۲۸۵۳۶/۱**	۹/۲۲^{ns}	۰/۵۱^{ns}	۱۰/۷۲^{ns}	۰/۰۴^{ns}	۰/۷۶^{ns}	۱/۲۱^{ns}	۰/۰۵^{ns}
آبیاری×کود	۱۰	۱۵۸۳۸۶۴/۵**	۱۰/۶۵^{ns}	۰/۶^{ns}	۱۰/۹۶^{ns}	۰/۰۳^{ns}	۲/۱^{ns}	۰/۳۷^{ns}	۰/۰۷^{ns}
سال×آبیاری×کود	۱۰	۱۰۸۹۴۳۰/۸**	۳/۷۹^{ns}	۰/۵۹^{ns}	۲/۸۸^{ns}	۰/۰۳^{ns}	۰/۷^{ns}	۰/۷۳^{ns}	۰/۰۵^{ns}
اشتباه آزمایشی	۶۸	۲۱۳۲۴۰	۲۳/۲۹	۴/۶۴	۲۸/۲۹	۰/۱۲	۵/۸	۳/۳۲	۰/۰۷
ضریب تغییرات (٪)		۴/۵	۲/۷	۱۲/۸	۲/۷	۱۹/۹	۵/۷	۱۱/۳	۱۵/۴

ns، * و **: به‌ترتیب نشانگر عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال پنج و یک درصد است.



شکل ۱. اثر متقابل آبیاری × منابع مختلف کودی بر عملکرد علوفه.

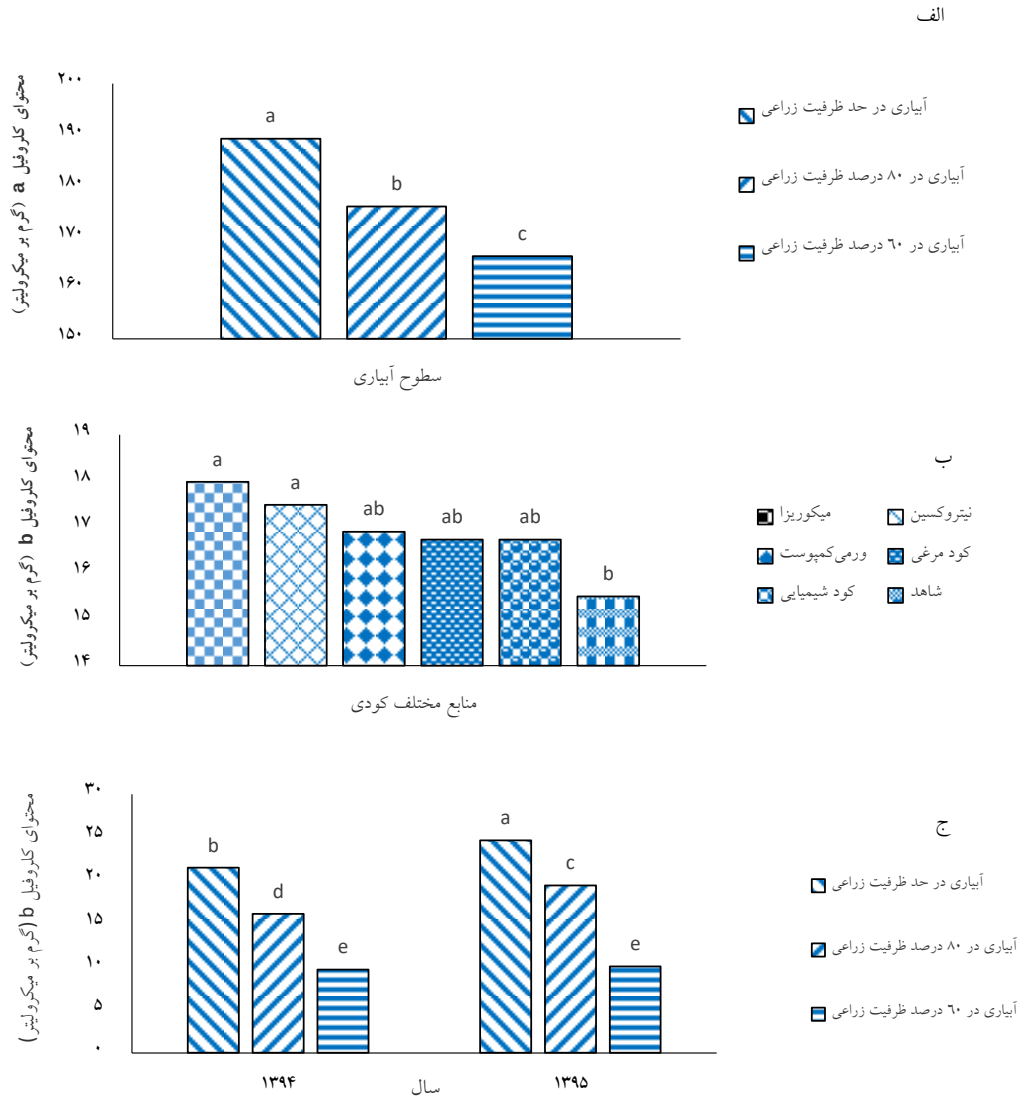
حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد است.

نتایج نشان داد که با کاهش آبیاری، عملکرد علوفه یونجه در تمام سطوح منابع کودی روندی کاهشی داشت (شکل ۱). با کاهش میزان آب آبیاری، تمام فرآیندهای داخلی گیاه مانند فتوسنتز، سنتز پروتئین و سوخت‌وساز چربی تحت تأثیر قرار گرفته و با تشدید تنش، توسعه سطح برگ کاهش و سرانجام رشد گیاه متوقف می‌شود (Zafari *et al.*, 2017). گزارش شده که با کمبود رطوبت قابل دسترس در گیاه یونجه، توانایی گیاه در جذب عناصر غذایی، سنتز و انتقال مواد پرورده کاهش یافته که در نتیجه سبب کاهش میزان رشد و نقصان میزان عملکرد علوفه می‌شود (Zafari *et al.*, 2017).

محتوای رنگیزه‌های گیاهی

نتایج تجزیه مرکب نشان داد که محتوای کلروفیل a در یونجه تحت تأثیر تیمار کم آبیاری قرار گرفت (جدول ۳). به‌طوری‌که، کاهش سطح آبیاری منجر به کاهش کلروفیل a گردید. در واقع، میزان کلروفیل a در شرایط آبیاری ۸۰ و ۶۰ درصد ظرفیت زراعی، نسبت به حد ظرفیت زراعی (شاهد)

به‌ترتیب ۷ و ۱۲/۲ درصد کاهش نشان داد (شکل۲- الف). تنش کم‌آبیاری از طریق افزایش غلظت آبسزیک اسید در برگ‌ها، ساقه‌ها و ریشه‌ها موجب کاهش سرعت فتوسنتز، مقدار کلروفیل و پروتئین محلول برگ‌ها می‌شود (Lauer & Boyer, 1992; Oliviera-Neto *at el*., 2009). مطالعات نشان می‌دهد که تنش کم‌آبی از طریق برهم زدن واکنش‌های بیوشیمیایی مسیر فتوسنتزی، موجب کاهش سرعت فتوسنتز می‌شود (Lauer & Boyer, 1992; Norman *et al*., 1990). لذا کمبود آب سبب آسیب به رنگدانه‌ها و پلاستیدها می‌گردد و در نتیجه باعث کاهش محتوای کلروفیل برگ می‌گردد (Ashraf *et al*., 2001). نتایج تحقیقی نشان داد که محتوای کلروفیل a و b در یونجه با افزایش سطوح تنش خشکی کاهش یافت (Zafari *et al*., 2017).



شکل ۲. اثر سطوح آبیاری (الف)، منابع مختلف کود، (ب) و سطوح آبیاری، (ج) بر محتوای کلروفیل a و b.
حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

نتایج تجزیه مرکب نشان داد که اثر متقابل سال× تیمارهای آبیاری در سطح احتمال یک درصد و اثر منابع مختلف کودی در سطح احتمال پنج درصد بر محتوای کلروفیل b معنی‌دار گردید (جدول ۳). با توجه به نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، بیش‌ترین محتوای کلروفیل b در شرایط آبیاری در حد ظرفیت زراعی (شاهد) مشاهد شد. به‌طوری‌که محتوای کلروفیل b در شرایط آبیاری ٦٠ درصد ظرفیت زراعی نسبت به تیمار شاهد (آبیاری در حد ظرفیت زراعی) در هر دو سال آزمایش کاهش نشان داد (شکل ۲- ج). نتایج اثر کم‌آبیاری بر محتوای کلروفیل در این آزمایش با گزارش Zafari et al. (2017) در یونجه مطابقت دارد (Zafari *et al*., 2017). تنش کم‌آبی از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز و پراکسیداز در گیاه باعث تخریب کلروپلاست و کاهش میزان کلروفیل می‌شود. به‌نظر می‌رسد کاهش محتوای کلروفیل در هنگام مواجه با تنش خشکی، در اثر تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن و متعاقب آن پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب کلروفیل است (Xiao *et al*., 2008).

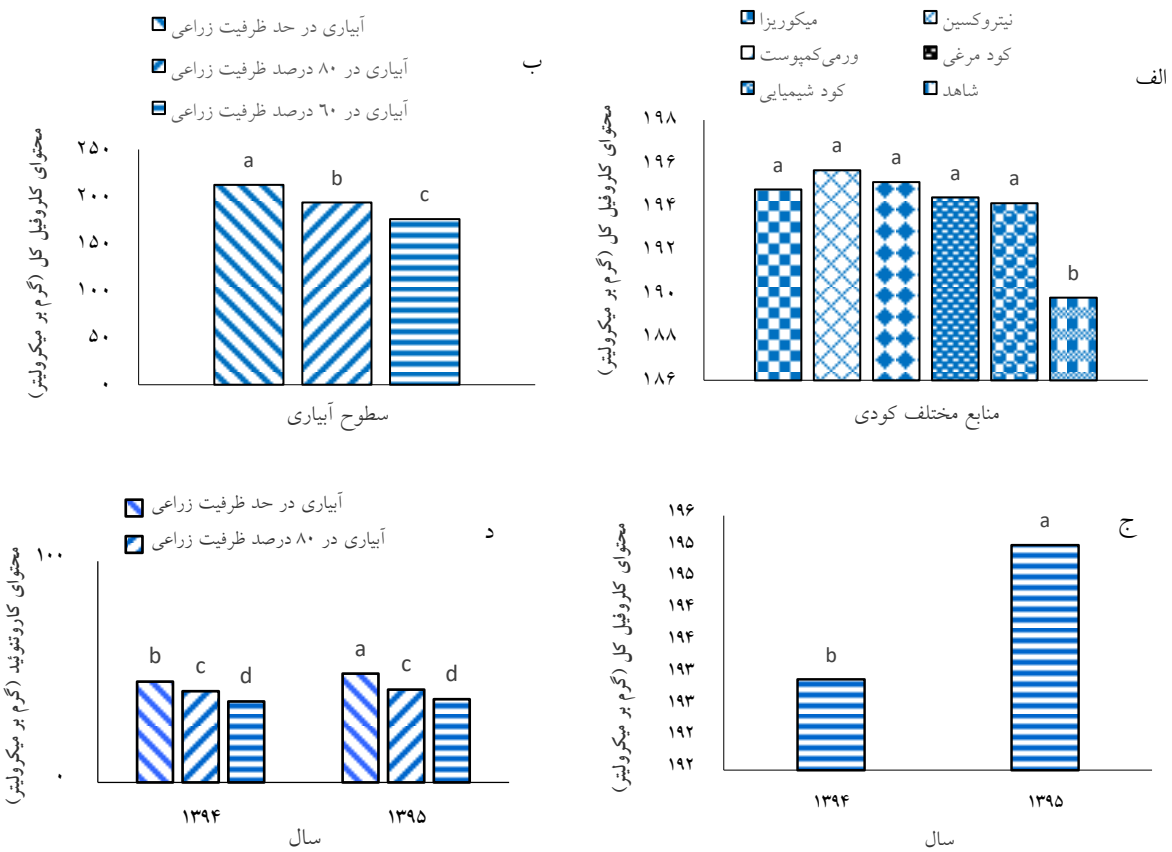
نتایج مقایسه میانگین منابع مختلف کودی نشان داد که بیش‌ترین محتوای کلروفیل b در کاربرد تیمار کودی میکوریزا حاصل شد و با کود مصرفی نیتروکسین در یک سطح آماری قرار گرفتند. به‌طوری که محتوای کلروفیل b در کاربرد میکوریزا و نیتروکسین نسبت به شاهد (عدم مصرف کود) به‌ترتیب ١٦ و ١٢/٨ درصد افزایش نشان داد (شکل ۲- ب). پژوهش‌گران در بررسی بر روی گیاه یونجه گزارش کردند که تلقیح یونجه با کودهای زیستی، سنتز کلروفیل در گیاه را بهبود بخشید و فتوسنتز گیاه را افزایش داد (Zafari *et al*., 2017). آنها علت این امر را به افزایش جذب نیتروژن توسط گیاهان میکوریزایی نسبت داده‌اند. بنابراین به‌واسطه ارتباط مستقیم بین غلظت نیتروژن و کلروفیل برگ، افزایش در میزان نیتروژن گیاه، محتوای کلروفیل b را هم افزایش می‌دهد. گزارش شده که کودهای زیستی از طریق کمک به جذب نیتروژن، فسفر و گوگرد که نقش مهمی در تولید کلروفیل و آنزیم‌های مورد نیاز گیاه دارند، باعث افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان می‌شوند (Patidar & Mali, 2004).

نتایج تجزیه مرکب نشان داد که اثر جداگانه منابع مختلف کودی در سطح احتمال پنج درصد و اثر جداگانه سال و تیمارهای آبیاری در سطح احتمال یک درصد بر محتوای کلروفیل کل معنی‌دار شد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تیمارهای کودی به‌جز تیمار شاهد، اثر یکسانی بر محتوای کلروفیل کل داشتند (شکل ۲- الف). با توجه به این‌که در ساختار رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنوئید) برخی از عناصر غذایی مشارکت دارند (Lee, 2018). بنابراین به‌کارگیری منابع مختلف کودی از طریق فراهم نمودن شرایط رشد بهتر برای گیاه باعث افزایش محتوای کلروفیل کل برگ نسبت به تیمار شاهد شده‌اند (شکل ۲- الف). در واقع، کودهای زیستی و آلی، نیتروژن مورد نیاز رنگیزه‌های فتوسنتزی و پروتئین‌های گیاهی را تأمین نمودند و باعث افزایش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه شدند. گزارش شده که قارچ‌های میکوریزی با افزایش محتوی قند و فسفر، سبب تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند سیتوکینین و جیبرلین در گیاهان می‌شوند که منجر به افزایش کلروفیل می‌شوند (Demir, 2004).

نتایج نشان داد که تیمار کم آبیاری منجر به کاهش کلروفیل کل گردید. به‌طوری‌که میزان کلروفیل کل در شرایط ٨٠ و ٦٠ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد (آبیاری در حد ظرفیت زراعی) به‌ترتیب ١٠/٩ و ١٩/٤ درصد کاهش داشت (شکل ۳- ب). همچنین نتایج آزمایش نشان داد که گیاه یونجه در سال دوم آزمایش از

محتوای کلروفیل کل بیش‌تری در مقایسه با سال اول برخوردار بود (شکل ۳- ج). به‌نظر می‌رسد که دلیل کاهش میزان کلروفیل کل در شرایط کم‌آبیاری افزایش تخریب این رنگیزه‌ها و یا کاهش ساخت آن‌ها و نیز اختلال در فعالیت آنزیم‌های مسئول سنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی باشد که سبب کاهش آسیمیلات‌سازی‌شده و در نتیجه کاهش عملکرد را به‌دنبال خواهد داشت (Ahmadi *et al.*, 2004). هم‌چنین با افزایش مقدار برخی از تنظیم‌کننده‌های رشد نظیر اتیلن و آبسیزیک اسید در اثر تنش خشکی فعالیت کلروفیلاز تحریک می‌شود (Draikewicz, 1994). از دست رفتن کلروفیل در شرایط تنش خشکی می‌تواند جنبه سازگاری داشته باشد چون با کاهش کلروفیل الکترون برانگیخته‌شده طی فتوسنتز کاهش یافته و به‌دنبال آن خسارت‌های ناشی از تشکیل رادیکال‌های آزاد اکسیژن کاهش می‌یابد (Kranner *et al.*, 2002).

نتایج تجزیه مرکب داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سال × تیمارهای آبیاری در سطح احتمال پنج درصد بر محتوای کاروتنوئید معنی‌دار بود (جدول ۳). به‌طوری‌که، بیش‌ترین محتوای کاروتنوئید در شرایط آبیاری حد ظرفیت زراعی (شاهد) مشاهده گردید. محتوای کاروتنوئید در شرایط آبیاری ۶۰ درصد ظرفیت زراعی نسبت به شاهد (آبیاری در حد ظرفیت زراعی) در سال اول و دوم به‌ترتیب ۱۹/۷ و ۲۳/٤ درصد کاهش داشت (شکل ۳- د).



شکل ۳. اثر منابع مختلف کود (الف)، سطوح آبیاری (ب) و سال (ج) بر محتوای کلروفیل کل و اثر متقابل (سال × سطوح آبیاری) بر محتوای کاروتنوئید (د). حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

کاروتنوئیدها شامل بتاکاروتن و گزانتوفیل‌ها، آنتی‌اکسیدان‌های چربی‌دوست با وزن مولکولی کم در کلروپلاست هستند که غشاهای کلروپلاستی را در مقابل تنش اکسیداتیو محافظت می‌کنند. کاروتنوئیدها علاوه بر نقش ساختمانی و جذب نور می‌توانند به‌صورت مستقیم اکسیژن یکتایی را غیرفعال کنند و یا از طریق فرونشاندن کلروفیل برانگیخته‌شده، به‌صورت غیرمستقیم از تشکیل اکسیژن یکتایی جلوگیری کنند (Malekahmadi *et al.*, 2004). پژوهش‌گران تغییرات متابولیکی را عامل کاهش سطوح رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه ذرت خوشه‌ای در شرایط تنش خشکی بیان نمودند (Oliviera-Neto *et al.*, 2009). این پژوهش‌گران گزارش کردند که کاهش کارآیی استفاده از کربن و افزایش تولید اتانول و لاکتات سبب کاهش سنتز کاروتنوئیدها و کلروفیل‌ها می‌شود. همچنین اعمال تنش خشکی در مرحله زایشی گیاه، تسریع پیری برگ و تجزیه رنگدانه‌های فتوسنتزی را در پی داشت (Oliviera-Neto *et al.*, 2009). کاهش محتوای کاروتنوئید در اثر تنش خشکی در مورد یونجه نیز گزارش شده است (Zafari *et al.*, 2017).

محتوای اسمولیت‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه مرکب داده‌ها نشان داد که محتوای پرولین و کربوهیدرات‌های محلول تحت تأثیر اثر متقابل سال × تیمارهای آبیاری در سطح احتمال یک درصد قرار گرفتند (جدول ۳). طبق نتایج مقایسه میانگین داده‌ها، کم آبیاری در هر دو سال آزمایش منجر به افزایش محتوای پرولین گردید. بیش‌ترین محتوای پرولین (۲/۸۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در هر دو سال در شرایط آبیاری در ٦٠ درصد ظرفیت زراعی مشاهد شد اما، کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد (آبیاری در حد ظرفیت زراعی) حاصل شد (شکل ٤- الف).

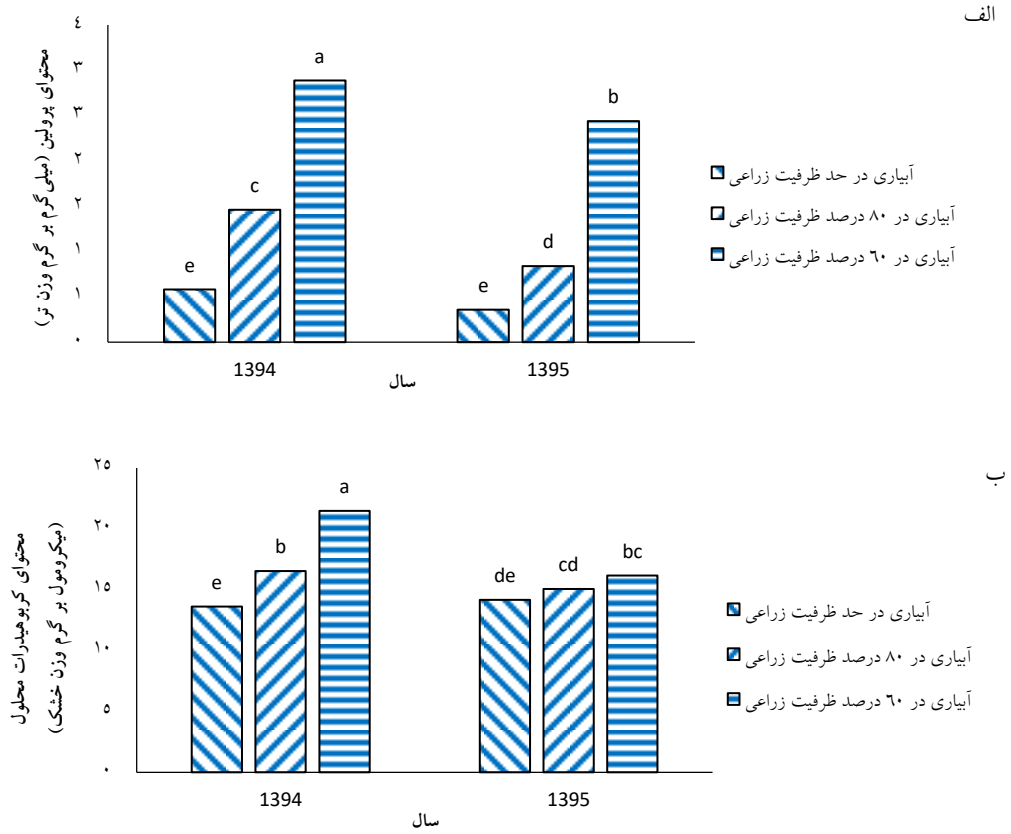
نتایج نشان داد، کم آبیاری منجر به افزایش معنی‌دار محتوای کربوهیدرات‌های محلول گردید. بیش‌ترین میزان کربوهیدرات‌های محلول (۲۱/٤٦میکرومول بر گرم وزن خشک) در هر دو سال در شرایط آبیاری در ٦٠ درصد ظرفیت زراعی مشاهد شد اما، کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد (آبیاری در حد ظرفیت زراعی) حاصل شد (شکل ٤- ب). نتایج نشان داد که مقدار پرولین و کربوهیدرات‌های محلول در شرایط کم‌آبیاری در گیاه یونجه افزایش یافت (شکل ٤). روند افزایش در مقدار قندهای محلول همسو با افزایش پرولین است که این نتیجه نیز مطابق با گزارشی مبنی بر همبستگی مثبت این دو در شرایط تنش می‌باشد (Loka & Oosterhuis, 2014).

به‌عبارتی پرولین به‌عنوان یک ماده محلول سبب تنظیم فشار اسمزی، کاهش هدررفت آب از سلول، حفظ آماس سلولی، جلوگیری از تجزیه پروتئین‌های مختلف، افزایش پایداری برخی آنزیم‌های سیتوپلاسمی و میتوکندریایی، پایداری شکل طبیعی پروتئین‌ها و درنتیجه حفاظت سامانه‌های غشایی می‌شود (Barker *et al.*, 1993). افزایش قندهای محلول در پاسخ به وقوع تنش کمبود آب می‌تواند با افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز و هیدرولیز نشاسته به قندهای ساده و کند شدن انتقال قندها از برگ به سایر مراکز رشد گیاه مرتبط باشد (Zhang *et al.*, 2010) و هم‌چنین ممکن است ناشی از کاهش نیاز به مواد فتوسنتزی به‌دلیل کاهش رشد، سنتز این ترکیبات از مسیرهای غیرفتوسنتزی و تخریب کربوهیدرات‌های نامحلول باشد (Ehdaie *et al.*, 2006). کربوهیدرات‌ها به‌عنوان مولکول‌های سیگنال عمل می‌کنند و در سازوکارهای سازگاری گیاه نقش دارند و باعث تغییر بیان بسیاری از ژن‌های متابولیکی می‌گردند (Hanson & Smeekens, 2009). در شرایط تنش افزایش اسمولیت‌ها باعث حفظ تورژسانس سلول‌های برگ، حفاظت غشای

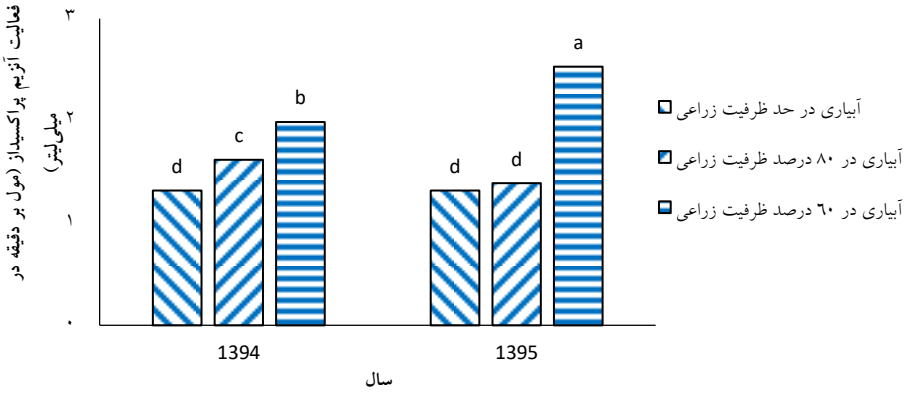
سلولی و بازداری از تخریب پروتئین‌ها می‌شوند (Xue *et al.*, 2008).

فعالیت آنزیم پراکسیداز

نتایج تجزیه واریانس بیانگر تأثیر معنی‌دار اثر متقابل سال × تیمارهای آبیاری در سطح احتمال یک درصد بر فعالیت آنزیم پراکسیداز است (جدول ۳). بیش‌ترین (۲/۵۳ مول بر دقیقه در میلی‌لیتر) میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هر دو سال آزمایش در آبیاری ٦٠ درصد ظرفیت زراعی مشاهد گردید. درحالی‌که کم‌ترین (۱/۳۲ مول بر دقیقه در میلی‌لیتر) میزان آن در تیمار آبیاری در حد ظرفیت زراعی حاصل شد. در واقع، آبیاری در ٦٠ درصد ظرفیت زراعی نسبت به تیمار شاهد (آبیاری در حد ظرفیت زراعی) سبب افزایش ۳۳/٦٦ و ٤۲/۹ درصدی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌ترتیب در سال اول و دوم شد (شکل ۵). هم‌چنین در سال دوم آزمایش بین تیمارهای آبیاری در حد ظرفیت زراعی (شاهد) و آبیاری در۸۰ درصد ظرفیت زراعی اختلاف معنی‌دار در فعالیت آنزیم پراکسیداز وجود نداشت (شکل ۵). برخی از پژوهش‌گران افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت‌ها را عامل اصلی مقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی دانسته‌اند (Herbinger *et al.*, 2002).



شکل ٤. اثر متقابل (سال × سطوح آبیاری) بر محتوای پرولین (الف) و کربوهیدرات‌های محلول (ب). حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۵. اثر متقابل (سال × سطوح آبیاری) بر فعالیت آنزیم پراکسیداز.
حروف غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

گزارش شده که فعالیت زیاد آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت هم‌بستگی زیادی با تحمل به خشکی یا شوری تعدادی از گیاهان زراعی دارد (Guo *et al*., 2006; Xiao *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد که با کاهش آبیاری رنگیزه‌های فتوستزی دچار نقصان شدند اما میزان اسمولیت‌ها (پرولین، کربوهیدرات‌های محلول) و فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی پراکسیداز افزایش یافتند که در نتیجه منجر به نقصان عملکرد علوفه در تمامی سطوح منابع کودی مصرفی گردید. با توجه به این‌که میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی در تمامی تیمارهای کودی در مقایسه با تیمار شاهد مقادیر یکسانی را دارا بودند و هم‌چنین به لحاظ این‌که در تمامی سطوح آبیاری بیش‌ترین میزان عملکرد علوفه از تیمار کود زیستی میکوریزا به‌دست آمد، لذا با توجه به یافته‌های این تحقیق، استفاده از کود زیستی میکوریزا در جهت افزایش عملکرد علوفه یونجه هم در شرایط مناسب آبیاری و هم تحت شرایط کم‌آبیاری می‌تواند در راستای کشاورزی پایدار باشد.

منابع

1. Abedi, T. & Pakniyat, H. (2010). Antioxidant enzyme changes in response to drought stress in ten cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, *46*(1), 27-34.
2. Adak, T., Singha, A., Kumar, K., Shukla, S. K., Singh, A. & Kumar Singh, V. (2014). Soil organic carbon, dehydrogenase activity, nutrient availability and leaf nutrient content as affected by organic and inorganic source of nutrient in mango orchard soil. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, *14(2)*, 394-406.
3. Ahmadi, A., Semardeh, S. L. & Zali, A. A. (2004). A comparison between the capacity of photoassimilate storage and remobilization, and their contribution to yield in four wheat cultivars under different moisture regimes. *Iranian journal of Agriculture Science*, *35*(4), 921-931. (In Persian).
4. Arnon, A. N. (1967). Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, *23*, 112-121.
5. Ashraf, M., Shabaz, M., Mahmood, S & Rasul, E. (2001). Relationship between growth and photosynthetic characteristics in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) under limited water deficit conditions with enhanced nitrogen supplies. *Belgian Journal of Botany*, *134*, 131-144.
6. Auge, R. M., Toler, H. D. & Saxton, A. M. (2015). Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza*, *25*(1), 13-24.

7. Barker, D. J. Sullivan, C. Y. & Moser, L. E. (1993). Water deficit effects on osmotic potential, cell wall elasticity, and praline in five forage grasses. *Agronomy Journal*, *85*(2), 270-275.
8. Baum, C., El-Tohamy, W. & Gruda, N. (2015). Increasing the productivity and product quality of vegetable crops using arbuscular mycorrhizal fungi:a review. *Scientia Horticulturae*, *187*, 131-141.
9. Cremeneac, L. & Boclaci, T. (2011). The study of the vermicompost influence on the harvest and on the quality of forage culture. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, *44*(2), 192-195.
10. Demir, S. (2004). Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of peppers. *Turkish Journal of Biology*, *28*(2-4), 85-95.
11. Draikewicz, M. (1994). Chlorophyllase occurrence functions, mechanism of action, effect of extrnal and internal factors. *Photosynthetica*, *30*, 321-337.
12. Ehdaie, B., Alloush, G. A., Madore, M. A. & Waines, J. G. (2006). Genotypic variation for stem reserves and mobilization in wheat: I. postanthesis changes in internode dry matter. *Crop Science*, *46*(5), 735- 746.
13. Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas. *Biological Chemistry*, *264*(14), 7761-7764.
14. Guo, Y. A. N. J. U. N., Ni, Y. & Huang, J. (2010). Effects of rhizobium, arbuscular mycorrhiza and lime on nodulation, growth and nutrient uptake of lucerne in acid purplish soil in China. *Tropical Grasslands*, *44*, 109-114.
15. Guo, Z., Ou, W. Z., Lu, S. Y. & Zhong, Q. (2006). Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, *44*(11-12), 828–836.
16. Habibzadeh, Y., Jalilian, J., Zardashti, M. R., Pirzad, A. & Eini, O. (2015). Some morpho-physiological characteristics of Mung Bean mycorrhizal plant under different irrigation regimes in field condition. *Journal of Plant Nutrition*, *38*(11), 1754-1767.
17. Hanson, J. & Smeekens, S. (2009). Sugar perception and signaling- an update. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(5), 562–567.
18. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Gill, S. S. & Fujita, M. (2013). Drought stress responses in plants, oxidative stress, and antioxidant defense. *Climate Change and Plant Abiotic Stress Tolerance*, *18*, 209-249.
19. Herbinger, K., Tausz, M., Wonisch, A., Soja, G., Sorger, A. & Grill, D. (2002). Complex interactive effects of drought and ozone stress on the antioxidant defense systems of two wheat cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, *40*(6-8), 691-696.
20. Irigoyen, J. J., Einerich, D. W. & Sanchez-Diaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars In nodulated alfalfa (Medicago Sativa) plants. *Physiologia Plantarum*, *84*(1), 55-60.
21. Kranner, I., Beckett, R. P., Wornik, S., Zorn, M. & Pfeifhofer, H. W. (2002). Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *The Plant Journal*, *31*(1), 13-24.
22. Lauer, M. J. & Boyer, J. S. (1992). Internal CO_2 measured directly in leaves abscises acid and low leaf water potential cause opposing effects. *Plant Physiology*, *98*(4), 1310-1316.
23. Lee, R. E. (2018). *Phycology*. Cambridge University Press.
24. Loka, D. A. & Oosterhuis, D. M. (2014). Water-deficit stress effects on pistil biochemistry and leaf physiology in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *South African Journal of Botany*, *93*, 131-136.
25. Lokhande, V. H., Nikam, T. D. & Penna, S. (2010). Biochemical, physiological and growth changes in response to salinity in callus cultures of *Sesuvium portulacastrum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. *102*(1), 17-25.
26. Malekahmadi, F., Kalantary, KH. & Torkzadeh, M. (2004). The effect of flooding stress on indication of Oxidatives stress and concentration of mineral element in Pepper (*Capsicum annum*) plants. *Iranian journal of Biology (Biological Science Promotion)*, *18*(2), 110-119. (In Persian)
27. Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. & Mittler, R. O. N. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant of Cell and Environment*, *33*(4), 453–467.
28. Mirzakhani, M., Ardakani, M. R., Rejali, F., Shirani, Rad, A. H. & Aeene Band, A. (2010). Evaluation of seed twofold inoculation by fungi *Glomus intraradices* mycorrhiza and *Azotobacter chorococum* with various nitrogen and phosphorus levels use on oil yield and some of traits in safflower. *Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding*. *6*(1), 75-87.
29. Nagananda, G. S., Das, A., Bhattacharya, S. & Kalpana, T. (2010). In vitro studies on the effects of biofertilizer (*Azetobacter* and *Rizobium*) on

seed germination and development of *Trigonella foemum graecum* using a novel glass marble containing liguid medium. *International Journal of Botany*, *6*(4), 394-403.
30. Norman, S. M., Maier, V. P. & Pon, D. L. (1990). Abscisic acid accumulation, carotenoid, and chlorophyll content in relation to water stress and leaf age of different types of citrus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *38*(6), 1326-1334.
31. Oliviera-Neto, C. F D., Silva-Lobato, A. K., Goncalves-Vidigal., M. C., Costa, R. C. L D., Santos Filho, B. G. D., Alves, G. A. R., Silva-Maia, W. J. D. M., Cruz, F. J. R., Neves, H. K. B. & Santos Lopes, M. J. (2009). Carbon compounds and chlorophyll contents in sorghum submitted to water deficit during three growth stages. *Science and Technology*, *7*(3&4), 588-593.
32. Padmavathiamma, P. K., Li, L. Y. & Kumari, U. R. (2008). An experimental study of vermin-biowaste composting for agricultural soil improvement. *Bioresource Technology*, *99*(6), 1672-1681.
33. Paquin, R. & Lechasseur, P. (1979). Observations sur une methode dosage de la proline libre dans les extraits de plantes. *Canadian Journal of Botany*, *57*(18), 1851-1854.
34. Patidar, M. & Mali, A. L. (2004). Effect of farmyard manure, fertility levels and bio-fertilizers on growth, yield and quality of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Indian Journal of Agronomy*, *49*(2), 117-120.
35. Radović, J., Sokolović, D. & Marković, J. (2009). Alfalfa-most important perennial forage legume in animal husbandry. *Biotechnology in Animal Husbandry*, *25*(5-6-1), 465-475.
36. Rapparini, F. & Penuelas. J. (2014). Mycorrhizal fungi to alleviate drought stress on plant growth. Miransari M (Eds.), In use of microbes for the alleviation of soil stress, *1*, 21-42.
37. Soliman, A. S., Shanan, N. T., Massoud, O. N. & Swelim, D. M. (2012). Improving salinity tolerance of *Acacia saligna* (Labill.) plant by arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium inoculation*. *African Journal of Biotechnology*, *11*(5),1259-1266.
38. Slama, I., Ghnaya, T., Hessini, K., Messedi, D., Savouré, A. & Abdelly, C. (2007). Comparative study of the effects of mannitol and PEG osmotic stress on growth and solute accumulation in *Sesuvium portulacastrum. Environmental and Experimental Botany, 61*(1), 10-17.
39. Xiao, X., Xu, X. & Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus cothayana* populations. *Silva Fennica*, *42*(5), 705-719.
40. Xue, G. P., McIntyre, C. *L*., Glassop, D. & Shorter, R. (2008). Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. *Plant Molecular Biology*, *67*(3), 197–214.
41. Yang, L., Zhao, F., Chang, Q., Li, T. & Li, F. (2015). Effects of vermicomposts on tomato yield and quality and soil fertility in greenhouse under different soil water regimes. *Agricultural Water Management*, *160*, 98–105.
42. Zafari, M., Ebadi, A. & Jahanbakhsh, Godehkahriz, S. (2017). Effect of seed inoculation on alfalfa tolerance to water deficit stress. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *45*(1), 82-88.
43. Zhang, K. M., Yu, H. J., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. & Xia, X. J. (2010). Photoprotective roles of anthocyanins in *Begonia semperflorens*. *Plant Science*, *179*(3), 202-208.
44. Zhang, F., Guo, J. K., Yang, Y. L., He, W. L. & Zhang, L. X. (2004). Changes in the pattern of antioxidant enzymes in wheat exposed to water deficit and rewatering. Acta Physiologiae Plantarum, 26(3), 345-352.

Crops Improvement
(Journal of Agricultural Crops Production)

Vol. 20 ■ No. 4 ■ Winter 2019

Investigating the Impact of Different Fertilizer Sources on Forage, Yield, Osmolites, Photosynthetic Pigments, and Some Antioxidant Enzymes of Alfalfa (*Medicago sativa* L.) under Low Irrigation Condition

Kambiz Kharazmi[1], Reza Amirnia[2*], Jalal Jalilian[2], Mehdi Tajbakhsh[3]

1. Ph.D. Student, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
2. Associate Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

Received: July 24, 2018 Accepted: November 21, 2018

Abstract

Regarding the high demand for irrigation of alfalfa, it is of high account to investigate the role of organic biofertilizer and chemical fertilizers for reducing water deficit stress. Thus, this experiment has been conducted as a factorial, based on a randomized complete block design with three replications in Agricultural and Natural Resources Research of Khoy for two years (i.e., 2015-2016). Experimental treatments involve irrigation (viz. irrigation at field capacity (control) as well as irrigation at both 80% and 60% of field capacity) and fertilizer resources at six levels (namely, Mycorrhiza, Nitroxin, Vermicompost, Chicken manure, NPK chemical fertilizer, and treatment without fertilizer consumption (control)). Results from combined analyses show that irrigation treatment has had a significant effect on forage yield, chlorophyll a, b, and total chlorophyll, proline, carotenoids, soluble carbohydrates, and peroxidase enzyme activity. Regarding the importance of forage production in alfalfa, results show that under full irrigation condition mycorrhizal has had similar forage yield as application of chemical fertilizer; however, in both low irrigation conditions, it has increased the forage yield by 10.18%, compared to chemical fertilizer application. Other fertilizer treatments show different trends in irrigation levels in terms of their impact on forage yield, thus under irrigation at 60% field capacity, vermicompost, chicken manure, chemical, and control treatments have been in the same statistical group. Therefore, considering the disadvantages of using chemical fertilizers, mycorrhiza that has ecological and environmental benefits, can be used in alfalfa cultivation.

Keywords: Chlorophyll, low irrigation, mycorrhiza, nitroxin, peroxidas.

Corresponding author: r.amirnia@urmia.ac.ir