روابط خاک و گیاه / سال دوازدهم / شماره دوم / تابستان ۱۴۰۰ / صفحات ۳۲-۱۹

مقاله پژوهشی

اثر کود زیستی نیتروکسین بر ویژگی‌های فیزیولوژیک چهار اکوتیپ سیاه‌دانه (*Nigella sativa* L.) در شرایط تنش خشکی

زهرا صیدی[1]، نصرت اله عباسی*، محمدجواد زارع و بتول زارعی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۱۶)

چکیده

برای بررسی اثر کود زیستی نیتوکسین تحت سطوح مختلف تنش کم‌آبی بر گیاه سیاه دانه، آزمایشی به‌صورت کرت‌های دو بار خرد شده بر پایه بلوک کامل تصادفی و در سه تکرار در مزرعه پژوهشی دانشگاه ایلام در سال زراعی ۱۳۹۸ انجام شد. کرت اصلی به تیمار تنش کم-آبی شامل عدم تنش، تنش متوسط و شدید بر اساس ۱۰۰، ۵۰ و ۳۵ درصد نیاز آبی گیاه، کرت فرعی به کاربرد و عدم کاربرد نیتروکسین و کرت فرعی-فرعی به چهار اکوتیپ سیاه‌دانه شامل اصفهان، سمیرم، مشهد و نیشابور اختصاص یافت. براساس آزمون مقایسه میانگین داده‌ها، بیش‌ترین میزان رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کل به‌ترتیب با مقادیر ۰/۷۱۱، ۰/۵۲۳ و ۱/۲۳۵ میلی‌گرم در گرم برگ تازه از تیمار عدم اعمال تنش کم‌آبی و بیش‌ترین مقادیر آنتوسیانین (۱۴/۶۹ میکرومول در گرم برگ تازه)، کاتالاز (۰/۰۱۵۲ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) و پرولین (۵/۸۴ میکرومول در گرم برگ تازه) از اعمال تیمار تنش شدید کم‌آبی حاصل شد. همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که بیش ترین مقادیر پرولین (۰/۰۱۵۲ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) و رنگیزه‌های کلروفیلی شامل کلروفیل a، b و کل به ترتیب با مقادیر ۰/۷۱۱، ۰/۵۲۳ و ۱/۲۳۵ میلی‌گرم در گرم برگ تازه از عدم کاربرد نیتروکسین حاصل شد؛ حال آنکه کاربرد کود زیستی نیتروکسین موجب افزایش میزان آنتوسیانین و کاتالاز شد. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه صفات اندازه‌گیری شده در بین اکوتیپ‌های مورد آزمایش، اکوتیپ سمیرم بیش ترین میزان رنگیزه کلروفیلی b (۳۹/۰ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و بیش ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۰/۰۰۸۷ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) را داشت. بیش ترین میزان آنتوسیانین (۹/۲۱ میکرومول در گرم برگ تازه) را اکوتیپ نیشابور و اکوتیپ اصفهان از بیش ترین میزان غلظت پرولین (۴/۴ میکرومول در گرم برگ تازه) و میزان‌های کلروفیل a و کل برخوردار بود. بر اساس تجزیه واریانس داده‌ها برهم‌کنش سه‌گانه تنش کم آبی × نیتروکسین × اکوتیپ بر تمام صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده به جز میزان فعالیت آنزیم کاتالاز و رنگیزه کلروفیل a در سطح احتمال آماری ۵ درصد معنی‌دار شد. کاهش پارامتر کلروفیل نشان‌دهنده حساسیت به تنش خشکی و افزایش آنتوسیانین، کاتالاز و پرولین نشانه پاسخ گیاه به تنش است. با بررسی ویژگی‌های فیزیولوژیک سیاه‌دانه تحت تنش خشکی، به نظر می‌رسد سیاه‌دانه به تنش خشکی تقریباً حساس است. بر اساس نتایج این پژوهش، بین اکوتیپ‌های سیاه‌دانه از نظر پاسخ به تنش کم‌آبی تفاوت بود و کود زیستی نیز توانست در بهبود پاسخ گیاه به تنش تا حدی مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتوسیانین، پرولین، کاتالاز، کلروفیل، ریزجانداران

۱- گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: n.abbasi@ilam.ac.ir

مقدمه

برای قرن‌ها، گیاهان دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها در شاخه‌های مختلف دارویی و همچنین در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گرفتند (۳). سیاه‌دانه از خانواده Ranunculaceae، جنس *Nigella* بوده و نام علمی آن *Nigella sativa* L. هست. گیاهی است علفی، یک‌ساله، پوشیده از کرک‌های ظریف، با حداکثر ارتفاع ۴۰ – ۷۰ سانتی‌متر، دارای برگ‌های بریده‌بریده و گل‌های به رنگ آبی کم‌رنگ و سفید. میوه‌ها کپسول مانند بوده که تعداد زیادی دانه‌های سیاه تولید می‌کنند (طول: ۲/۵ تا ۳/۵ میلی‌متر و عرض: ۱/۵ تا ۲ میلی‌متر) (۲۴). سیاه‌دانه به‌طور گسترده‌ای برای بیش از دو هزار سال به‌عنوان دارو و پیشگیری‌کننده در برابر بسیاری از بیماری‌ها در آسیای مرکزی و برخی دیگر از کشورهای آسیایی به‌عنوان مسکن، اشتهاآور، بادشکن، تعریق‌زا، هاضم، تب بر و همچنین به‌عنوان کاهنده ضعف و ضدافسردگی و افزاینده مقاومت بدن گزارش شده است (۲۹).

تغییرات جهانی آب و هوایی، باعث تبدیل تنش خشکی به مهم‌ترین عامل محدودکننده تولیدات گیاهی و در نهایت امنیت غذایی شده (۲۳) به‌گونه‌ای که موجب کاهش ۵۰ درصدی میانگین تولید اکثر محصولات در سرتاسر جهان شده است (۲۲). تنش آب نه‌تنها بر مورفولوژی گیاه اثر می‌گذارد بلکه به‌شدت متابولیسم، ویژگی‌های بیوشیمیایی و ویژگی‌های فیزیولوژیک گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از این‌رو گیاهان در زمان مواجه با تنش خشکی، تغییرات خاصی در الگوی رشد و فرایندهای فیزیولوژیک نشان می‌دهند (۱۵). زمانی که گیاه با کمبود آب مواجه است، حفظ پتانسیل آب گیاه برای ادامه رشد ضروری است و این می‌تواند از طریق مکانیسم‌های تنظیم اسمزی ناشی از تجمع محلول‌های سازگار مانند پرولین در سیتوپلاسم به‌دست آید (۴).

تولید محصولات کشاورزی به‌طور عمده متکی به مصرف نهاده‌های شیمیایی بوده که منجر به مشکلات عمده زیست‌محیطی شده است. یکی از راهکارهای رفع این مشکل استفاده از اصول کشاورزی پایدار در بوم نظام‌های زراعی هست. از این‌رو امروزه کودهای زیستی به‌عنوان گزینه‌ای جایگزین برای کودهای شیمیایی، به‌منظور افزایش حاصلخیزی خاک در تولید محصولات در کشاورزی پایدار مطرح شده‌اند (۱۳). این کودهای زیستی در حقیقت ماده‌ای شامل انواع مختلف ریزجانداران آزادزی هستند (۳۶) که توانایی تبدیل عناصر غذایی پرمصرف را از شکل غیرقابل دسترس به شکل قابل دسترس طی فرایندهای بیولوژیک داشته و منجر به توسعه سیستم ریشه‌ای و جوانه‌زنی بهتر بذور می‌شوند (۲۸). کود بیولوژیک نیتروکسین از جمله این کودها هست که حاوی مؤثرترین باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن از جنس ازتوباکتر و آزوسپریلیوم هست که علاوه بر تثبیت نیتروژن هوا و متعادل کردن جذب عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف موردنیاز گیاه، با سنتز و ترشح مواد محرک رشد گیاه مانند اکسین، همچنین ترشح اسیدهای آمینه مختلف سبب رشد و توسعه ریشه و اندام‌های هوایی گیاه می‌شود (۲۶). نتایج نشان داد تنش میانگین رطوبتی همراه با کاربرد نیتروکسین به‌صورت بذر مال سبب تولید بیش‌ترین میزان آنتوسیانین در برگ همیشه بهار شد. کلروفیل a در تنش شدید با مصرف نیتروکسین به‌صورت بذر مال و کلروفیل b و کل در تنش میانگین رطوبتی با همان تیمار کودی، به بیش‌ترین میزان رسید. همچنین برهمکنش رژیم آبیاری و کود زیستی بر میزان کلروفیل کل، a و b و پرولین معنی‌دار شد به‌گونه‌ای که بیش‌ترین میزان کلروفیل کل، a و b در گیاه دارویی زیره سبز در تیمار آبیاری در ۶۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر با کاربرد کود زیستی نیتروکسین و بیوفسفر به‌دست آمد (۱۹).

با توجه به وقوع خشکسالی‌های متعدد و اثر منفی تنش کم‌آبی بر رشد گیاهان، ارائه راهکارهای افزایش تحمل گیاهان دارویی به شرایط تنش کم‌آبی ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین این پژوهش با هدف بررسی اثر کودهای زیستی و معرفی بهترین اکوتیپ سیاه‌دانه تحت شرایط تنش کم‌آبی و آبیاری مطلوب و تعیین حداقل آب مورد نیاز برای حفظ عملکرد کمّی و کیفی مناسب سیاه‌دانه در شرایط آب و هوایی ایلام انجام شده است.

جدول ۱. میانگین شاخص‌های آب و هوایی در طول دوره رشد گیاهان مربوط به سال ۱۳۹۸ در شهرستان ایلام.

Table 1. Average climatic indices during the growth period of plants related to 2019 in Ilam city.

Year سال	Month ماه	Rainfall (mm) بارندگی (میلی متر)	Minimum relative humidity (%) حداقل رطوبت نسبی (٪)	Maximum relative humidity (%) حداکثر رطوبت نسبی (٪)	Average minimum temperature (^{0}c) میانگین حداقل دما (درجه سلسیوس)	Average maximum temperature (^{0}c) میانگین حداکثر دما (درجه سلسیوس)
2019	April	7.2	45	86	6.3	17.0
	May	0.4	25	65	9.8	25.1
	June	0	15	37	17.0	34.5
	July	0	13	31	20.8	37.5
	August	0	14	32	22.1	38.2
	September	0	14	32	19.2	35.5

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت کرت‌های دو بار خرد شده در قالب طرح پایه بلوک‌های کاملاً تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۸ در مزرعه پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام انجام شد. طول جغرافیایی منطقه مورد آزمایش ۴۶ درجه و ۲۸ دقیقه، عرض جغرافیایی ۳۳ درجه و ۳۷ دقیقه و ارتفاع از سطح دریا ۱۱۷۴ متر، هست. شرایط اقلیمی این منطقه در جدول (۱) نشان داده شده است. تیمارهای آزمایش شامل کرت اصلی تیمار رطوبتی در سه سطح (شاهد، تنش میانگین و شدید به‌ترتیب آبیاری بر اساس ۱۰۰، ۵۰ و ۳۵ درصد نیاز آبی گیاه)، کرت فرعی مصرف کود زیستی نیتروکسین در دو سطح (شاهد یا عدم مصرف کود نیتروکسین، و مصرف بذر مال کود نیتروکسین به میزان چهار لیتر در هکتار) و کرت فرعی-فرعی اکوتیپ‌های سیاه‌دانه در چهار سطح (مشهد، نیشابور، اصفهان و سمیرم) بودند.

به‌منظور تعیین تبخیر و تعرق مرجع به کمک داده‌های تبخیر، از تشت تبخیر کلاس A و ضرایب تشتک استفاده شد (۵):

$$ET_0 = K_p \times E_{pan} \quad [۱]$$

در این معادله، E_{pan}، K_p و ET_0 به‌ترتیب تبخیر از تشت، ضریب تشت و تبخیر و تعرق گیاه مرجع است. در این روش ضریب تشتک محاسبه‌شده از روش پیشنهاد شده در نشریه فائو ۵۶، به‌طور میانگین ۰/۶۵ منظور شد (۵).

$$ET_{crop} = K_c \times ET_0 \quad [۲]$$

در این معادله ET_{crop} تبخیر و تعرق گیاه سیاه‌دانه (میلی‌متر در روز)، K_c ضریب گیاهی (بدون واحد) است (۵). برای تعیین ضریب گیاهی در مراحل مختلف رشد از دستورالعمل‌های فائو استفاده شد. در این آزمایش برای محاسبه حجم آب آبیاری (I, m^3/day) از معادله زیر استفاده شد (۵):

$$I = ET_{crop} \times A \times 10^{-3} \quad [۳]$$

در این رابطه ET_{crop} تبخیر و تعرق گیاه سیاه‌دانه (mm/day) و A مساحت هر کرت (m^2) است. میزان نیاز آبی سالانه سیاه‌دانه برابر ۶۶۶ میلی‌متر در مترمربع برآورد شد.

حجم آب موردنیاز در هر بار آبیاری با در نظر گرفتن بارندگی مؤثر، مساحت هر کرت، کارایی آبیاری ۸۰ درصد و ۴۵ درصد تخلیه مجاز رطوبتی در منطقه توسعه ریشه برآورد شد (۱۴). تعیین دور آبیاری بر اساس درصد حجمی نیاز آبی گیاه به‌صورت ۱۰۰، ۵۰ و ۳۵ درصد نیاز آبی گیاه صورت گرفت.

برای اجرای آزمایش ابتدا زمین در اردیبهشت ماه شخم زده شده و پس از ایجاد جوی و پشته توسط کولتیواتور کرت‌بندی صورت گرفت. ابعاد هر کرت ۲ × ۴ مترمربع، فاصله بین کرت‌ها یک متر و فاصله تکرارها از یکدیگر یک متر در نظر گرفته شد. کاشت در تاریخ ۱۳۹۸/۲/۲۷ و در وسط پشته‌ها با فاصله بین پشته ۵۰ سانتی‌متر صورت گرفت. هر کرت شامل ۸ پشته بود.

جدول ۲. نتایج ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک.

Table 2. Results of soil physical and chemical characteristics.

Depth (cm) عمق (سانتی‌متر)	Texture بافت	pH واکنش خاک	EC (dS cm^{-1}) رسانایی الکتریکی (دسی‌زیمنس بر سانتی‌متر)	Organic matter (%) ماده آلی (درصد)	Total nitrogen (%) نیتروژن کل (درصد)	Phosphorus (mg kg^{-1}) فسفر (میلی‌گرم در کیلوگرم)	Exchangeable potassium (mg kg^{-1}) پتاسیم قابل تبادل (میلی‌گرم در کیلوگرم)
0–30	Silt loam	7.06	0.15	0. 37	0.125	5.05	259.2

کود زیستی نیتروکسین از شرکت زیست‌فناوری مهر آسیا تهیه شد. بذور اکوتیپ‌های مختلف سیاه‌دانه شامل اکوتیپ‌های مشهد، نیشابور، اصفهان و سمیرم از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. اعمال تیمار کود زیستی نیتروکسین روی بذور به‌گونه‌ای بود که از پیش بذرهای مربوط به هر کرت را به‌مدت یک ساعت به میزان ۳/۲ میلی‌لیتر در ۸ مترمربع در سایه کود روی بذرها محلول‌پاشی شد. کاشت بذور در ابتدا به‌صورت متراکم بود و پس از رسیدن به مرحله چهار برگی برای رسیدن به تراکم مطلوب (۲۵۰ بوته در مترمربع) (۲۰) به فاصله دو سانتی‌متر تنک صورت گرفت. آبیاری به روش نوار تیپ انجام شد. اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت بود و بنا بر نتایج حاصل از آزمایش‌های آزمایشگاهی به‌دلیل حساسیت بذور سیاه‌دانه به تنش خشکی، اعمال تنش خشکی پس از استقرار گیاهچه‌ها انجام گرفت. برای انجام آزمون خاک نمونه‌هایی از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متری خاک تهیه شده و برای تعیین ویژگی‌های خاک در آزمایشگاه گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام بررسی شدند. بر اساس آزمون خاک (جدول ۲) صورت گرفته مقادیر کودی پایه برای هر کرت اعمال شد. کودهای پایه فسفر و پتاسیم به‌ترتیب (N-P-K) از منابع سوپر فسفات تریپل و کود پتاسه (به‌ترتیب ۱۵۰ و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) در یک قسط به‌صورت پیش-کاشت اعمال شد و کود نیتروژن از منبع کود اوره ۴۶ درصد به میزان ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار در سه بخش، یک بخش به‌صورت پیش-کاشت و دو بخش دیگر پس از استقرار گیاهچه به خاک افزوده شد. کودهای پیش-کاشت پس از تهیه اولیه زمین و پیش از تهیه جوی و پشته به خاک افزوده شد تا کود در مکان ریشه و عمق ۱۰ سانتی‌متری خاک قرار گیرد.

مبارزه با علف‌های هرز به‌صورت دستی و در چند نوبت صورت گرفت. برای اندازه‌گیری صفات مورد بررسی، نمونه‌گیری در مرحله آغازین گل‌دهی و از برگ‌های جوان صورت گرفت.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان کلروفیل برگ ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگ را با افزودن پنج میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد با استفاده از دستگاه هموژن، هموژن کرده و با استفاده از استون ۸۰ درصد به حجم ۱۵ میلی‌لیتر رسانده و سپس نمونه‌ها را درون دستگاه سانتریفیوژ قرار داده شد. میزان جذب محلول رویی نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian) در طول‌موج‌های ۶۶۳ و ۶۴۵ نانومتر به‌ترتیب برای کلروفیل a و b قرائت شد. میزان کلروفیل با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (۷):

$$\text{Chl a (mg g}^{-1}\text{ FW)} = (12.7A_{663} - 2.69A_{645}) \times V/W \times 1000 \quad [۴]$$

$$\text{Chl b (mg g}^{-1}\text{ FW)} = (22.9A_{645} - 4.69A_{663}) \times V/W \times 1000 \quad [۵]$$

$$\text{Chl a + b (mg g}^{-1}\text{ FW)} = (20.2A_{645} + 8.02A_{663}) \times V/W \times 1000 \quad [۶]$$

Chl a، Chl b و Chl a+b به‌ترتیب معادل کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل هستند. برای اندازه‌گیری مقدار پرولین ۰/۲ گرم از بافت تازه برگ گیاه جدا و در ۱۰ میلی‌لیتر محلول سولفوسالیسیلیک اسید ۳ درصد سائیده و مخلوط یکنواختی آماده شد. ۲ میلی‌لیتر از مایع رویی حاصل از سانتریفوژ عصاره با ۲ میلی‌لیتر معرف نین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال مخلوط شد و به‌مدت یک ساعت در حمام بن ماری (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. پس از حمام بن ماری، لوله‌های محتوی مخلوط در حمام آب سرد قرار گرفتند. سپس ۴ میلی‌لیتر تولوئن به مخلوط افزوده شده و لوله‌ها به‌خوبی

ورتکس شدند. غلظت پرولین نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Visible مدل Cary-50 ساخت شرکت Varian در طول‌موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شده و درنهایت با توجه به منحنی استاندارد میزان پرولین نمونه‌ها با استفاده از فرمول زیر برحسب میکرو مول بر گرم وزن تازه محاسبه شد (۱۱):

پرولین =

[۷] ۱۱۵/۵÷ تولوئن مصرفی× عدد خوانده‌شده توسط دستگاه / ۵ ÷ وزن نمونه (گرم)

به‌منظور اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز ابتدا عصاره آنزیمی استخراج شد. بدین منظور ابتدا ۰/۲ گرم از بافت برگی تازه وزن و به‌سرعت در نیتروژن مایع ساییده و سپس به درون اپندروف ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد. به هر اپندروف به میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج (۲) افزوده شده و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۲ هزار دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفیوژ انجام شد. درنهایت مایع رویی به اپندروف‌های جدید منتقل شده و از آن برای سنجش محتوای آنزیم کاتالاز استفاده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر (ΔOD) تعیین شد. مخلوط واکنش شامل فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH = ۷) و پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط ذکر شده، انجام شد. میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با میزان مصرف H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از یک دقیقه با استفاده از ضریب خاموشی و به‌صورت واحد آنزیمی (Unit) برحسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره به‌دست آمده به روش برادفورد (۱۲) در یک دقیقه محاسبه شده و از فرمول با استفاده از قانون بیرلامبرت و با ضریب خاموشی کاتالاز ۴۰ $mM^{-1}\ cm^{-1}$ محاسبه شد (۳۴):

[۸] ΔOD = ۱ جذب − ۲ جذب

[۹] Unit = ΔOD / ۴۰ mmol

[۱۰] مقدار آنزیم کاتالاز = unit / protein

برای اندازه‌گیری آنتوسیانین، از روش اختلاف جذب در pHهای مختلف استفاده شد. برای این منظور از دو بافر شامل پتاسیم کلرید با pH = ۱ و سدیم استات با pH = ۴/۵ استفاده شد و سپس در دو طول‌موج ۵۲۰ و ۷۰۰ نانومتر میزان جذب برای هر دو بافر قرائت شد (۳۷).

تجزیه واریانس صفات مورد بررسی به‌صورت کرت‌های دو بار خردشده در قالب بلوک‌های کامل تصادفی انجام گرفت. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 صورت گرفت.

نتایج و بحث

۱- کلروفیل a، b و کل

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفات کلروفیل a، b و کل نشان داد آثار اصلی تنش خشکی، کود زیستی و اکوتیپ معنی‌دار شد ($p < ۰/۰۱$). همچنین اثر دوگانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین، کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ و تنش خشکی × اکوتیپ بر صفات کلروفیل b و کل معنی‌دار شد ($p < ۰/۰۱$) (جدول ۳). همچنین اثر دوگانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین بر صفت کلروفیل a معنی‌دار شد ($p < ۰/۰۵$) اما اثر دوگانه کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ و تنش خشکی × اکوتیپ بر صفت کلروفیل a معنی‌دار نشد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس اثر اصلی تنش خشکی برای صفات کلروفیل a، b و کل حاکی از آن بود که تیمار عدم تنش خشکی (آبیاری بر اساس ۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه) بیش‌ترین مقادیر کلروفیل a (۰/۷۱۱ میلی‌گرم در گرم برگ تازه)، b (۰/۵۲۳ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کل (۱/۲۳۵ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و تیمار تنش خشکی ۳۵ درصد نیاز آبی گیاه کم‌ترین مقادیر کلروفیل a (۰/۲۸۹ میلی‌گرم در گرم برگ تازه)، b (۰/۱۴۷ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کل (۰/۴۳۶ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) را دارا بود. اثر اصلی کود زیستی نیترکسین برای صفت‌های کلروفیل a، b و کل حاکی از آن بود که تیمار شاهد (عدم اعمال کود زیستی) بیش‌ترین

جدول ۳. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات فیزیولوژیک اکوتیپ‌های سیاه‌دانه تحت تأثیر تیمارهای تنش خشکی و کود زیستی نیتروکسین.

Table 3. Analysis of variance (mean squares) of physiological properties of Black cumin ecotypes under drought stress and nitroxin biological fertilizer.

Catalase کاتالاز	Proline پرولین	Anthocyanin آنتوسیانین	Chlorophyll total کلروفیل کل	Chlorophyll b کلروفیل b	Chlorophyll a کلروفیل a	Df درجه آزادی	S.O.V منبع تغییر
0.00003^{ns}	0.173^{ns}	0.104^{ns}	0.0099**	0.015**	0.0015^{ns}	2	Block
0.00117**	80.2**	922.11**	3.83**	0.855**	1.08**	2	Stress
0.000036	0.166	0.372	0.0015	0.002	0.0031	4	Stress × Block
0.00024**	10.3**	231.76**	1.06**	0.184**	0.364**	1	Nitroxin
0.000096**	0.349*	23.63**	0.0086**	0.0042**	0.007*	2	Stress × Nitroxin
0.000006	0.019	0.254	0.0005	0.00058	0.0025	6	Block (Stress) × Nitroxin
0.000019^{ns}	6.88**	20.42**	0.095**	0.0242**	0.209**	3	Ecotype
0.00002^{ns}	1.77**	4.05**	0.024**	0.0165**	0.0035^{ns}	6	Stress × Ecotype
0.00002^{ns}	0.723**	9.34**	0.015**	0.0063**	0.0045^{ns}	3	Nitroxin × Ecotype
0.00002*	1.44**	3.49**	0.013**	0.0097**	0.002^{ns}	6	Stress × Nitroxin × Ecotype
0.00000969	0.083	0.112	0.0003	0.00022	0.0018	36	Error
42.5	7.39	4.31	2.11	4.31	8.91		(%) CV

*، ** و ns به‌ترتیب بیانگر اثر معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد و عدم اختلاف معنی‌دار است.

*, ** and ns stand for significant effects at the 0.05 and 0.01 levels of probability and no significant effect, respectively.

مقادیر کلروفیل a (۰/۵۵۶ میلی‌گرم در گرم برگ تازه)، b (۰/۳۶۳ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کل (۰/۹۵۱ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و تیمار اعمال کود زیستی کم‌ترین مقادیر کلروفیل a (۰/۴۱۴ میلی‌گرم در گرم برگ تازه)، b (۰/۲۹۴ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کل (۰/۷۰۸ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) را دارا بود. همچنین اثر اصلی تیمار اکوتیپ برای صفت‌های کلروفیل a، b و کل حاکی از آن بود که اکوتیپ سمیرم بیش‌ترین (۰/۳۹ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و اکوتیپ اصفهان کم‌ترین (۰/۳۰۶ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) مقادیر کلروفیل b را به خود اختصاص دادند. همچنین اکوتیپ اصفهان بیش‌ترین مقادیر کلروفیل a (۰/۶۲۲ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کل (۰/۹۲۹ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و اکوتیپ سمیرم کم‌ترین مقادیر کلروفیل a (۰/۳۷ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کل (۰/۷۶ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) را به خود اختصاص دادند. برهم‌کنش‌های سه‌گانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ برای کلروفیل a بدون اثر معنی‌داری بود ولی برای کلروفیل b و کل در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار ($p < ۰/۰۱$) شد. بر اساس آزمون مقایسه میانگین داده‌ها بیش‌ترین (۰/۸۷۵ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کم‌ترین (۰/۲۴۲ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) مقادیر کلروفیل a از اکوتیپ اصفهان با کاربرد کود زیستی نیتروکسین در شرایط تنش خشکی شاهد و تنش خشکی شدید از عدم تلقیح با کود زیستی نیتروکسین و اکوتیپ نیشابور حاصل شد (جدول ۴). بیش‌ترین (۰/۶۹۳ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کم‌ترین (۰/۰۹۳ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) مقادیر کلروفیل b از اکوتیپ سمیرم با کاربرد کود زیستی نیتروکسین در شرایط تنش خشکی شاهد و تنش خشکی شدید با عدم تلقیح با کود زیستی نیتروکسین و اکوتیپ اصفهان حاصل شد (جدول ۴). بیش‌ترین (۱/۳۸ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) و کم‌ترین (۰/۲۲۴ میلی‌گرم در گرم برگ تازه) مقادیر کلروفیل کل نیز از اکوتیپ نیشابور با

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر سه‌گانه تنش خشکی و کود زیستی نیتروکسین بر صفات فیزیولوژیک اکوتیپ‌های سیاه‌دانه.

Table 4. Mean comparisons of the triple effect of drought stress and nitroxin biological fertilizer on physiological properties of Black cumin ecotypes.

Treatments تیمارها			Chlorophyll a (mg g^{-1})	Chlorophyll b (mg g^{-1})	Chlorophyll Total (mg g^{-1})	Anthocyanin (µmol g^{-1} FW)	Proline (µmol g^{-1} FW)	Catalase (unit min^{-1} mg^{-1} protein)
No stress	Nitroxin	Neyshabour	0.779^{b}	0.605^{b}	1.38^{a}	1.76^{n}	2.59^{jk}	0.0016^{g}
		Mashhad	0.775^{b}	0.587^{b}	1.36^{ab}	1.57^{no}	1.91^{lmn}	0.0017^{g}
		Semirom	0.679^{c}	0.693^{a}	1.37^{ab}	2.36^{m}	2.07^{lm}	0.0022^{g}
		Isfahan	0.875^{a}	0.472^{c}	1.34^{b}	1.2^{o}	3.25^{hi}	0.0015^{g}
	Non-nitroxin	Neyshabour	0.671^{c}	0.378^{de}	1.04^{e}	3.83^{ij}	1.28^{o}	0.0026^{g}
		Mashhad	0.565^{d}	0.381^{de}	0.94^{f}	2.63^{lm}	1.65^{mno}	0.0022^{g}
		Semirom	0.566^{d}	0.596^{b}	1.16^{d}	3.45^{jk}	1.56^{no}	0.0025^{g}
		Isfahan	0.780^{b}	0.475^{c}	1.25^{c}	5.14^{h}	3.36^{hi}	0.0021^{g}
Moderate stress	Nitroxin	Neyshabour	0.561^{d}	0.353^{f}	0.91^{g}	5.07^{h}	4.22^{fg}	0.0050^{fg}
		Mashhad	0.462^{e}	0.487^{c}	0.95^{f}	3.07^{kl}	2.91^{ij}	0.0035^{g}
		Semirom	0.370^{f}	0.383^{de}	0.75^{h}	5.35^{gh}	4.46^{efg}	0.0029^{g}
		Isfahan	0.656^{c}	0.396^{g}	1.05^{e}	4.08^{i}	4.91^{e}	0.0024^{g}
	Non-nitroxin	Neyshabour	0.447^{e}	0.314^{g}	0.76^{h}	11^{e}	3.29^{hi}	0.0050^{fg}
		Mashhad	0.342^{f}	0.377^{def}	0.72^{i}	5.85^{g}	2.36^{kl}	0.0057^{fg}
		Semirom	0.244^{h}	0.369^{ef}	0.61^{j}	5.86^{g}	3.54^{h}	0.0053^{fg}
		Isfahan	0.557^{d}	0.220^{h}	0.78^{h}	6.42^{f}	4.02^{g}	0.0065^{efg}
Severe stress	Nitroxin	Neyshabour	0.359^{f}	0.204^{hi}	0.56^{k}	12.4^{c}	5.87^{d}	0.0119^{cd}
		Mashhad	0.357^{f}	0.201^{hi}	0.56^{k}	10.6^{e}	4.81^{e}	0.0089^{efd}
		Semirom	0.259^{gh}	0.176^{j}	0.44^{l}	11.8^{d}	7.59^{a}	0.0117^{cde}
		Isfahan	0.541^{d}	0.181^{ij}	0.72^{i}	12.2^{cd}	7.05^{b}	0.0120^{cd}
	Non-nitroxin	Neyshabour	0.242^{h}	0.096^{l}	0.34^{m}	21.1^{a}	6.36^{c}	0.0164^{bc}
		Mashhad	0.126^{i}	0.105^{kl}	0.23^{n}	16.1^{b}	4.79^{e}	0.0202^{b}
		Semirom	0.102^{i}	0.122^{k}	0.22^{n}	16.6^{b}	5.69^{d}	0.0279^{a}
		Isfahan	0.325^{fg}	0.093^{l}	0.42^{l}	16.4^{b}	4.62^{ef}	0.0129^{cd}

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون تفاوت معنی‌دار آماری در سطح احتمال پنج درصد ندارند.

Means with the same letters in each column are not significantly different at 5% probability level.

Catalase (unit min^{-1} mg^{-1} protein): کاتالاز (واحد در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین)، Proline (µmol g^{-1} FW): پرولین (میکرومول در گرم برگ تازه)، Anthocyanin (µmol g^{-1} FW): آنتوسیانین (میکرومول در گرم برگ تازه)، Chlorophyll total (mg g^{-1}): کلروفیل کل (میلی‌گرم در گرم)، Chlorophyll b (mg g^{-1}): کلروفیل b (میلی‌گرم در گرم)، Chlorophyll a (mg g^{-1}): کلروفیل a (میلی‌گرم در گرم)، Neyshabour: نیشابور، Mashhad: مشهد، Semirom: سمیرم، Isfahan: اصفهان، No stress: عدم تنش، Moderate stress: تنش متوسط، Severe stress: تنش شدید، Nitroxin: نیتروکسین، Non-nitroxin: عدم نیتروکسین.

کاربرد کود زیستی نیتروکسین در شرایط تنش خشکی شاهد و تنش خشکی شدید در عدم تلقیح با کود زیستی نیتروکسین و اکوتیپ سمیرم حاصل شد (جدول ۴). در پژوهشی با بررسی اثر تنش خشکی گزارش شد که در گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis* L.)بیشترین میزان کلروفیل a در تیماری آبیاری شاهد، بیشترین میزان کلروفیل b در تیماری آبیاری ۲۰ درصد گنجایش زراعی و بیشترین میزان کلروفیل کل در تیمار آبیاری شاهد حاصل شد (۱). نتایج پژوهش روی گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) نشان داد با افزایش شدت تنش خشکی، کلروفیل کل، a و b در گیاه دارویی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) کاهش یافت (۱۸). در بررسی صورت گرفته روی فراسیون (*Marrubium vulgare* L.) افزایش کود نیتروکسین و سولفات آمونیوم سبب افزایش میزان کلروفیل کل شد (۲۰). بیش‌ترین و کم‌ترین مقادیر کلروفیل برگ به‌ترتیب در گیاهان همزیست با قارچ (*G. mosseae*) و تیمار عدم کاربرد قارچ مشاهده شد (۹). گزارش شده است کودهای زیستی موجب افزایش کلروفیل کل، a و b در گیاه دارویی زیره سبز می‌شود (۱۹). در شرایط تنش خشکی، به‌دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن، فعالیت آنزیم‌های کلروفیلاز و پراکسیداز افزایش می‌یابد که از جمله عوامل کاهش میزان کلروفیل گیاه در این شرایط هستند. از طرفی زمانی که گیاه به‌مدت طولانی در معرض این تنش قرار گیرد ممکن است به‌دلیل کاهش جریان نیتروژن به بافت‌ها و تغییر فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز موجب کاهش سبزینه در گیاه شود. از آنجایی

که نیتروژن بخشی از مولکول کلروفیل هست، ممکن است کمبود آن در گیاه، موجب کاهش کلروفیل در گیاه شود (۲۷). به‌نظر می‌رسد کود زیستی نیتروکسین به‌دلیل وجود باکتری‌های مختلف با تأمین نیتروژن و شرکت در ساختمان کلروفیل (با توجه به اینکه چهار اتم نیتروژن در حلقه‌های درون کلروفیل جای گرفته است) و دیگر عناصر غذایی وابسته به pH مانند فسفر، روی، آهن و مس را که در چرخه‌های فتوسنتزی و ساختمان سیتوکروم‌ها نقش دارند، افزایش می‌دهد. افزایش جذب این ریزمغذی‌ها که نقش اساسی در ساختار و تولید کلروفیل دارند سبب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌شوند و از این‌رو تأثیر مستقیم و قطعی در ساخت کلروفیل دارد (۳۲).

۲- میزان آنتوسیانین

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفت آنتوسیانین نشان داد آثار اصلی تنش خشکی، کود زیستی و اکوتیپ معنی‌دار شد ($p < ۰/۰۱$). همچنین آثار دوگانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین، کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ و تنش خشکی × اکوتیپ بر صفت آنتوسیانین معنی‌دار شد ($p < ۰/۰۱$) (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس اثر اصلی تنش خشکی برای صفت آنتوسیانین حاکی از آن بود که تیمار تنش خشکی شدید (آبیاری بر اساس ۳۵ درصد نیاز آبی گیاه) بیش‌ترین (۱۴/۶۹ میکرو مول در گرم برگ تازه) و تیمار عدم تنش خشکی (۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه) کم‌ترین (۲/۷۴ میکرو مول در گرم برگ تازه) مقادیر آنتوسیانین را دارا بود. اثر اصلی کود زیستی نیترکسین برای صفت آنتوسیانین حاکی از آن بود که تیمار اعمال کود زیستی بیش‌ترین (۹/۵۵ میکرو مول در گرم برگ تازه) و تیمار شاهد (عدم اعمال کود زیستی) کم‌ترین (۵/۹۶ میکرو مول در گرم برگ تازه) مقادیر آنتوسیانین را دارا بود. همچنین اثر اصلی تیمار اکوتیپ برای صفت آنتوسیانین حاکی از آن بود که اکوتیپ نیشابور بیش‌ترین (۹/۲۱ میکرو مول در گرم برگ تازه) و اکوتیپ مشهد کم‌ترین (۶/۶۵ میکرو مول در گرم برگ تازه) مقادیر آنتوسیانین را به خود اختصاص دادند. برهم‌کنش‌های سه‌گانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ در سطح احتمال آماری یک درصد معنی‌دار ($p < ۰/۰۱$) شد. بر اساس آزمون مقایسه میانگین داده‌های آنتوسیانین بیش‌ترین (۲۱/۱ میکرومول در گرم برگ تازه) و کم‌ترین (۱/۲ میکرو مول در گرم برگ تازه) مقادیر آنتوسیانین از اکوتیپ نیشابور با عدم کاربرد کود زیستی نیتروکسین در شرایط تنش خشکی شدید و اکوتیپ اصفهان تحت تنش خشکی شاهد از گیاهان تلقیح شده با کود زیستی نیتروکسین حاصل شد (جدول ۴). نتایج مشابه در پژوهش‌های روی گیاهان دارویی دو گونه آویشن (*Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis L.*) گیاه دارویی همیشه بهار نیز حاکی از افزایش میزان آنتوسیانین در شرایط تنش خشکی بود (۸ و ۱۸). در شرایطی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد برخی ترکیبات از جمله آنتوسیانین در گیاه افزایش می‌یابد. آنتوسیانین به‌دلیل نقشی که در حذف مستقیم رادیکال‌های آزاد در گیاه دارد موجب حفاظت نوری گیاه در شرایط تنش می‌شود (۲۱). ریشه تلقیح شده با کودهای زیستی توانایی ساخت و ترشح مواد بیولوژیک فعال مانند ویتامین‌های گروه B، اسید نیکوتنیک، اسید پنتوتنیک، بیوتین، اکسین‌ها، و جیبرلین‌ها را دارند که این مواد موجب افزایش محتوای ماده آلی و هیدرات‌های کربن گیاه و درنتیجه افزایش آنتوسیانین می‌شوند (۳۱).

۳- میزان آنزیم کاتالاز

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفت کاتالاز نشان داد آثار اصلی تنش خشکی و کود زیستی بر صفت کاتالاز معنی‌دار شد ($p < ۰/۰۱$). همچنین اثر اصلی اکوتیپ بر صفت کاتالاز معنی‌دار نبود (جدول ۳). بررسی اثر دوگانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین بر صفت کاتالاز نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۱$) اما آثار دوگانه کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ و تنش خشکی × اکوتیپ بر صفت کاتالاز معنی‌دار نشد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس نشان داد، اثر اصلی تنش خشکی برای صفت کاتالاز حاکی از آن بود که تیمار تنش

خشکی شدید (آبیاری بر اساس ۳۵ درصد نیاز آبی گیاه) بیش‌ترین (۰/۰۱۵۲ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) و تیمار عدم تنش خشکی (۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه) کم‌ترین (۰/۰۰۲ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) مقادیر کاتالاز را دارا بود. اثر اصلی کود زیستی نیترکسین برای صفت کاتالاز حاکی از آن بود که تیمار اعمال کود زیستی بیش‌ترین (۰/۰۰۹۱ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) و تیمار شاهد (عدم اعمال کود زیستی) کم‌ترین (۰/۰۰۵۴ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) مقادیر کاتالاز را دارا بود. همچنین اثر اصلی تیمار اکوتیپ برای صفت کاتالاز حاکی از آن بود که اکوتیپ سمیرم بیش‌ترین (۰/۰۰۸۷ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) و اکوتیپ اصفهان کم‌ترین (۰/۰۰۶۲ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) مقادیر کاتالاز را به خود اختصاص دادند. برهم‌کنش‌های سه‌گانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ در سطح احتمال آماری پنج درصد معنی‌دار ($p < ۰/۰۵$) شد. بر اساس آزمون مقایسه میانگین داده‌ها بیش‌ترین (۰/۰۲۷۹ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) و کم‌ترین (۰/۰۰۱۵ واحد در دقیقه در گرم پروتئین) مقادیر کاتالاز از اکوتیپ سمیرم با عدم کاربرد کود زیستی نیتروکسین در شرایط تنش خشکی شدید و اکوتیپ اصفهان تحت تنش خشکی شاهد از گیاهان تلقیح شده با کود زیستی نیتروکسین حاصل شد (جدول ۴). نتایج مشابه با پژوهش حاضر در پژوهش‌های صورت گرفته روی گیاه دارویی مرزنجوش (*Origanum majorana* L.) نیز گزارش شد (۱۶). در واکنش به تنش خشکی، بیان تعداد زیادی از ژن‌ها تنظیم می‌شود. این ژن‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول شامل ژن‌های مسئول کد کردن پروتئین‌هایی است که فعالیت کاتالیزوری آن‌ها مسئول محافظت از سلول‌ها و اندام‌ها در برابر تنش هستند، گروه دوم ژن‌هایی هستند که پروتئین‌هایی را کد می‌کنند که برای انتقال پیغام و تنظیم بیان ژن ضروری هستند. این پروتئین‌ها که به‌طور مستقیم مسئول دفاع از سلول در برابر تنش هستند در فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مختلف، مشارکت می‌کنند. آنزیم‌های تجزیه‌کننده اکسیژن‌های فعال از جمله کاتالاز از جمله این آنزیم‌ها هستند؛ از این‌رو در شرایط تنش سطح این آنزیم در گیاه افزایش می‌یابد (۱۷). تغذیه مناسب گیاهی در افزایش سطح تحمل گیاهان در برابر انواع تنش‌ها نقش زیادی دارد (۳۳). تأمین مناسب و تدریجی نیتروژن، به‌واسطه حضور باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در کودهای زیستی، توانسته از طریق فراهم کردن شرایط مناسب‌تر برای رشد گیاه، آثار تنش بر گیاه را کاهش دهد و در نتیجه آن، گیاه مقدار کاتالاز کمتری تولید کرده است (۶).

۴- میزان پرولین

نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به صفت پرولین نشان داد آثار اصلی تنش خشکی، کود زیستی و اکوتیپ معنی‌دار شد ($p < ۰/۰۱$) (جدول ۳). اثر دوگانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین بر صفت کاتالاز معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۵$) و آثار دوگانه کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ و تنش خشکی × اکوتیپ بر صفت کاتالاز نیز معنی‌دار ($p < ۰/۰۱$) شد (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس اثر اصلی تنش خشکی برای صفت پرولین حاکی از آن بود که تیمار تنش خشکی شدید (آبیاری بر اساس ۳۵ درصد نیاز آبی گیاه) بیش‌ترین (۵/۸۴ میکرومول در گرم برگ تازه) و تیمار عدم تنش خشکی (۱۰۰ درصد نیاز آبی گیاه) کم‌ترین (۲/۲ میکرومول در گرم برگ تازه) مقادیر پرولین را دارا بود. اثر اصلی کود زیستی نیترکسین برای صفت پرولین حاکی از آن بود که تیمار شاهد (عدم اعمال کود زیستی) بیش‌ترین (۴/۲۹ میکرومول در گرم برگ تازه) و تیمار اعمال کود زیستی کم‌ترین (۳/۵۳ میکرومول در گرم برگ تازه) مقادیر پرولین را دارا بود. همچنین اثر اصلی تیمار اکوتیپ برای صفت پرولین حاکی از آن بود که اکوتیپ اصفهان بیش‌ترین (۴/۵۳ میکرومول در گرم برگ تازه) و اکوتیپ مشهد کم‌ترین (۳/۰۶ میکرومول در گرم برگ تازه) مقادیر پرولین را به خود اختصاص دادند. برهم‌کنش‌های سه‌گانه تنش خشکی × کود زیستی نیتروکسین × اکوتیپ در سطح احتمال آماری یک درصد معنی‌دار ($p < ۰/۰۱$) شد.

مقایسه میانگین داده‌های پرولین نشان داد بیش‌ترین (۷/۵۹ میکرو مول در گرم برگ تازه) و کم‌ترین (۱/۲۸ میکرو مول در گرم برگ تازه) مقادیر پرولین از اکوتیپ سمیرم با کاربرد کود زیستی نیتروکسین در شرایط تنش خشکی شدید و اکوتیپ نیشابور تحت تنش خشکی شاهد و عدم تلقیح با کود زیستی نیتروکسین حاصل شد (جدول ۴). نتایج پژوهش حاضر با نتایج پژوهش مشابه روی گیاه دارویی زنیان (*Carum copticum* L.) و زیره سبز مشابه بود (۱۹و ۳۰). به‌دنبال تنش خشکی، گیاه دچار تنش اکسیداتیو شده که منجر به تجمع قابل توجه پرولین در گیاه می‌شود. پرولین علاوه بر ویژگی‌های اسمولیتی، یک آنتی‌اکسیدان قوی بوده و دارای توان بازدارندگی مرگ برنامه‌ریزی شده سلول است (۳۵). چون کلروفیل و پرولین هر دو از پیش-ماده مشترکی به نام گلوتامات سنتز می‌شوند، می‌توان گفت که افزایش سنتز پرولین در شرایط تنش خشکی به کاهش سنتز کلروفیل منجر می‌شود. از این‌رو استفاده از منابعی که نیتروژن را برای گیاه فراهم می‌کنند (مانند کودهای زیستی) می‌تواند موجب افزایش تحمل گیاه در این شرایط شود؛ که در نتیجه موجب کاهش در میزان پرولین گیاه و افزایش کلروفیل می‌شود (۱۰).

نتیجه‌گیری

ارزشمندی گیاهان دارویی در چند دهه اخیر و در سرتاسر جهان مورد توجه قرار گرفته است. کشور ایران منشأ انواع مختلفی از گیاهان دارویی محسوب می‌شود و استفاده از این گیاهان تحت شرایط اکوسیستم‌های زراعی مورد توجه قرار گرفته است. کاهش بارندگی‌ها و افزایش میانگین دما به‌علت تغییرات اقلیم جهانی به‌عنوان موانع دستیابی به عملکرد بهینه گیاهان زراعی مطرح است. در آزمایش انجام‌گرفته پاسخ‌های فیزیولوژیک چهار اکوتیپ سیاه‌دانه (اصفهان، نیشابور، مشهد و سمیرم) به کاربرد کود زیستی نیتروکسین و تنش خشکی تحت شرایط مزرعه بررسی شدند. تنش خشکی (به‌ویژه شدید) موجب تغییرات فیزیولوژیک در چهار اکوتیپ سیاه‌دانه شد. تحت شرایط عدم تنش خشکی و بر اساس صفات اندازه‌گیری شده، اکوتیپ اصفهان از میزان محتوای کلروفیل a، b و کل، آنتوسیانین، غلظت پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتری برخوردار بود و از این نظر دارای برتری نسبت به سایر اکوتیپ‌های مورد بررسی بود. تحت تنش نیز این اکوتیپ از رنگیزه‌های کلروفیل a و کل و فعالیت آنزیم کاتالاز بیشتری برخوردار بود؛ هر چند میزان غلظت پرولین این اکوتیپ کمتر از سایر اکوتیپ‌ها بود. همچنین به‌کارگیری کود زیستی نیتروکسین موجب بهبود صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده، شد. بر اساس بررسی انجام گرفته بین اکوتیپ‌های سیاه‌دانه از نظر پاسخ به تنش کم‌آبی تفاوت بود و کود زیستی نیز توانست در بهبود پاسخ گیاه به تنش تا حدی مؤثر باشد که لزوم به‌کارگیری اکوتیپ مناسب به همراه باکتری و یا قارچ‌های محرک رشد گیاه برای زراعت چنین گیاهی با محدودیت‌های منابع آبی می‌تواند در مدیریت تولید چنین گیاهانی مهم باشد.

منابع مورد استفاده

1. Abbaszade, B., Sharifi, A., Ardakani, M., Lebaschi, M., Safikhani, F., Hajibagherkandi, M., 2006. Effect of application methods of nitrogen fertilizer on essential oil content and composition of balm (*Melissa officinalis* L.) under field condition. *Iranian Medicinal and Aromatic Plants Research* 22(3): 223–30.
2. Abdolinejad, R. and Shekafandeh, A., 2015. Responses of two figs (*Ficus carica* L.) cultivars under salt stress via in vitro condition. *Agriculture Science Development* 3: 194–199.
3. Ahmad, S., Beg, Z.H., 2013. Hypolipidemic and antioxidant activities of thymoquinone and limonene in atherogenic suspension fed rats. *Food Chemistry* 138(2): 1116–1124.
4. Ajithkumarand, P., Panneerselvam, R., 2013. Osmolyte accumulation, photosynthetic pigment and growth of *Setaria italica* under droght stress. *Asian Pacific Journal* 2: 220–224.
5. Allen, R.G., Pereira, L.S., Raes, D., Smith, M., 1998. Crop Evapotranspiration. Guidelines for Computing Crop Water Requirements. FAO Irrigation and Drainage, Rome, Italy, 301 pp.

6. Amir Yousefi, M., Taday'oun, M.R., Ebrahimi, R., 2020. Evaluation of antioxidant enzyme activity and biochemical reactions quinoa under deficit irrigation and fertilizer treatments in the saline soil. *Journal of Crop Production* 13(1): 629–644.
7. Arnon, D.I., 1975. Physiological principles of dryland crop production. In: Gupta, U.S. (Ed.), Physiological Aspects of Dryland Farming. Oxford Press, pp. 3–14.
8. Askari, M., Behdani, M.A., Parsa, S., Jami Al-Ahmadi, M., Mahmoudi, S., 2018. Evaluation of yield and yield components of biomass and some physiological traits of two species of thyme (*Thymus vulgaris* and *Thymus daenensis*) under drought stress and manure application. *Environmental Stresses in Agricultural Sciences* 11(1): 47–63. (in Persian with English abstract)
9. Aslani, Z., Hassani, A., Rasooli Sadagiyani, M.H., Sefidkon, F., Barin, M., Gheibi, S.A., 2009. Effect of symbiosis with mycorrhiza fungi on some physiological characteristics of basil (*Osimum basilicum*) under drought stress. *Environmental Stresses in Agricultural Sciences* 2(2): 109–117. (in Persian with English abstract))
10. Aspinall, D., Paleg, L.G., 1981. Proline accumulation, physiological aspects. In: Leslie, G.P., Donald, A. (Eds.), Physiology and Biochemistry of Drought Resistance in Plants. Academic Press, University of California, Berkeley , pp. 205–240.
11. Bates, L.S., Walden, R.P., Teave, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205–207.
12. Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micro gram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
13. Caob, Z.H., Lib, Z.G., Cheunga, K.C., Wong, M.H., 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125: 155–166.
14. Doorenbos, J., Kassam, A.H., 1979. Yield Response to Water. FAO Irrigation and Drainage Paper No. 33. Rome: Food and Agriculture Organization.
15. Duan, B., Yang, Y., Lu, Y., Korpelainen, H., Berninger, F., Li, C., 2007. Interactions between drought stress, ABA and genotypes in *Picea asperata*. *Journal of Experimental Botany* 58: 3025–3036.
16. Farsi, M., Abdollahi, F., Salehi, A., Ghasemi, Sh., 2017. Study of physiological traits of annual marjoram in response to zinc in drought stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences* 10: 559–570. (in Persian with English abstract).
17. Fotuhi Ghazvini, R., Heydari, M., Hashempour, A., 2011. Molecular Physiology and Biology: Stress Tolerance in Plants. University Jihad Publications, University of Mashhad.
18. Hana, B., Bischofa, J.C., 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during freezing. *Cryobiology* 48: 8–21.
19. Karim zadeh asl, K.H., Baghbani Arani, A., 2019. The effect of different irrigation regimes and biofertilizers on grain yield, essential oil content, some physiological traits and uptake of minerals in cumin. *Journal of Environmental Stresses in Crop Science* 12: 817–830. (in Persian with English abstract)
20. Kheiry, A., Zarandood, M., rezaie allolo, A., Barzegar, T., Aelaei, M., 2020. Effects of nitroxin and ammonium sulfate on some of the traits of *Marrubium vulgare* L. *Plant Process and Function* 9(38): 415–426. (in Persian with English abstract)
21. Kruk, I., Aboul, E., Enein, H.Y., Michalska, T., Lichszteld, K., Kladna, A., 2005. Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Lumineseence* 20: 81–89.
22. Lata, C., Sarita, J.H., Prasad, M., Sreenivasulu, N., 2011. Differential antioxidative responses to dehydration-induced oxidative stress in core set of foxtail millet cultivars. *Protoplasma* 248: 817–828.
23. Lobell, D.B., Schlenker, W., Costa-Roberts, J., 2011. Climate trends and global crop production since 1980. *Science* 333: 616–620.
24. Mahfouz, M., El-Dakhakhany, M., 1960. The isolation of a crystalline active principle from *Nigella sativa* L. seeds. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1: 1–19.
25. Norouzpour, Gh., Rezvani Moghaddam. P., 2006. Effect of different irrigation intervals and plant density on oil yield and essential oil of *Nigella sativa*. *Research and Construction* 19(4): 133–138. (in Persian with English abstract)
26. Por Akbar, L., Khayami, M., jalil, j., 2008. The interaction of Cu and EDTA on K+ leakage and some metals content in root and shoot of of corn rootstocks. *Journal of Science (Kharazmi University)* 8(2): 121–123. (in Persian)
27. Rabiei, V., 2003. Evaluation of the Physiological and Morphological Responses of Grape Varieties under Drought Stress.. MSc Thesis, University of Tehran, Tehran, Iran. (in Persian)
28. Rajendran, K., Devaraj, P., 2004. Biomass and nutrient distribution and their return of *Casuarina equisetifolia* inoculated with biofertilizers in farm land. *Biomass and Bioenergy* 26: 235–249.
29. Razavi, B., Hosseinzadeh, H., 2014. A review of the effects of *Nigella sativa* L. and its constituent, thymoquinone, in metabolic syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation* 37(11): 1031–1040.
30. Razavizadeh, R., Shafeghat, M., Najafi, Sh., 2014. Effect of water deficit on morphological and physiological

parameters of *Carum copticum*. *Iranian Journal of Plant Biology* 22: 25–38. (in Persian with English abstract)
31. Rodriguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17: 319–339.
32. Rozek, S., Leja, M., Wojciechowska, R., 2000. Effect of differentiated nitrogen fertilization on changes of certain compounds in stored carrot roots. *Folia Horticulture* 12: 21–34.
33. Stamenkovic, C. V. Beskoski, I., Karabegovic, M., Lazic, Nikolic, N., 2018. Microbial fertilizers: A comprehensive review of current findings and future perspectives. *Spanish Journal of Agricultural Research* 16: 210–228.
34. Sun, J., Jing, Gu., Zeng, J., Han, Sh., Song, A., Chen, F., Fang, W., Jiang, J., Chen, S., 2013. Changes in leaf morphology, antioxidant activity and photosynthesis capacity in two different drought-tolerant cultivars of chrysanthemum during and after water stress. *Scientia Horticulturae* 161. P: 249–258.
35. Trovato, M., Mattioli, R., Costantino, P., 2008. Multiple role of proline in plant stress tolerance and development. *Rendiconti Licei* 19: 325–346.
36. Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571–586.
37. Wrolstad, R.E., 1976. Color and pigment analysis in fruit products. Station Bulletin 621. Agricultural Experiment Station, Oregon State University.

Effect of Biofertilizer on Physiological Traits of Black Seed (SN) Ecotypes under Water Stress Conditions

Z. Saydi[1], N.A. Abbasi[*], M.J. Zare and B. Zarei

(Received: 15 March 2021; Accepted: 7 July 2021)

Abstract

In order to investigate the effect of nitoxin biofertilizer on black seed (SN) under different levels of water stress, an experiment was conducted in the research farm of Ilam University using a split-split plot arrangement based on a randomized complete block design (RCBD) with three replications in 1398-1399. The main plots were water stress treatment at three levels including no stress, moderate and severe stress based on 100, 50 and 35% of plant water requirement. The sub-plots and sub-sub plots were biofertilizer treatments (at two levels) and four black seed ecotypes (Isfahan, Semirom, Mashhad and Neyshabour), respectively. Based on the results, the highest amounts of chlorophyll a, b and total pigments were 0.711, 0.523 and 1.235 mg g^{-1} FW from control and the highest levels of anthocyanin (14.69 µmol g^{-1} FW), catalase (0.0152 U min^{-1} g^{-1} P or units per minute per gram of protein) and proline (5.84 micromoles per gram of fresh leaves) were obtained in the severe water stress treatment. Results also showed that the highest amount of proline (0.0152 units per minute per gram of protein) and chlorophyll pigments including chlorophyll a, b and total with 0.711, 0.523 and 1.235 mg per gram of fresh leaves, respectively, were obtained in the control. The use of nitroxin biofertilizer increased the levels of anthocyanin and catalase. Among the tested ecotypes, Semirom had the highest amount of chlorophyll b pigment (0.39 mg g^{-1} of fresh leaves) and the highest amount of catalase activity (0.0087 U min^{-1} g^{-1} P). Neyshabour and Isfahan ecotypes had the highest anthocyanin content (9.21 µmol g^{-1} fresh leaf) with the highest proline concentration (4.4 µmol g^{-1} fresh leaf) and total chlorophyll a. Based on the analysis of variance of the data, the triple interaction of water stress × nitroxin × ecotype on all measured physiological traits except catalase activity and chlorophyll a pigment was statistically significant at 5% probability level. Decreased chlorophyll indicates susceptibility to drought stress and increased anthocyanin, catalase and proline indicate plant response to stress. Examining the physiological characteristics of black seed under drought stress indicated that black seed is almost sensitive to drought stress. The results showed that there was a difference between black seed ecotypes in terms of response to dehydration and biofertilizer was able to improve the plant's response to stress to some extent.

Keywords: Anthocyanin, Catalase, Chlorophyll, Proline, Microorganism.

Background and Objective: In the face of climate change, drought stress has become the most important limiting factor for crop production. Drought is imposed when the water available to the plant roots is limited or the water loss through transpiration is very high. The most important factor affecting the yield in conditions of soil moisture deficit is the reduction of PAR (photosyntheticaly active radiation) absorption,

1- Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
* Corresponding Author, Email: n.abbasi@ilam.ac.ir

which leads to a decrease in light consumption efficiency and a decrease in harvest index. On the other hand, preventing the effects of chemical mountain abuse requires the development of proper cultivation, management and planning. Biofertilizers as an alternative or as a complement to chemical fertilizers can help to ensure the sustainability of agricultural production systems.

Methods: The experiment was conducted as a split-split plot with three replicates at Ilam University experimental farm during growing season of 2019. Water treatments included a control with no stress, moderate stress and severe stress as main plots. Nitroxin fertilizer treatments including no nitroxin (control) and application of one liter nitroxin per hectare as sub-plots and plant ecotypes including Neyshabour, Mashhad, Semirom and Isfahan as sub-sub plots. Measured traits included leaf anthocyanin (4), catalase (3), chlorophyll (1), and proline (2) content.

Results: Results showed that the three-way interaction effect of water stress × nitroxin fertilizer × ecotype was highly significant for most of the studied traits excluding catalase and chlorophyll a. The highest values of chlorophyll a (0.875 mg g^{-1} fresh leaf), chlorophyll b (0.693 mg g^{-1} fresh leaf), total chlorophyll (1.384 mg g^{-1} fresh leaf) and proline (7.59 µmol g^{-1} fresh leaf) were obtained when using biofertilizer. However, the highest values of anthocyanin (21.1 µmol g^{-1} fresh leaf) and catalase (0.0279 U min^{-1} g^{-1} P) were obtained at control with no biofertilizer application. The effect of water stress on chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll was decreasing, while it was increasing for electrolyte, anthocyanin, catalase and proline leakage. This trend was intensified as the level of water stress was increased.

Conclusions: Decreased chlorophyll in the present study indicated the sensitivity of this plant to water stress. In contrast, the plant responded to water stress by increasing the content of anthocyanin, catalase and proline, which may indicates an increase in reactive oxygen species levels in the plant. The examined physiological and biochemical parameters also suggests that black seed plant is sensitive to water stress and by increasing the level of water stress from a moderate level to severe, it is seriously damaged. Therefore, the use of biofertilizers may have positive effects on reducing the amount of damage to black seed plants in stressful conditions. However, this issue needs further investigation due to its special importance.

References:

1. Arnon, D.I., 1975. Physiological principles of dryland crop production. Gupta, U.S. (Ed.), Physiological Aspects of Dryland Farming. Oxford Press, pp. 3–14.
2. Bates, L.S., Walden, R.P., Teave I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39: 205–207.
3. Sun, J., Jing, G., Zeng, J., Han, Sh., Song, A., Chen, F., Fang, W., Jiang, J., Chen, S., 2013. Changes in leaf morphology, antioxidant activity and photosynthesis capacity in two different drought-tolerant cultivars of chrysanthemum during and after water stress. *Scientia Horticulturae* 161: 249–258.
4. Weatherley, P.E., 1950. Studies in water relations of cotton plants. The field measurement of water deficit in leaves. *New Phytologist* 49: 81–87.