اثر کم آبیاری بر محتوی نسبی آب، غلظت پرولین، محتوی آنزیم‌های آنتی اکسیدان، غلظت کلروفیل و عملکرد علوفه پنج گونه شبدر (*Trifolium* spp)

چکیده

به منظور مطالعه اثر کم آبیاری بر محتوی نسبی آب، غلظت پرولین، محتوی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، غلظت کلروفیل و عملکرد علوفه ۵ گونه شبدر آزمایشی مزرعه‌ای به شکل کرت‌های خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸ انجام شد. کم آبیاری در سه سطح (۰ (عدم کم آبیاری) و کم آبیاری ۲۰ و ۴۰ درصد کمتر از نیاز آبیاری گیاه) به عنوان عامل اصلی و ۵ گونه شبدر (*Trifolium resupinatum* (شبدر ایرانی)، *T. alexandrium* (شبدر برسیم)، *T. lapaceaum*، *T. echinatum* و *T. diffusum*) به عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد با افزایش کم آبیاری تا سطح ۴۰ درصد، غلظت پرولین به میزان ۹۳ درصد و محتوی آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به ترتیب به میزان ۱۲، ۹۸ و ۸۳ درصد افزایش یافت. اما محتوی نسبی آب، عملکرد علوفه تازه و علوفه خشک به ترتیب به میزان ۲۲، ۲۴ و ۲۹ درصد کاهش پیدا کرد. بیشترین محتوی نسبی آب، غلظت کلروفیل a و b و محتوی آنزیم‌های آنتی اکسیدان بدون تفاوت معنی‌دار در دو رقم *T. resupinatum* و *T. alexandrium* مشاهده شد. بررسی اثر متقابل دو عامل (کم آبیاری × گونه) نشان داد که با افزایش کم آبیاری عملکرد علوفه تازه و خشک هر پنج گونه به طور معنی‌داری کاهش یافت. در هر سه سطح کم آبیاری بالاترین عملکرد علوفه تازه (۲۰/۳۹، ۱۸/۸۱ و۱۳/۹۴تن در هکتار) و خشک (۴/۵۹، ۴/۲۵ و ۳/۰۶ تن در هکتار) در گونه *T. resupinatum* به دست آمد به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که هر ۵ گونه دارای پایداری لازم در شرایط تنش نیستند. بنابراین به کارگیری روش کم آبیاری در مورد گونه‌های مورد مطالعه تنها در صورتی قابل توجیه خواهد بود که کاهش ۲۰ و ۴۰ درصدی در میزان آب مصرفی در مقایسه با کاهش عملکرد این محصول دارای مزیت بیشتری باشد.

واژه‌های کلیدی: *پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، علوفه تازه، علوفه خشک، کاتالاز*

مقدمه

محدودیت منابع آبی و کمبود آب در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورهای دنیا به یکی از مهم‌ترین معضلات تولید محصولات زراعی تبدیل شده است. در این بین ایران با متوسط بارندگی سالیانه ۲۴۰ میلی‌متر که معادل یک سوم میانگین نزولات سالیانه جهانی است جز مناطق خشک و نیمه خشک به شمار می‌رود. به همین دلیل ایران با محدویت جدی منابع آبی روبرو است. این در حالی است که با تغییرات اقلیمی در حال وقوع و شواهد موجود این مشکل در حال تشدید می‌باشد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۶).

یکی از مهم‌ترین راهکارهای استفاده بهینه از آب موجود در شرایط محدودیت منابع آب، روش کم آبیاری است. هدف از کم آبیاری افزایش راندمان مصرف آب و به حداکثر رساندن عملکرد به ازای هر واحد آب مصرفی است (نعمت الهی و همکاران، ۱۳۹۹; Kirnak *et al.*, 2010). با وجود این که پژوهش‌های متعددی کارآمدی این شیوه در استفاده بهینه از هر واحد آب مصرفی و افزایش سود خالص را نشان داده است، اما کم آبیاری می‌تواند از طریق ایجاد تنش خشکی رشد و نمو گیاه را تحت تاثیر قرار دهد (نادری و همکاران، ۱۳۹۶; Oneto *et al.*, 2016). تنش خشکی و پسابیدگی بافت‌های گیاهی ناشی از آن، موجب لوله‌ای شدن برگ‌ها، بسته شدن روزنه‌ها، کاهش فتوسنتز، تغییرات هورمونی مانند افزایش اسید آبسیزیک و به ویژه تنش اکسیداتیو و اثرات منفی ناشی از آن می‌شود (Miller *et al.*, 2010; Ague *et al.*, 2015).

اولین پاسخ گیاهان به تنش خشکی، بسته شدن روزنه‌ها جهت جلوگیری از اتلاف آب می‌باشد. اما بسته شدن روزنه‌ها موجب افزایش مقاومت روزنه‌ای و کاهش فتوسنتز می‌گردد. بسته شدن روزنه‌ها نتیجه کاهش محتوی نسبی آب است به همین دلیل محتوی نسبی آب به عنوان شاخص مهم در گزینش ارقام متحمل به خشکی ارزیابی می‌شود. زیرا رابطه نزدیکی بین محتوی نسبی آب برگ، پتانسیل آب گیاه، باز بودن روزنه‌ها و فتوسنتز وجود دارد (Graca *et al.*, 2010).

تنش اکسیداتیو به عنوان نوعی تنش ثانویه پس از تنش خشکی رخ می‌دهد. زیرا بسته شدن روزنه‌ها در گیاهان تحت تنش که با هدف کاهش اتلاف آب صورت می‌گیرد منجر به کاهش غلظت Co_2 در بافت مزوفیل می‌شود. در چنین شرایطی واکنش‌های بی‌نیاز از نور فتوسنتز مختل می‌شود. در نتیجه محصولات واکنش‌های نیازمند به نور که شامل ATP و NADPH است مصرف نمی‌شود. در چنین شرایطی به دلیل عدم اکسید شدن مولکول NADPH مصرف $NADP^+$ جهت دریافت الکترون کاهش می‌یابد. بنابراین مولکول اکسیژن در مسیر زنجیره انتقال الکترون به عنوان پذیرنده جانشین الکترون عمل می‌کند و به شکل‌گیری گونه‌های فعال اکسیژن مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH^-) منجر می‌شود (Bazrgar *et al*., 2023; Sairam *et al*., 2005). از دیگر اثرات تنش اکسیداتیو که در شرایط تنش خشکی رخ می‌دهد کاهش غلظت کلروفیل کل است. زیرا در این شرایط سنتز کلروفیل‌ها کاهش و تجزیه آنها افزایش می‌یابد. از آنجایی که کلروفیل اساس انجام فتوسنتز می‌باشد تنش خشکی با کاهش محتوی کلروفیل در گیاهان می‌تواند منجر به کاهش کارایی فتوسنتز شود (موسوی و همکاران، ۱۴۰۱). بنابراین بررسی تغییرات محتوی کلروفیل در گیاهان به عنوان یکی از شاخص‌های مهم وموثر در فتوسنتز و شاخص مقاومت به خشکی در گیاهان در نظر گرفته می‌شود. کاهش و یا عدم تغییر در سطح کلروفیل در طی تنش خشکی در بسیاری از گیاهان از جمله ذرت شیرین (موسوی و همکاران،۱۴۰۲) و گوجه فرنگی (Furdi et al., 2013) گزارش شده است.

گیاهان جهت خنثی کردن اثرات زیان‌آور گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه توقف فرآیند اکسایش از راهکارهای متعددی استفاده می‌کنند. یکی از این راهکارها استفاده از سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی است. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POD) و آسکوربات پراکسیداز (APX) مولکول‌هایی هستند که مانع عملکرد رادیکال‌های آزاد شده و از تخریب سلول‌ها جلوگیری می‌کنند. این مواد می‌توانند رادیکال‌های آزاد را به شکل پایدار خود تبدیل کنند و مانع اثرات مخرب آنها شوند. گزارش‌های متعددی در مورد نقش آنتی‌اکسیدان‌های مختلف در کاهش اثرات تنش‌های محیطی وجود دارد (Mousavi *et al*., 2023; Anjum *et al*., 2015; Khalig *et al*., 2015). از دیگر راهکارهای گیاهان در پاسخ به تنش‌های محیطی، تنظیم اسمزی است. طی فرآیند تنظیم اسمزی گیاهان با تجمع مواد محلول درون سلول یا اسمولیت‌های سازگار مانند قندهای محلول و اسیدهای آمینه غیر پروتئینی مانند پرولین و بتائین به حفظ تورژسانس سلول‌ها و فرآیندهای وابسته به آن و همچنین ثبات غشاهای سلولی کمک می‌کنند. از این رو تنظیم اسمزی به توسعه سلولی و رشد گیاه در شرایط تنش خشکی کمک می‌کند (Lokhande *et al*., 2010).

شبدرها از مهم‌ترین گونه‌های گیاهان علوفه‌ای تیره بقولات در مناطق سرد و معتدل هستند. از ۲۵۰ گونه متعلق به جنس شبدر (*Trifolium*) ۱۶ گونه در نظام‌های زراعی جهان کشت می‌شوند. در ایران نیز شبدرها با سطح زیر کشت حدود صد هزار هکتار، بعد از یونجه مهم‌ترین گیاهان علوفه‌ای بقولات هستند. دو گونه شبدر ایرانی و شبدر برسیم و برخی از ارقام گونه‌های شبدر لاکی و قرمز، در ایران مورد کشت قرار می‌گیرند. لذا با توجه به اهمیت شبدرها در تناوب زراعی و جایگاه آنها در تولید علوفه، تعیین نیازهای اکولوژیکی و بررسی جنبه‌های مختلف مدیریت زراعی این گیاهان ضروری به نظر می‌رسد (زمانیان و همکاران، ۱۳۹۲). به همین دلیل در این پژوهش اثرات تنش خشکی ناشی از کم آبیاری بر خصوصیات کمی و کیفی ۵ گونه شبدر مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور مطالعه اثر تنش ناشی از کم‌آبیاری بر محتوی نسبی آب، غلظت پرولین، محتوی آنزیم‌های آنتی اکسیدان، غلظت کلروفیل و عملکرد علوفه پنج گونه شبدر در مزرعه آموزشی– پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد (طول جغرافیایی "۵، ′۸، °۵۹ و عرض جغرافیایی "۱۶، ′۳۴، °۳۶) در سال زراعی ۹۹–۱۳۹۸ انجام شد.

آزمایش به صورت کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. عامل اصلی کم آبیاری در سه سطح (۰ (عدم کم آبیاری)، کم آبیاری ۲۰ و ۴۰ درصد کمتر از نیاز آبیاری گیاه) و عامل فرعی پنج گونه شبدر (*Trifolium resupinatum* (شبدر ایرانی)، *T. alexandrium* (شبدر برسیم)، *T. lapaceaum*، *T. echinatum* و *T. diffusum*) بود.

هر کرت شامل ۴ ردیف کاشت با طول ۵ متر و فاصله بین ردیف ۶۰ سانتیمتر در نظر گرفته شد. به این ترتیب ابعاد هر کرت ۵×۲/۴=۱۲ متر مربع بود. بین هر دو کرت یک ردیف کاشت نشده در نظر گرفته شد. فاصله بلوک ها (تکرارها) از یکدیگر نیز ۲ متر در نظر گرفته شد. قبل از کاشت نمونه خاک مزرعه آزمایش از عمق حدود ۳۰ سانتی‌متر تهیه گردید که نتایج تجزیه فیزیکی- شیمیایی آن در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج تجزیه خاک بافت خاک شنی- لومی و از نظر ماده آلی فقیر می‌باشد.کاشت در اوایل اردیبهشت ماه و با توجه به ریز بودن بذر شبدر با دست و در عمق حدود یک سانتی‌متری انجام شد. پس از کشت بلافاصله آبیاری صورت گرفت و جهت اطمینان از سبز شدن بذور، آبیاری سه روز بعد تکرار شد. اعمال تیمارهای کم آبیاری پس از سبز شدن و استقرار کامل گیاه صورت گرفت.

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک محل اجرای آزمایش (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر)

اسیدیته	هدایت الکتریکی (دسی سیمنز بر متر)	نیتروژن (درصد)	فسفر (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم)	ماده آلی (درصد)	شن (درصد)	سیلت (درصد)	رس (درصد)	بافت خاک
۷/۴۲	۲/۷۹	۰/۰۲۸	۳۳	۳۴۶	۰/۳	۴۰	۳۸/۹	۲۱/۱	شنی-لومی

در ابتدای آماده‌سازی زمین و قبل از کاشت مقدار ۲۰۰ کیلوگرم فسفر و ۱۰۰ کیلوگرم پتاس در هکتار بر اساس توصیه آزمایشگاه خاک به زمین اضافه شد. همچنین ۳۰ کیلوگرم کود اوره به عنوان شروع کننده تا تشکیل گره‌های تثبیت زیستی نیتروژن استفاده شد. کنترل علف‌های هرز به صورت دستی انجام شد و به دلیل نبود آفت و بیماری از سموم خاصی استفاده نشد. تعیین نیاز آبیاری گیاه با استفاده از نرم‌افزار Netwat انجام شد. اساس روش محاسباتی این نرم‌افزار استفاده از روش فائو- پنمن- مانتیث و به کارگیری داده‌های ۳۰ ساله هواشناسی مانند میانگین دمای هوا، تابش خالص، سرعت باد و همچنین جنس خاک جهت تعیین تبخیر و تعرق گیاه مرجع می‌باشد (شرقی و همکاران، ۱۳۸۹). بر این اساس نیاز خالص آبیاری شبدر در منطقه آزمایش به تفکیک هر ماه و در مجموع به میزان ۵۳۳۰ متر مکعب تعیین شد. جهت اعمال تیمارها، نیاز آبیاری در هر ماه به تعداد دورهای آبیاری تقسیم و میزان آب مصرفی در هر دور آبیاری مشخص گردید. روش آبیاری در این آزمایش، آبیاری قطره-ای با نوار تیپ با فاصله قطره چکان‌های ۳۰ سانتی‌متری بود. میزان آبیاری در هر دور با استفاده از یک کنتور حجمی محاسبه شد.

جهت اندازه‌گیری محتوی نسبی آب، پرولین، غلظت کلروفیل و استخراج عصاره آنزیمی از برگ‌های جوان بالای بوته که از دو ردیف میانی هر کرت به طور تصادفی انتخاب شده بودند نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌های انتخابی برای اندازه‌گیری متغیرها در یخ خشک (دمای ۷۸/۵- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند. و به تدریج در سنجش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند.

محتوی نسبی آب: برای اندازه‌گیری محتوی نسبی آب براساس روش (Ritchie *et al.*, 1990) تعداد ۵ نمونه از آخرین برگ توسعه یافته گیاه در هر کرت نمونه‌برداری شد. قطعات یک سانتی‌متر مربعی از برگ تهیه و وزن تازه آنها (FW) با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم تعیین شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در پتری دیش های حاوی آب مقطر در سردخانه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و وزن آماس یافته (TW) آنها اندازه‌گیری شد. سپس قطعات برگ به مدت ۴۸ ساعت در آون و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و وزن خشک (DW) آنها اندازه‌گیری شد. در نهایت محتوی آب نسبی با استفاده از رابطه زیر به دست آمد.

$$RWC(\%)= (FW-DW/TW-DW)\times 100$$

RWC : محتوی نسبی آب، FW: وزن تازه نمونه، DW: وزن خشک نمونه، TW: وزن آماس یافته نمونه

پرولین: برای استخراج و سنجش پرولین از روش (Bates *et al.*, 1973) استفاده شد. برای این منظور ۵۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک آبدار ۳ درصد کاملا" سائیده شد تا محلول همگن ایجاد شود. دو میلی‌لیتر از محلول حاصل با دو میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در یک لوله آزمایش مخلوط شدند و به مدت یک ساعت در حمام آب گرم (بن ماری) ۱۰۰ درجه قرار گرفتند. به محتویات لوله ۴ میلی‌لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت به‌هم زده شد. این عمل موجب دو فاز شدن محتویات لوله می‌شود. پس از مدت ۲۰ دقیقه جذب نوری محلول در ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومترخوانده شد و با استفاده منحنی استاندارد حاصل از غلظتهای مختلف پرولین، بر حسب میکرو گرم پرولین در گرم برگ تازه محاسبه شد.

آنزیم کاتالاز: فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش (Aebi, 1984) انجام شد. مخلوط واکنش کاتالاز شامل ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH=7)، ۱۰۰ میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن، ۱۰ میلی‌مولار و ۵۰ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود. واکنش با افزودن H_2O_2 آغاز و فعالیت آنزیم از طریق تخریب H_2O_2 به‌کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۴۰ نانومتر به‌مدت ۲ دقیقه تعیین شد. فعالیت آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی ($39.4\ Mm^{-1}cm^{-1}$) برای H_2O_2 محاسبه گردید. از بافر فسفات به‌همراه پراکسیدهیدروژن به‌عنوان بلانک (شاهد) استفاده شد.

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز به روش (Giannopolities & Ries., 1977) اندازه‌گیری شد.۳ میلی‌لیتر محلول واکنش شامل ۱۳ میلی مول متیونین، ۷۵ میکرو مول نیتروبلو تترازولیوم کلراید، ۲ میکرو مول ریبوفلاوین،۵۰ میلی‌مول بافر فسفات (PH=7/8) و صفر تا ۵۰ میکرو لیتر آنزیم استخراجی بود. واکنش با روشن کردن لامپ فلورسنت شروع شد و محلول واکنش به مدت ۱۰ دقیقه زیر دو لامپ فلورسنت ۱۵ وات با ارتفاع ۲۰ سانتیمتر با شدت نور ۱۰۰۰ لوکس قرار داده شد و میزان جذب به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر Biochrom libera-S22 در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت سوپراکسید دیسموتاز به عنوان مقدار آنزیم لازم برای۵۰ درصد ممانعت از احیاء فتوشیمیایی نیترو بلو تترازولیوم کلراید در نظر گرفته شد.

آنزیم پراکسیداز: به روش همدا و کلین (Hemeda & Kelin., 1990) انجام شد. ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر سدیم–پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (PH=6.6)، گایاکول ۱٪، پراکسید هیدروژن ۳٪ و ۶۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. فعالیت پراکسیداز بر اساس میزان اکسید شدن گایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر و با استفاده از ضریب خاموشی ε= ۲۶/۶ $mM^{-1}Cm^{-1}$ تعیین شد.

کلروفیل a و b : سنجش کلروفیل a، b و کل بر اساس روش (Arnon, 1949) بدین ترتیب که مقدار ۰/۱ گرم از بافت برگ تازه با ۱۰ میلی‌لیتر استون سرد ۸۰ درصد در داخل هاون چینی به طور کامل سائیده شد. محلول حاصل با دور پایین ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس فاز محلول از فاز جامد جدا و با استون سرد ۸۰ درصد به حجم معین ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. جذب نوری نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری با مدل Biochrom libera-S22 خوانده شد. سپس با استفاده از روابط زیر مقدار کلروفیل a، b و کل بر حسب میکروگرم در گرم محاسبه شد.

ردیف	رابطه
۱	$Chl\ a = [12.7(D663) - 2.69(D645)] \times V/(1000\times W)$
۲	$Chl\ b = [22.9(D645) - 4.68(D663)] \times V/(1000\times W)$

در هر دو رابطه، D، میزان جذب نوری خوانده شده در طول موج مربوطه، V، حجم عصاره، W، وزن نمونه تر و chl، غلظت

کلروفیل می‌باشد.

برای اندازه‌گیری عملکرد علوفه تازه و خشک، از دو ردیف میانی هر کرت پس از حذف ۰/۵ متر از ابتدا و انتهای هر ردیف جهت حذف اثرات حاشیه‌ای، برداشت از سطحی معادل ۴/۸ متر مربع انجام شد. برداشت در هر چین در ۱۰ تا ۱۵ درصد گلدهی انجام گرفت. علوفه برداشت شده در هر چین به دقت توزین و سپس عملکرد علوفه تازه تولیدی در هر هکتار محاسبه شد. برای اندازه‌گیری عملکرد علوفه خشک، از علوفه تازه برداشت شده از هر کرت و در هر چین برداشت، یک نمونه وزنی انتخاب و با قرار دادن در آون با درجه حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت و سپس توزین نمونه‌ها، عملکرد علوفه خشک در هر هکتار محاسبه گردید.

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری Mstat-c استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

محتوی نسبی آب

اثر کم آبیاری در سطح احتمال ۵ درصد و اثر گونه در سطح احتمال ۱ درصد بر محتوی نسبی آب معنی‌دار بود. اما اثر متقابل دو عامل فاقد اثر معنی‌دار بر این متغیر بود (جدول ۲).

بررسی اثر تنش حاصل از کم آبیاری بر محتوی نسبی آب گیاه نشان داد که تنها افزایش درصد کم آبیاری تا سطح ۴۰ درصد موجب کاهش معنی‌دار محتوی نسبی آب گیاه گردید. تفاوت میانگین محتوی نسبی آب گیاه در تیمارهای عدم کم آبیاری و کم آبیاری ۲۰ درصد فاقد تفاوت آماری معنی‌دار بود (جدول ۳).

تفاوت میانگین محتوی نسبی آب در بین گونه‌های مورد آزمایش نیز از نظر آماری معنی‌دار بود. بیشترین محتوی نسبی آب در دو گونه *Trifolium resupinatum* و *T. alexandrium* مشاهده شد. در این دو گونه میانگین محتوی نسبی آب فاقد تفاوت آماری معنی‌دار بود. اما تفاوت میانگین این صفت در این دو گونه با گونه‌های دیگر مورد مطالعه معنی‌دار بود (جدول ۴).

محتوی نسبی آب یکی از مهم‌ترین شاخص‌های بیلان آب در گیاه است. رابطه نزدیکی بین محتوی نسبی آب، پتانسیل آب در گیاه، باز نگه‌داشتن روزنه‌ها، فتوسنتز و در نهایت زیست توده و عملکرد وجود دارد. به همین دلیل پژوهش‌های بسیاری نشان داده است که با کاهش محتوی نسبی آب، تقسیم سلولی، رشد اندام‌های گیاه، فتوسنتز خالص و سنتز پروتئین کاهش یافته و تعادل هورمونی در گیاه تغییر می‌یابد (Akram *et al.*, 2013).

مطالعات متعددی نشان داده است که ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی محتوی نسبی آب بالاتری در شرایط تنش خشکی از خود نشان می‌دهند. تفاوت در محتوی نسبی آب گونه‌ها و ارقام می‌تواند به توانایی آنها در جذب آب از خاک یا توانایی بستن روزنه‌ها و تعرق کمتر در شرایط تنش خشکی مربوط باشد. به همین دلیل محتوی نسبی آب به عنوان یک شاخص مهم در ارزیابی گونه‌ها و ارقام مقاوم به خشکی ارزیابی شده است (Garca *et al.*, 2010).

پرولین

بر اساس نتایج تجزیه واریانس صفات، اثر بلوک،کم‌آبیاری، نوع گونه و اثر متقابل دو عامل بر محتوی پرولین در سطح احتمال آماری ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۱). معنی‌دار بودن اثر بلوک نشان داد که ماده آزمایش دارای غیر یکنواختی بوده و انتخاب طرح پایه بلوک جهت انجام آزمایش به درستی انجام شده است.

نتایج نشان داد که با افزایش میزان کم آبیاری و در نتیجه شدت تنش خشکی، میزان پرولین در تمام گونه‌های مورد آزمایش به طور معنی‌داری افزایش یافت. بیشترین محتوی پرولین در کم آبیاری ۴۰ درصد و دو گونه *Trifolium resupinatum* و *T. alexandrium* مشاهده شد که دارای تفاوت آماری معنی‌دار با میانگین پرولین در سایر تیمارها بود. کمترین محتوی پرولین نیز در تیمار عدم کم آبیاری و گونه‌های *T. lapaceaum*، *T. echinatum* و *T. diffusum* حاصل شد (جدول ۵).

ساخت اسید آمینه پرولین از اولین پاسخ‌های گیاه به اغلب تنش‌های محیطی محسوب می‌شود. نتایج این پژوهش نیز نشان داد که با افزایش میزان کم آبیاری و در نتیجه افزایش شدت تنش خشکی میزان پرولین افزایش یافت. نتایج بسیاری از پژوهش‌های مشابه این موضوع را تائید می‌کند که پرولین در تیمارهای تنش خشکی به شدت تجمع می‌یابد و میزان تجمع در تنش‌های شدید از تیمارهای متوسط و ملایم بیشتر است (Shaheen *et al*., 2011; Boussadia *et al*., 2013). (Chaum *et al*., 2010) و (Anjum *et al*., 2011) گزارش کردند که میزان تجمع پرولین در سلول‌های ذرت با افزایش شدت خشکی اعمال شده افزایش می‌یابد و این میزان در ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی بیشتر از ژنوتیپ‌های حساس است.

پرولین علاوه بر این که یک تنظیم کننده اسمزی بسیار قوی است اثرات بیولوژیک متعددی مانند غیر فعال کردن رادیکال-های آزاد، محافظت ماکرومولکول‌ها، محافظت غشای سلول و حفظ فعالیت فتوسنتزی در شرایط تنش را سبب می‌شود (Ashraf., 2010). به همین دلیل گونه‌ها و ارقامی که قادر به تولید و تجمع پرولین در سلول‌های خود در شرایط تنش هستند تحمل بهتری به شرایط تنش دارند.

آنزیم‌های آنتی اکسیدان

کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز

اثر بلوک و کم آبیاری بر محتوی هر سه آنزیم آنتی اکسیدان در سطح احتمال ۱ درصد، اثر گونه بر محتوی آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در سطح احتمال آماری ۱ درصد و بر محتوی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سطح احتمال آماری ۵ درصد معنی‌دار بود. اما اثر متقابل دو عامل فقط بر محتوی پراکسیداز در سطح احتمال آماری ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). معنی‌دار بودن اثر بلوک نشان داد که ماده آزمایش دارای غیر یکنواختی بوده و انتخاب طرح پایه بلوک جهت انجام آزمایش به درستی انجام شده است.

بررسی اثرات کم آبیاری بر محتوی آنزیم‌های آنتی اکسیدان نشان داد که با افزایش کم آبیاری و شدت تنش اعمال شده، محتوی هر سه آنزیم آنتی اکسیدان افزایش معنی‌داری یافت. تفاوت میانگین آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد بررسی در تمام سطوح کم آبیاری از نظر آماری معنی‌دار بود. بیشترین میزان در سطح کم آبیاری ۴۰ درصد و کمترین در تیمار عدم کم آبیاری مشاهده شد. در کم آبیاری ۴۰ درصد محتوی کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نسبت به تیمار عدم کم آبیاری به ترتیب در حدود ۱۸، ۵۰ و ۴۵ درصد بیشتر بود (جدول ۳).

مقایسه میانگین محتوی آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز نشان داد که محتوی این دو آنزیم در دو گونه *Trifolium resupinatum* و *T. alexandrium* به طور معنی‌داری از سه گونه دیگر مورد آزمایش بیشتر بود. اما در مورد محتوی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، کمترین میزان در گونه *T. echinatum* مشاهده شد که فقط تفاوت معنی‌داری با میزان این آنزیم در گونه-

های *Trifolium resupinatum* و *T. alexandrium* داشت. محتوی آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این گونه با دو گونه دیگر فاقد تفاوت آماری معنی‌دار بود (جدول ۳). گیاهان تحت تنش‌های محیطی جهت مقابله با تنش‌های اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن از سازوکارهای آنزیم‌های آنتی اکسیدان استفاده می‌کنند. این آنزیم‌ها در خنثی سازی و جاروب رادیکال‌های آزاد نقش دارند. به همین دلیل، در بسیاری از گونه‌های تحت تنش به خصوص در گونه‌ها و ارقام متحمل به تنش افزایش محتوی آنزیم‌های آنتی اکسیدان دیده می‌شود که با نتایج حاصل مطابقت دارد. در این زمینه (Mafakheri *et al.*, 2011) افزایش آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در گیاه نخود تحت تنش خشکی را گزارش کردند. همچنین بیوک و همکاران (۱۳۹۲) بیشترین میزان فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز را در تیمار ۴۰ درصد آبیاری بر اساس ظرفیت زراعی و تشدید تنش خشکی گزارش کردند.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات اندازه گیری شده (میانگین مربعات)

منابع تغییرات	درجه آزادی	محتوای نسبی آب	پرولین	کاتالاز	پراکسیداز	سوپر اکسید دیسموتاز	کلروفیل a	کلروفیل b	عملکرد علوفه تازه	عملکرد علوفه خشک
بلوک	۲	۱۳/۲۶ ns	۸/۷۴ **	۵۵۱۵۸/۴ **	۰/۰۱۹ **	۰/۴۷۶**	۱۴/۶ ns	۴/۳ ns	۴/۲ **	۰/۳۴۹ **
کم آبیاری (A)	۲	۷۷۲/۰۳ *	۲۹/۶۷**	۴۸۰۳/۱۱**	۰/۱۷۸**	۲/۹۷۶**	۴/۴ ns	۰/۹۸ ns	۷۰/۹**	۵/۳۴۶**
خطا (a)	۴	۶۰/۸۹	۰/۱۵	۵۴/۴۶	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۵	۱۴/۱	۴/۲۵	۰/۵۵۵	۰/۰۰۲
گونه (B)	۴	۴۱/۳۹ **	۰/۳۴۷ **	۷۸۸ **	۰/۰۰۱ **	۰/۰۴۱ *	۷/۴**	۲/۸۴**	۳۵/۰۱**	۲/۰۲۴**
A× B	۸	۲/۸۵ ns	۰/۰۴**	۵۴/۱۴ ns	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۲۵ ns	۰/۳۵ ns	۰/۰۱۶ ns	۲/۶**	۰/۰۸۶**
خطا (b)	۲۴	۲/۷۸	۰/۰۰۹	۵۲/۷۷	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۴	۰/۴۹۷	۰/۰۶۷	۰/۰۳۶	۰/۰۰۱
ضریب تغییرات (درصد)		۸/۴	۹/۱	۷/۱	۷/۲	۸/۱	۹/۸	۷/۶	۱۱/۲۶	۱۰/۲

ns غیر معنی‌دار، * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵ و ۱ درصد.

جدول ۳ – مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده در سطوح مختلف کم‌آبیاری

کم آبیاری (درصد)	محتوای نسبی آب (درصد)	پرولین ($mg.\ g^{-1}.fw$)	کاتالاز ($u.\mu g^{-1}fw$)	پراکسیداز ($u.\mu g^{-1}fw$)	سوپراکسید دیسموتاز ($u.\mu g^{-1}fw$)	عملکرد علوفه تازه (تن در هکتار)	عملکرد علوفه خشک (تن در هکتار)
۰	۷۵/۹ a	۳/۱ c	۱۵۸/۸ c	۰/۲۱۹ c	۱/۰۶ c	۱۶/۹۳ a	۳/۸۱ a
۲۰	۷۱/۱ a	۴/۴ b	۱۷۳/۲ b	۰/۲۹۵ b	۱/۳۷ b	۱۵/۷۹ a	۳/۵۶ a
۴۰	۶۱/۸ b	۶ a	۱۹۴/۴ a	۰/۴۳۴ a	۱/۹۴ a	۱۲/۷۳ b	۲/۶۸ b

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵ درصد هستند.

ویراستاری نشده

جدول ۴– مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده در گونه‌های مختلف

گونه	محتوای نسبی آب (درصد)	پرولین (mg. g^{-1}.fw)	کاتالاز (u.µg^{-1}fw)	پراکسیداز (u.µg^{-1}fw)	سوپراکسید دیسموتاز (u.µg^{-1}fw)	کلروفیل a	کلروفیل b	عملکرد علوفه تازه (تن در هکتار)	عملکرد علوفه خشک (تن در هکتار)
Trifolium resupinatum	۷۲/۳ a	۴/۷ a	۱۸۰/۹ a	۰/۳۲۸ a	۱/۵۲ a	۸/۷۹ a	۶/۲۶ a	۱۷/۷۱ a	۳/۹۷ a
T. alexandrium	۷۱/۴ a	۴/۸ a	۱۸۹/۳ a	۰/۳۳۱ a	۱/۵۳ a	۸/۶۶ a	۶/۰۸ a	۱۶/۸ b	۳/۷۳ b
T. lapaceaum	۶۸/۵ b	۴/۵ b	۱۷۱/۴ c	۰/۳۱ b	۱/۴۵ ab	۷/۳۹ b	۵/۳۱ b	۱۴/۲ c	۳/۱۸ c
T. echinatum	۶۸/۵ b	۴/۴ bc	۱۶۸/۵ c	۰/۳۰۳ c	۱/۳۶ b	۶/۹۶ b	۵/۱۵ bc	۱۳/۶ d	۲/۹۸ d
T. diffusum	۶۷/۳ b	۴/۳ c	۱۶۷/۵ c	۰/۳۰۸ c	۱/۴۲ ab	۶/۹۷ b	۵/۰۵ c	۱۳/۵ d	۲/۹ d

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵ درصد هستند.

محتوی کلروفیل a و b

اثر گونه بر محتوی کلروفیل a و b در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. کم آبیاری و اثر متقابل کم آبیاری و گونه فاقد اثر معنی‌دار آماری بر این دو صفت بود (جدول ۲).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین محتوی کلروفیل a و b در دو گونه *Trifolium resupinatum* و *T. alexandrium* مشاهده شد که دارای تفاوت آماری معنی‌دار با میانگین محتوی هر دو کلروفیل در سه گونه دیگر مورد آزمایش بود. محتوی کلروفیل a در سه گونه *T. lapaceaum* ،*T. echinatum* و *T. diffusum* فاقد تفاوت آماری معنی‌دار بود. محتوی کلروفیل b نیز در گونه *T. lapaceaum* با *T. echinatum* فاقد تفاوت آماری معنی‌دار و با گونه *T. diffusum* دارای تفاوت آماری معنی‌دار بود (جدول ۴).

در این پژوهش تنش خشکی حاصل از کم آبیاری اثر معنی‌داری بر محتوی کلروفیل a و b نداشت. این نتیجه بر خلاف نتایج بسیاری دیگر از پژوهش‌ها می‌باشد. البته نتایج تحقیقات انجام شده در مورد اثر تنش خشکی بر محتوی کلروفیل گیاهان متفاوت است. در برخی مطالعات افزایش محتوی کلروفیل و در برخی دیگر کاهش محتوی کلروفیل در اثر تنش خشکی گزارش گردیده است. (Arunyanark *et al*., 2009) افزایش قرائت‌های کلروفیل متر در اثر افزایش تنش خشکی را در بادام زمینی مشاهده کردند. (Anjum *et al*., 2003) نیز گزارش کردند که تنش خشکی باعث افزایش مقدار کلروفیل کل در جو شد. در حالی که برخی دیگر از محققان کاهش محتوی کلروفیل در شرایط تنش را گزارش کرده‌اند. در این زمینه (Mafakheri *et al*., 2010) گزارش کردند که تنش خشکی سبب کاهش کلروفیل a و b و کلروفیل کل در گیاه نخود شد. (Oneill *et al*., 2006) نیز در بررسی تاثیر تنش خشکی بر غلظت کلروفیل برگ ذرت مشاهده کردند که مقدار عدد کلروفیل متر در شرایط تنش رطوبتی به صورت معنی‌داری کمتر از رژیم آبیاری کامل بود. با وجود نتایج متفاوت کاهش در محتوی کلروفیل گیاهان تحت تنش عمومیت بیشتری دارد. بر اساس نظر (Fangmier & Schutz, 2006) و (Xiao *et al*., 2008) کاهش میزان کلروفیل‌ها در شرایط تنش خشکی مربوط به افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز و افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن در سلول است. این رادیکال‌های آزاد

سبب پراکسیداسیون و در نتیجه تجزیه این رنگیزه‌ها می‌گردند. تحت تاثیر قرار نگرفتن محتوی کلروفیل در این پژوهش می-تواند به این دلیل باشد که تنش وارده جهت تخریب رنگیزه‌ها در گونه‌های مورد مطالعه کافی نبوده است.

۵ – مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده (اثر متقابل کم‌آبیاری و تراکم)

کم آبیاری (درصد)	گونه	پرولین (mg. g^{-1}.fw)	پراکسیداز (u.µg^{-1}fw)	عملکرد علوفه (Kg/ha)	
				علوفه تازه	علوفه خشک
۰	*Trifolium resupinatum*	۳/۴ e	۰/۲۲۳ de	۲۰/۳۹ a	۴/۵۹ a
	T. alexandrium	۳/۴۹ e	۰/۲۳۳ de	۱۹/۱۳ b	۴/۲۹ b
	T. lapaceaum	۳/۱۷ f	۰/۲۰۳ e	۱۵/۵۹ d	۳/۵۲ d
	T. echinatum	۳/۰۷ f	۰/۲۰۹ e	۱۵/۱۱ e	۳/۴۱ e
	T. diffusum	۳/۰۶ f	۰/۲۲۹ cde	۱۴/۴۵ f	۳/۲۷ f
۲۰	*Trifolium resupinatum*	۴/۵۴ c	۰/۳۰۷ b	۱۸/۸۱ b	۴/۲۵ b
	T. alexandrium	۴/۵۶ c	۰/۳۰۳ b	۱۷/۸۳ c	۴/۰۲ c
	T. lapaceaum	۴/۴۸ c	۰/۳۰۳ b	۱۴/۶۳ f	۳/۳ f
	T. echinatum	۴/۴۵ c	۰/۲۸۳ bc	۱۳/۹۸ g	۳/۱۶ g
	T. diffusum	۴/۲۷ d	۰/۲۷۷ bcd	۱۳/۷۲ gh	۳/۰۸ h
۴۰	*Trifolium resupinatum*	۶/۳۲ a	۰/۴۵۳ a	۱۳/۹۴ g	۳/۰۶ h
	T. alexandrium	۶/۴۲ a	۰/۴۵۷ a	۱۳/۴۴ h	۲/۸۹ i
	T. lapaceaum	۵/۸۴ b	۰/۴۲۳ a	۱۲/۴۱ i	۲/۷۲ j
	T. echinatum	۵/۸۲ b	۰/۴۱۷ a	۱۱/۹۷ g	۲/۳۷ k
	T. diffusum	۵/۸۲ b	۰/۴۲۰ a	۱۱/۸۸ g	۲/۳۵ k

در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک فاقد تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵ درصد هستند..

عملکرد علوفه تازه و خشک

بر اساس نتایج تجزیه واریانس صفات، اثر بلوک،کم‌آبیاری، نوع گونه و اثر متقابل دو عامل بر عملکرد علوفه تازه و خشک در سطح احتمال آماری ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). معنی‌دار بودن اثر بلوک نشان داد که ماده آزمایش دارای غیر یکنواختی بوده و انتخاب طرح پایه بلوک جهت انجام آزمایش به درستی انجام شده است.

ویراستاری نشده

بررسی اثر متقابل دو عامل کم آبیاری و نوع گونه بر عملکرد علوفه تازه و خشک نشان داد که با افزایش میزان کم آبیاری عملکرد علوفه در تمام گونه‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. بالاترین میزان علوفه تازه و خشک در آبیاری کامل و گونه *T. resupinatum* حاصل شد که تفاوت آماری معنی‌دار با میانگین علوفه در سایر تیمارها داشت. در مرحله بعدی میانگین علوفه تازه و خشک در تیمار آبیاری کامل و گونه *T. alexandrium* مشاهده شد که فاقد تفاوت آماری معنی‌دار با میانگین علوفه در گونه *T. resupinatum* و کم آبیاری ۲۰ درصد بود. کم‌ترین میزان علوفه تازه و خشک نیز در دو گونه *T. echinatum* و *T. diffusum* تیمار کم آبیاری ۴۰ درصد به دست آمد. کاهش میزان علوفه تازه گونه *T. resupinatum* در تیمارهای کم آبیاری ۲۰ و ۴۰ درصد نسبت آبیاری کامل به ترتیب ۸ و ۳۲ درصد و کاهش میزان علوفه خشک این گونه به ترتیب ۷/۵ و ۴۸ درصد بود. کاهش میزان علوفه تازه در دو گونه *T. echinatum* و *T. diffusum* در تیمارهای کم آبیاری ۲۰ درصد نسبت آبیاری کامل به ترتیب ۸ و ۵ درصد و در تیمار کم آبیاری ۴۰ درصد به ترتیب این میزان کاهش ۲۱ و ۱۸ درصد بود. کاهش میزان علوفه خشک نیز در این دو گونه در کم آبیاری ۲۰ درصد نسبت به آبیاری کامل به ترتیب ۷ و ۶ درصد و در کم آبیاری ۴۰ درصد ۳۰ و ۲۸ درصد بود (جدول ۵).

مشابه نتایج حاصل، نعمت الهی و همکاران (۱۳۹۹) در بررسی اثرات کم آبیاری بر عملکرد کمی و کیفی چهار گونه شبدر گزارش کردند که افزایش درصد تخلیه رطوبت در منطقه ریشه، در تمام گونه‌ها باعث کاهش عملکرد علوفه خشک شد. بیشترین عملکرد علوفه در تیمار کم آبیاری شدید متعلق به گونه لاکی با اختلاف معنی‌دار با سایر گونه‌ها به دست آمد. معمار و نصیرزاده (۱۳۸۵) نیز کمترین وزن خشک اندام هوایی سه گونه شبدر را در تیمارهای آبیاری در ۵۰ و ۲۵ درصد ظرفیت زراعی که بالاترین سطوح تنش خشکی اعمال شده بود مشاهده کردند. کاهش عملکرد علوفه در شرایط تنش خشکی حاصل از کم آبیاری می‌تواند به علت کاهش تعداد و ارتفاع ساقه، کاهش میزان فتوسنتز در اثر عوامل روزنه‌ای و غیر روزنه‌ای و در نتیجه کاهش زیست توده تولیدی و همچنین کاهش تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و اثرات منفی ناشی از آن بر میزان رشد گیاه باشد (سادات اسیلان و حاجیلویی، ۱۳۸۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به کاهش معنی‌دار عملکرد علوفه در هر ۵ گونه، با افزایش کم آبیاری و در نتیجه افزایش تنش خشکی مشخص می‌گردد که هیچ کدام از گونه‌های مورد آزمایش دارای پایداری لازم در شرایط تنش نیستند. بنابراین در صورتی که چنین نتایجی در تکرار آزمایش حاصل شود می‌توان با اطمینان بیشتری بیان کرد که به کارگیری روش کم آبیاری در مورد گونه‌های مورد مطالعه تنها در صورتی قابل توجیه خواهد بود که کاهش ۲۰ و ۴۰ درصدی در میزان آب مصرفی دارای مزیت بیشتری در مقایسه با کاهش عملکرد علوفه شبدر باشد. در بین گونه‌های مورد آزمایش گونه *T. resupinatum* با داشتن بالاترین عملکرد علوفه تازه و خشک دارای ثبات عملکرد بالاتری در شرایط تنش اعمال شده در مقایسه با مابقی گونه‌ها بود.

منابع

بروجردنیا، مریم؛ بی همتا، محمدرضا؛ عالمی سعید، خلیل و عبدوسی، وحید (۱۳۹۵). اثر تنش خشکی بر میزان پرولین، کربوهیدرات‌های محلول، نشت الکترولیت‌ها و محتوی آب نسبی (*Phaseolus vulgaris* L.). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی. ۸(۲۹). ۲۳-۴۱.

بیوک، زهرا؛ حسن‌پور درویشی، حسین؛ مظفری، حمید و حبیبی، داوود (۱۳۹۲). بررسی اثر محلول پاشی سلنیوم بر میزان فعالیت آنزیم-های آنتی اکسیدان و مالون دی آلدئید در گیاه دارویی گشنیز (*Criandrum sativum* L.) تحت تنش خشکی. مجله پژوهش‌های به زراعی. ۵(۱): ۳۵-۴۸.

سادات اسیلان، کمال و حاجیلویی، سعید (۱۳۸۹). بررسی تاثیر تنش کم آبی بر صفات کمی و کیفی ارقام یونجه (*Medicago sativum* L.). اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی. ۲(۱): ۴۱-۵۱.

زمانیان، محمد؛ سیادت، سید عطاالله؛ فتحی، قدرت‌اله؛ چوکان، رجب؛ جعفری، علی اشرف و بخشنده، عبدالمهدی (۱۳۹۲). برآورد نیاز درجه- روز- رشد برای مراحل فنولوژیکی چهار گونه شبدر در تاریخ‌های مختلف کاشت. مجله به زراعی نهال و بذر. ۲-۲۹(۲): ۱۶۷-۱۴۹.

شرقی، طاهره؛ بری ابرقویی، حسین؛ اسدی، محمد امین و کوثری، محمدرضا. (۱۳۸۹). برآورد تبخیر و تعرق گیاه مرجع با استفاده از روش فائو-پنمن-مانتیث و پهنه‌بندی آن در استان یزد. فصلنامه علمی-پژوهشی خشک بوم. ۱(۱): ۲۵-۳۳.

محمدی، سید عبداله؛ خزاعی، حمیدرضا و نظامی. احمد (۱۳۹۶). اثر مدیریت کود سرک نیتروژن توسط کلروفیل‌متر بر عملکرد و اجزای عملکرد ذرت دانه‌ای در شرایط کم آبیاری. نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. ۱۵(۱): ۶۱-۷۳.

معمار، سعید و نصیرزاده، عبدالرضا (۱۳۸۵). اثرات فیزیولوژیکی تنش آبی بر رشد رویشی سه گونه شبدر یکساله (*Trifolium* spp). نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. ۱۴(۲): ۵۵-۶۱.

موسوی، امیر خشایار؛ داداشی، محمدرضا؛ نبوی کلات، سید محسن و خاوری خراسانی، سعید (۱۴۰۲). اثر کم آبیاری بر محتوای آنزیم‌های آنتی اکسیدان، کربوهیدرات‌های محلول، غلظت کلروفیل و عملکرد دو رقم ذرت شیرین. نشریه آبیاری و زهکشی ایران. ۳(۱۷): ۴۶۳-۴۵۳.

نادری، نادر؛ فضل اولی، رامین؛ ضیا تبار احمدی، میرخالق؛ شاه نظری، علی و خاوری خراسانی، سعید (۱۳۹۴). بررسی اثر روش‌های مختلف کم آبیاری بر عملکرد و کارآیی مصرف آب ذرت علوفه‌ای. نشریه آبیاری و زهکشی ایران. ۳(۹): ۵۲۳-۵۳۱.

نعمت الهی، داریوش؛ عیسوند، حمیدرضا؛ مدرس ثانوی، سید علی محمد؛ اکبری، ناصر و اسماعیلی، احمد (۱۳۹۹). بررسی تاثیر کم آبیاری بر عملکرد کمی و کیفی گونه‌های شبدر (*Trifolium* spp) تحت مدیریت نهاده. علوم گیاهان زراعی ایران. ۵۱(۳): ۴۷-۵۷.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods Enzymology. 105: 121–126. https://doi.org/ 10.1016/ S0076-6879(84)05016-3.

Akram, H. M., Ali, A., Sattar, A., Rehman, H.S.U., & Bibi, A. (2013). Impact of water deficit stress on various physiological and agronomic traits of three Basmati rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Journal of Animal and Plant Sciences. 23: 1415-1423.

Anjum, S. A, Tanveer, M., Hussain, S., Bao, M., Wang, L. C., Khan, I., Ullah, E., Tung, S. A., Samad, R. A., & Shahzad, B. (2015). Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation. Environmental Science and Pollution Research. 22: 17022–17030.

Anjum, S. A., Wang, L. C., Farooq, M., Hussain, M., Xue, L. L., & Zou, C. M. (2011). Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. Journal of Agronomy of Crop Science 197: 177-185.

Anjum, F., Yaseen, M., Rasool, E., Wahid, A., & Anjum, S. (2003). Water stress in barley (*Hordeum vulgar* L.) II. Effect on chemical composition and chlorophyll contents. Pakistan Journal of Agricultural Science. 40: 41-49.

Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: poly phenol oxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. Rockville. 24: 1-24

Arunyanark, A., Jogly, S., Vorasoot, N., Akassaeng, C., Kesmala, T., & Patanothi, A. 2009. Stability of Relationship between chlorophyll density and soil plant analysis development chlorophyll meter readings in peanut across different drought stress conditions. Asian Journal of Pant Sciences. 8 (2): 102-110.

Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: some recent advances. Biotechnology Advances 28: 169-183.

Bazrgar, G., Nabavi Kalat, S. M., Khavari Khorasani, S., Ghasemi, M., & Kelidari, A. R. (2023). Effect of deficit irrigation on physiological and yield characteristics in three baby corn cultivars (*Zea mays* L.). Helion. 9: https:// doi.org/ 10.1016/j. hellion. 2023 e15477.

Bates, L.S., Waldran, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water studies. Plant Soil. 39: 205-207.

Boroujerdnia, M., Bihamta, M. R., Alamisaid, Kh.& Abdossi, V. 2016. Effect of drought tension on proline content, soluble carbohydrates, electrolytes leakage and relative water content of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). 29(8): 23-41. (In Persian)

Boussadia, O., Bchir, A., Steppe, K., Van Labeke, M. C., Lemeur, R., & Braham, M. (2013). Active and passive osmotic adjustment in olive tree leaves during drought stress. European Scientific Journal. 9(24): 423-439.

Buick, Z., Hassanpour Darvishi, H., Mozafari, H., & Habibi, D. 2013. Effect of selenium foliar application on antioxidant enzymes activity and MDA in coriander (*Coriandrum sativum* L.). medicinal Plant under stress conditions. Journal of Crop Production Research. 5(1): 35-48. (In Persian)

Chaum, S., Siringam, K., Juntawong, J., & Kirdmanee, C. (2010). Water relations, pigment stabilization, photosynthetic abilities and growth improvement in salt stressed rice plants treated with exogenous potassium nitrate application. International journal of Plant Production 4: 187-198.

Furdi, F., Velicevici, G., Petolescu, G., & Popescu. S. (2013). The effect of salt stress on chlorophyll content in several Romanian tomato varieties. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology. 17(1): 636-367.

Giannopolities, C. N., & Ries, S. K. 1977. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59: 309–314.

Graça, J. P. D., Rodrigues, F. A., Farias, J. R. B., Oliveira, M. C. N. D., C.B. Hoffmann-Campoand, C. B., & Zingaretti, S. M. (2010). Physiological parameters in sugarcane cultivars submitted to water deficit. Brazilian Journal of Plant. 22(3): 189-197.

Hameed, A., Bibi, N., Akhter, J., & Iqbal, N. 2011. Differential changes in antioxidants, proteases and lipid peroxidation in flag leaves of wheat genotypes under different levels of water deficit conditions. Plant Physiology and Biochemistry. 49(2): 178-185.

Khalig, A., Aslam, F., Matloob, A., Hussain, S., Geng, M., Wahid, A., & Rehman, H. (2015). Seed priming with selenium: consequences for emergence, seedling growth, and biochemical attributes of rice. Biological Trace Element Research. 166: 236–244.

Lokhande, V. H., Nikam, T. D., & Penna, S. (2010). Biochemical, physiological and growth change in response salinity in callus cultures of *Sesuvium protulacastrum* L. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 102(1): 17-25.

Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B.,Struik, P. C., & Sohrabi, Y. (2011). Effect of drought stress and subsequent recovery on protein, carbohydrate contents, catalase and peroxidase activities in three chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars. Australian Journal of Crop Science. 5:1255–1260.

Mafakheri, A., Siosemardeh, A., Bahramnejad, B., Struik, P. C., & Sohrabi, Y. (2010). Effect of drought stress on yield, proline and chlorophyll contents in chickpea cultivars. Australian Journal of Crop Science. 4 (8): 580-585.

Memar, S., & Nasirzadeh, A. 2006. Physiological effects of water stress on three annual clover (*Trifolium* spp). Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research. 14(2): 55-61. (In Persian)

Miller, G. A. D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., & Mittler, R. O. N. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stress. Plant of Cell and Environment. 33(4): 453-467.

Mohammadi, S. A., Khazaei, H. R., & Nezami, A. 2017. Effects N management on maize grain yield and it's components under deficit irrigation. Iranian Journal of Field Crops Research. 15(1): 61-73. (In Persian)

Mousavi, A. M., Dadashi, M. R., Nabavi Kalat, S. M., & Khavari Khorasani, S. (2023). The effect of planting date and irrigation regimes on yield and chlorophyll content, osmolytes and antioxidant enzymes in sweet corn (*Zea mays* L. var Saccarata). Romanian Agricultural Research. 40: 95-140.

Mousavi, A. M., Dadashi, M. R., Nabavi Kalat, S. M., & Khavari Khorasani, S. (2023). Effect of deficit irrigation on antioxidant enzymes content, soluble carbohydrates, chlorophyll concentration and yield of tow sweet corn cultivars. Iranian journal of irrigation and Drainage. 17(3): 453-463. (In Persian)

Naderi, N., Fazl Auali, R., Ahmadi, M. Kh., Shahnazari, A., & Khavari Khorasani, S. (2015). Evaluation the effect of different methods of deficit irrigation on yield, yield components and irrigation water productivity of forage maize. Iranian Journal of Irrigation and Drainage. 9(3): 522-530. (In Persian)

Nematollahi, D., Eisvand, H. R., Modarres Sanavy, S. A. R., Akbari, N., & Ismaili, A. (2020). Effects of low irrigation on yield quantity and quality of clover species under high input management conditions. Iranian Journal of Field Crop Science. 51(3): 47-57. (In Persian)

Oneto, C. D., Otegui, M. E., Baroli, I., Benzec, A., Faccio, P., Bossio, E., Blumwald, E., & Lewi, D. (2016). Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an iso pentenyl transferase (IPT) gen driven by a stress and maturation-induced promoter. Journal of Biotechnology. 220: 66-77.

O'neill., P. Shanahan, J.F., & Schepers, J. S. (2006). Use of chlorophyll fluorescence differentiates corn hybrid response to variable water conditions.Crop Science. 46: 681-687.

Ritchie, S.W., Nguyen, H.T., & Halody, A.S. (1990). Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Science. 30: 105-111.

Sadat Asilan, K., & Hajilouei, S. 2010. Effect of water deficit stress on morphological characters of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Cultivars. Journal of Crop Ecophysiology. 2(1): 41-51. (In Persian)

Schutz, H., & Fangmier, E. (2001). Growth and yield responses of spring Wheat (*Triticum aestivum* L. cv.Minaret) to elevated Co2 and water limitation. Environmental Pollution.114:187-194.

Shaheen, M. A., Hegazi, A. A., & Hammam, I. S. A. (2011). Effect of water stress on vegetative characteristics and leaves chemical constituents of some transplants olive cultivars. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science. 11(5): 663-670.

Sharghi, T., Bari Abarghuei, H., Asadi, M. A., & Kousari, M. R. 2010. Estimation of reference evapotranspiration using FAO- Penman-Monteith method and it's zonation in Yazd province. Arid Biome. 1(1): 25-33. (In Persian)

Xiao, X., Xu, X., & Yang, F. (2008). Adaptive responses to progressive drought stress in two *Populus othayana* populations. Silva Fennica. 42(5): 705-719.

Zamanian, M., Siadat, S. A., Fathi, Gh., Chokan, R., Jafari, A. A., &. Bakhshadeh, A. 2013. Assessment of required growing degree days for phenological stages of four clover species in different planting dates. Seed and Plant Production. 29(2): 149-167. (In Persian)

ترجمه شده

Effect of Deficit Irrigation on Relative Water Content (RWC), Proline Concentration, Antioxidant Enzymes Content, Chlorophyll Concentration and Forage Yield of Five Clover Species

Abstract

In order to study the effect of deficit irrigation on RWC, proline concentration, antioxidant enzymes content, chlorophyll concentration and forage yield of five clover species a field experiment was conducted during the cropping season 2019-2020. The experimental design was split plots arranged based on randomized complete blocks design (RCBD) with three replications. Deficit irrigation at three levels (0 (Full irrigation), 20 and 40% less than the irrigation requirement) were considered as main plots and five clover species (*Trifolium resupinatum* ، *T. alexandrium* ، *T. lapaceaum* ،*T. echinatum* و *T. diffusum*) were allocated as sub plots.The results showed that with increasing of deficit irrigation to 40%, proline concentration increased by 93% and the content of antioxidant enzymes catalase, peroxidase and superoxide dismutase increased by 12, 98 and 83% respectively. However, RWC, yield of fresh and dry fodder decreased by 22, 24 and 29% respectively. The highest RWC, chlorophyll concentration and content of antioxidant enzymes were observed without significant difference in *T. resupinatum* and *T. alexandrium* species. The investigation of the effect of two factors (deficit irrigation × species) showed that, with the increase of deficit irrigation, fresh and dry forage yield of all five species decreased significantly. In all three levels of deficit irrigation, the highest yield of fresh (20.39, 18.81 and 13.94 t/h) and dry forage (4.59, 4.25 and 3.06 t/h) were obtained in *T. resupinatum* species. In general, the results showed that all 5 species do not have the required stability under stress conditions. Therefore, applying the method of deficit irrigation in the studied species it will be justified only if a 20 and 40 percent reduction in the amount of water used for this product is more beneficial than the reduction in yield.

Keywords: *Catalase*, *Dry forage*, *Fresh forage*, *Peroxidase*, *Superoxide dismutase*

ویرایش اولیه

Effect of Deficit Irrigation on Relative Water Content (RWC), Proline Concentration, Antioxidant Enzymes Content, Chlorophyll Concentration and Forage Yield of Five Clover Species

Extended Abstract

Introduction

Iran, with an average annual rainfall of 240 mm, which is equivalent to one third of the world average annual rainfall, is considered to be a dry and semi-arid region. For this reason, Iran is facing a serious limitation of water resources. One of the most important strategies for optimal use of available water in the conditions of limited water resources is the deficit irrigation method. The aim of deficit irrigation is to increase the water use efficiency and to maximize the yield per each unit of water consumption. But deficit irrigation can affect the growth and development of the plant by causing drought stress. Drought stress and the dehydration of plant tissues causes a decrease in photosynthesis, hormonal changes such as an increase in abscisic acid, and oxidative stress and it's negative effects. To reduce the effects of drought stress, plants use various mechanisms such as closing the stomata and controlling water loss, strengthening the antioxidant system to deal with the destructive effects of reactive oxygen species, and increasing compatible osmolytes to osmotic adjustment.

Considering the importance of clovers in crop rotation and their place in fodder production, it is necessary to determine the ecological needs and investigate various aspects of it's crop management. For this reason, in this study, the effects of drought stress caused by deficit irrigation on the quantitative and qualitative characteristics of 5 species of clover were studied.

Materials and Method

This research in order to study the effect of deficit irrigation on relative water content, proline concentration, antioxidant enzymes content, chlorophyll concentration and forage yield of five clover was carried out under the climatic conditions of Mashhad, during the cropping season 2019-2020.The experiment was conducted in split plots arranged based on randomized complete blocks design with three replications. Deficit irrigation at three levels (0 (Full irrigation), 20 and 40% less than the irrigation requirement) were considered as main plots and five clover species (*Trifolium resupinatum* ، *T. alexandrium* ، *T. lapaceaum* ،*T. echinatum* و *T. diffusum*) were allocated as sub plots. In each treatment, variables such as relative water content, proline content, antioxidant enzymes (Catalase, peroxidase and Superoxide dismutase) chlorophyll a and b and fresh and dry forage yield were measured.

Results and Discussion

The results showed that the effect of deficit irrigation on all traits (except chlorophyll a and b), the effect of species on all traits and the interaction effect of two factors on the content of proline, peroxidase and fresh and dry forage yield were significant. With the increase of deficit irrigation, the relative water content and fresh and dry forage yield decreased. But the content of proline and catalase, peroxidase and superoxide dismutase enzymes increased. Evaluation of interaction between two factors showed that the with the increase of low irrigation, the yield of fresh and dry forage yield decreased in all 5 species. But the highest amount of fresh and dry forage yield were obtained in all three levels of deficit irrigation in the species of *Trifolium resupinatum.*

Conclusion

In general, the results showed that all 5 species do not have the required stability under stress conditions. Therefore, applying the method of deficit irrigation in the studied species it will be justified only if a 20 and 40 percent reduction in the amount of water used for this product is more beneficial than the reduction in yield.

ویراستاری نشده