

واکنش برخی صفات فیزیولوژیک تعدادی از اکوتیپ های مهم یونجه تحت تنش محدودیت آبیاری

Physiological response of some important alfalfa ecotypes to water-limited conditions

سیدمحمدعلی مفیدیان^{۱*}، جعفر احمدی^۲، علی مقدم^۳

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه مهندسی ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران و مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. (نگارنده مسئول)
۲. استاد گروه مهندسی ژنتیک و به نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.
۳. استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران.

این پژوهش قسمتی از رساله دکتری در گروه مهندسی ژنتیک و به نژادی گیاهی دانشگاه بین المللی امام خمینی قزوین می باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۸/۱۸ - شناسانه برنمود رقمی: 10.22092/aj.2019.124487.1367

چکیده

مفیدیان، س.م.ع.، احمدی، ج.، مقدم، ع. واکنش برخی صفات فیزیولوژیک تعدادی از اکوتیپ های مهم یونجه تحت تنش محدودیت آبیاری نشریه پژوهش های کاربردی زراعی دوره ۳۲ - شماره ۰۳ - پایبند ۱۲۴ پائیز ۹۸: ۱۸-۳۹

شناسایی واکنش فیزیولوژیک اکوتیپ های یونجه می تواند به درک بهتر در انتخاب رقم مناسب در شرایط کمبود آب منجر شود. بدین منظور این آزمایش در دو محیط جداگانه، شامل محیط بدون تنش آبی و تنش قطع آب به مدت ۲۰ روز انجام شد. این پژوهش با ۱۰ اکوتیپ سردسیری و گرمسیری یونجه و در سه تکرار در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در مزرعه مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج طی سالهای ۱۳۹۵-۹۷ اجرا شد. در سال اول و دوم کمترین مقدار شاخص حساسیت به تنش به ترتیب با ۰/۳۵ و ۰/۵۱ مربوط به اکوتیپ- های گرمسیری بغدادی و بمی بود که در بین اکوتیپهای مورد بررسی بالاترین مقاومت و یا کمترین افت عملکرد در برابر بیابانی ۲۰ روزه را از نظر میانگین تولید ماده خشک نشان داد. در مجموع این پژوهش، اکوتیپ سردسیری KFA6 با پایداری غشا سلولی بالا، کمترین نشت الکترولیتها به میزان ۱۳/۷۹ درصد و کمترین مقاومت روزنه‌ای با ۲۳/۶۹ ثانیه بر سانتیمتر را داشت. همچنین اکوتیپ KFA6 بیشترین مجموع رنگیهای فتوسنتزی را با ۱/۶۲۳ میلیگرم بر گرم وزن تر برگ داشت که منجر به تولید حداکثر عملکرد ماده خشک با رطوبت ۱۳ درصد به میزان ۱۷/۴۸ تندرتهکتار و برتری ۱۴ درصدی نسبت به میانگین دو ساله عملکرد ماده خشک در بین اکوتیپها و دو محیط آبیاری کامل و قطع ۲۰ روزه آبیاری شد. نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از شاخص های فیزیولوژیک که معیاری نسبتاً آسان، ارزان و سریع است، به طور مؤثری اکوتیپ با عملکرد مطلوب انتخاب می شود.

واژه های کلیدی: دمای کانوبی، مقاومت روزنه‌ای، پایداری غشا سلول، رنگیهای فتوسنتزی و یونجه.

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: amofidian@ymail.com

مقدمه

ویژه این گیاه و ارزیابی پاسخ های فیزیولوژیک اکوتیپ های ایرانی یونجه در شرایط کمبود آب، می توان به شناسایی شاخص های کارآمد در جهت انتخاب و معرفی واریته های برتر دست یافت. برای نیل به حداکثر عملکرد، لازم است گیاهان در شرایط بهینه رشد کنند و این شرایط در بین گیاهان مختلف متفاوت است (Lawlor *et al.*, 1981). مهمترین عامل رشد گیاه و تولید محصول قابلیت دسترسی آب است که در آن واکنش های متابولیکی سلول های انجام می شود و عناصر غذایی و آسمیلات ها نیز بوسیله آب از خاک به درون گیاه و نیز در داخل گیاه جابجا می شوند (Sutcliff, 1979). مکانیسم های پاسخ گیاه به تنش کم آبی پیچیده است و شامل تنظیم کننده های رشد در سطح فیزیولوژیکی و مولکولی می شود (Bray 1993; Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki 2000; Shinozaki *et al.*, 2003). افزایش میزان نشت الکترولیت ها (Electrolyte Leakage) در اثر تنش دمایی با عدم توانایی غشا در حفظ ترکیبات درون سلولی، موجب کاهش پایداری غشا و خروج بیشتر الکترولیت ها از غشا می شود (Hana *et al.*, 2004). محتوای نسبی آب برگ (Water Content) حداکثر مقدار آبی که برگ در حالت تورم اشباع درخود نگه می دارد را نشان می دهد و بسته به گونه گیاهی مقدار نرمال آن بین ۹۸ درصد در حالت برگ اشباع تا ۴۰-۳۰ درصد در حالت برگ خشک شده است. در اغلب گونه های زراعی مقدار محتوای نسبی آب برگ در شروع پژمردگی برگ ۷۰-۶۰ درصد است (Zhang *et al.*, 2015). سبزمانی

یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.) با سطح زیر کشت حدود ۷۲۰ هزار هکتار، همواره در طول سالیان متمادی عمده ترین محصول علوفه ای بومی در ایران بوده است. از سوی دیگر کم آبی، یکی از عمده ترین عوامل محدود کننده تولید محصولات زراعی در سرتاسر جهان است و به دلیل اثرات دراز مدت گرمایش جهانی، پیش بینی می شود که دوره های خشکسالی در آینده متناوب خواهد بود (Rivero *et al.*, 2007). اثرات نامطلوب تنش خشکی روی رشد و تولید محصول آشکار است (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008). در ایران نیز شرایط تغییر اقلیم، همزمان با دیگر نقاط جهان بیش از پیش عرصه کشاورزی را دچار تنگنا نموده است. از این رو لزوم دستیابی به استراتژی های اصلاحی متناسب با شرایط موجود، اهمیت بسزایی پیدا کرده است. با توجه به چند ساله و چندچین بودن گیاه یونجه و سیستم ریشه ای قوی این گیاه، تحمل خشکی برای این محصول به راحتی امکان پذیر بوده و در شرایط فقدان آب به دوره خواب وارد می شود و فعالیت های زیستی گیاه به حداقل می رسد و پس از آبیاری مجدد با توجه به شرایط دمایی مناسب فعالیت خود را از سر می گیرد (Mc Williams, 2002). پتانسیل و پایداری عملکرد اکوتیپ های بومی ایران طی سالیان اخیر در اکثر مناطق مورد کشت یونجه ایران از لحاظ کمیت و کیفیت علوفه مورد تحقیق قرار گرفته است (Mofidian & Moghaddam, 2013; Mofidian *et al.*, 2013; Mofidian *et al.*, 2012). بنابراین با بهره گیری از قابلیت های

۵۰ تا ۶۰ درصد وزن خشک نیاز دارد. پس از استقرار، این گیاه می تواند بواسطه سیستم ریشه ای قوی در برابر کمبود آب تحمل خوبی نشان دهد (Ehsanpour *et al.*, 2005). مورفولوژی و طبیعت سیستم ریشه یونجه، نیروی مکش بالائی (۲/۷- تا ۲/۹- مگاپاسکال) برای آن فراهم ساخته که تا حدی وابستگی یونجه را به میزان رطوبت خاک کاهش داده است (Kouchaki & Nasiri-mahalati, 1994). یونجه بهترین گیاه کاندید برای قطع آبیاری در طول دوره رشد و آبیاری مجدد در زمان دسترسی به آب با کمترین اثر بر عملکرد علوفه است (Schonhorst *et al.*, 1963). در آزمایش قطع آبیاری در یونجه در آریزونا آمریکا نتایج نشان داد قطع آبیاری در تابستان از جولای تا اکتبر موجب می شود تراکم بوته از ۴۳ به ۱۶ بوته در متر مربع کاهش یابد و عملکرد نیز از ۱/۸۸ به ۰/۶۷ تن در هکتار در هر چین برداشت تقلیل یابد. گرچه عوامل زیادی مانند نوع خاک، بارندگی ها، دما، عمر یونجه و میزان دسترسی به آب زیر سطحی بر بقا و عملکرد یونجه بعد از قطع آبیاری نقش دارند (Ottman & Tickes, 2016). عدم آبیاری در یک دوره رشد یونجه در ماه جولای، باعث کاهش ۶۸ درصدی عملکرد در آن چین برداشت، نسبت به آبیاری کامل شده است و اگر عدم آبیاری به چین های بعدی تسری یابد، علوفه ای قابل برداشت نخواهد بود و پس از آبیاری مجدد کرت های واجد تنش و نرمال عملکرد علوفه یکسانی خواهند داشت و تنها کرت هایی که سه چین برداشت آبیاری نشده اند حدود ۲۰ درصد کاهش عملکرد نسبت

گیاه تحت اثر صفات مورفولوژیکی مانند ارتفاع بوته و اندازه برگ و صفات فیزیولوژیکی همانند فتوسنتز و تعرق قرار دارد و بسته شدن روزنه مکانیسم کلیدی در پاسخ گیاه به تنش خشکی است تا با کاهش تعرق و خروج آب از گیاه، اثر خنک کنندگی کانوبی از بین رود و دمای کانوبی افزایش یابد (Feher, *et al.*, 2014). یونجه در سال اول کشت در برابر کمبود رطوبت حساسیت بیشتری نشان می دهد ولی در سال دوم می تواند ۴۵ درصد از آب مورد نیاز خود را از عمق صفر تا ۶۰ سانتی متری خاک جذب نماید (Sharrat *et al.*, 1986). در تحقیقی تنش رطوبت، رشد برگ و فعالیت ویژه آنزیم نیتروژناز را تحت تأثیر قرار داد (Carter & Sheaffer, 1983). کاهش رشد برگ و افزایش رشد ریشه در اثر تنش، غالباً با بسته شدن نسبی روزنه ها همراه بوده است. این امر قبل از آن که تشدید تنش موجب بسته شدن کامل روزنه ها شود، موجب تداوم فتوسنتز می شود (Sharp & Davies, 1979). در شرایط آبیاری مطلوب، میزان تعرق چند برابر بیش از میزان جذب دی اکسید کربن است و زمانی که هدایت روزنه ای در واکنش به شرایط کمبود آب کم می شود تلفات آب بطور چشمگیری کاهش می یابد و این امر منجر به بهبود کارآئی مصرف آب می شود. یونجه یکی از گیاهان علوفه ای با تولید علوفه بالا و از مؤثرترین گیاهان جهت حفظ خاک، آب و نیتروژن است (Li *et al.*, 2002). جوانه زنی معمولاً بحرانی ترین مرحله در استقرار گیاهچه یونجه محسوب می شود و بذریونجه برای جوانه زدن به مقدار آبی معادل

جدول ۱- متوسط دمای (درجه سانتی گراد) و رطوبت نسبی (درصد) کمینه، بیشینه و متوسط در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج طی سالهای ۱۳۹۷ و ۱۳۹۶.
 Table 1. Average minimum and maximum temperature (°C) and relative humidity (%) at the research farm station of Karaj Seed and Plant Improvement Institute over the years 2017 and 2018.

ماه Month	سال ۱۳۹۷						سال ۱۳۹۶					
	2018			2017			2018			2017		
	متوسط H _m	بیشینه H _{max}	کمینه H _{min}	دمای متوسط T _m	بیشینه دما T _{min}	کمینه دما T _{max}	متوسط رطوبت H _m	بیشینه رطوبت H _{max}	کمینه رطوبت H _{min}	دمای متوسط T _m	بیشینه دما T _{min}	کمینه دما T _{max}
۱ فروردین-۳۱ فروردین March, 21- April, 20	43.2	66.2	23.8	14.4	22.0	7.4	55.0	73.1	37.0	12.8	17.8	7.8
۱ اردیبهشت-۳۱ اردیبهشت April, 21- May, 21	56.1	79.5	32.6	16.4	23.7	10.4	50.1	71.8	28.5	19.5	26.6	12.8
۱ خرداد-۳۱ خرداد May, 22- June, 21	43.5	70.1	19.0	23.3	32.1	15.3	33.3	53.8	12.8	25.3	33.0	16.4
۱ تیر-۳۱ تیر June, 22- July, 22	25.6	45.5	12.5	29.8	38.7	20.6	35.1	55.4	14.9	27.8	35.7	19.6
۱ مرداد-۳۱ مرداد July, 23- August, 22	30.7	53.8	14.6	29.2	37.7	20.9	36.1	57.1	15.2	28.4	35.9	19.9
۱ شهریور-۳۱ شهریور August, 23- September, 22	34.3	59.8	15.8	24.8	34.0	16.6	33.3	51.5	15.2	25.4	33.2	17.6

مواد و روش ها

این آزمایش در مزرعه تحقیقاتی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به مدت دو سال طی سال های ۹۷-۹۵ اجرا شده است. ارتفاع مکان آزمایش در کرج، ۱۳۲۱ متر از سطح دریا و مابین ۳۵ درجه و ۴۸ دقیقه عرض شمالی و ۵۱ درجه طول شرقی از نصف النهار گرینویچ قرار گرفته است. میزان متوسط بارندگی دراز مدت در کرج ۲۴۳ میلی متر بوده که با زمستان های سرد جزو مناطق سرد کم باران به شمار می رود. اطلاعات هواشناسی منطقه اجرا در طی دو سال آزمایش در جدول ۱ آمده است. بر اساس تجزیه نمونه خاک، بافت خاک مزرعه آزمایشی، رسی-لومی و ظرفیت رطوبت زراعی آن ۰/۲۶۳ است. در عمق ۰-۳۰ سانتی متری، pH خاک ۷/۸۷ و قلیایی، هدایت الکتریکی (EC) آن ۱/۲ دسی زیمنس بر متر،

به کرت های دارای یک چین قطع آبیاری نشان دادند (Metochis & Orphanos, 1981). شناسایی و تعیین روابط صفات فیزیولوژیک در اکوتیپ های یونجه در شرایط قطع آبیاری، هدف انجام این آزمایش بوده است. تعیین زمان تنش رطوبتی بر اساس زمان بحران کمبود آب بوده است. با توجه به آمار هواشناسی (جدول ۱) گرمترین دما در طول روز در سال ۹۶ و ۹۷ در تیرماه به ترتیب با میانگین بیشینه ۳۵/۷ و ۳۸/۷ درجه سانتی گراد بود. همچنین کمبود آب در تیرماه ماه بدلیل کشت محصولات تابستانه و رقیب با مشکل اساسی مواجه است. بدین منظور این آزمایش با قطع ۲۰ روزه آبیاری از اول تیرماه جهت بررسی پاسخ های فیزیولوژیک اکوتیپ های مهم یونجه مورد کشت در ایران در برابر کمبود آب به اجرا در آمد.

جدول ۲- خصوصیات آنالیز شیمیایی و فیزیکی نمونه خاک آزمایش

Table 2. Physio-chemical properties of soil at the research field

مقدار Value	پارامتر Parameter
36.37	درصد رطوبت اشباع Saturation percent
1.20	هدایت الکتریکی (دسی زیمنس بر متر) Electrical conductivity(ds/m)
7.87	اسیدیته خاک pH
1.26	جرم مخصوص ظاهری (گرم بر سانتیمتر مکعب) Bulk density (pb) (g.cm ⁻³)
1.12	درصد ماده آلی Organic matter percent
8.17	فسفر قابل استفاده (میلی گرم بر کیلوگرم) Available phosphorus (mg.kg ⁻¹)
228.9	پتاسیم قابل استفاده (میلی گرم بر کیلوگرم) Available potassium (mg.kg ⁻¹)
رسی-لومی Clay-loamy	بافت خاک Soil texture

و در سال دوم آزمایش از ۳۰ خرداد ۹۷ تا ۲۱ تیر ۹۷ میزان تبخیر از سطح تشتک تبخیر کلاس A مقدار ۲۹۳ میلی متر بود. برای تعیین حجم آب مصرفی با استفاده از کنتور حجمی در هر آبیاری در هر محیط، روز قبل از آبیاری نمونه برداری از خاک محیط مورد نظر انجام شد و درصد رطوبت وزنی خاک تعیین شد. حجم آب آبیاری با استفاده از معادله‌های زیر در هر آبیاری تعیین گردید (Doorenbos & Kassam, 1979). مقدار آب مصرفی با استفاده از کنتور که در ابتدای فلکه اصلی قرار داده شده بود، کنترل گردید. آبیاری نیز بصورت جوی و پشته و با استفاده از لوله‌های پلی اتیلن و شیر آلات نصب شده برای هر ردیف کاشت صورت گرفت. مقدار آب مصرفی هر کرت با استفاده از روابط زیر تعیین گردید. در معادله‌های ۱ و ۲، H نشان دهنده ارتفاع آب داخل کرت، $b\rho$ جرم مخصوص ظاهری خاک، θ_{FC} رطوبت خاک در حد ظرفیت مزرعه، θ_m رطوبت وزنی کرت مورد نظر در زمان آبیاری، D عمق توسعه ریشه، V حجم آب آبیاری در کرت و A مساحت کرت است. انتهای کرت های آزمایش بسته شد و تمام آب مصرف شده بدون روان آب در خاک نفوذ پیدا کرد.

$$1) \quad H = pb (\theta_{FC} - \theta_m) \times D$$

$$2) \quad V = H \times A$$

آبیاری به روش ثقلی طی دو سال آزمایش انجام گرفت. در آزمایش آبیاری کامل، در سال اول ۱۸ نوبت آبیاری با فواصل متوسط یک هفته و در مجموع ۱۲۰۷۸ متر مکعب در هکتار و در سال دوم ۱۵ نوبت آبیاری با مجموع

درصد ماده آلی ۱/۱۲ و درصد رطوبت اشباع ۳۶/۳۷ است. میزان پتاسیم و فسفر خاک کافی می باشد. کود اوره در ابتدای فصل زراعی سال اول به میزان ۱۲۰ کیلوگرم در هکتار به خاک افزوده شد. با توجه به خاک آهکی و pH قلیایی آن، زمینه برای کمبود عناصر میکرو فراهم می باشد (جدول ۲). مبارزه با علف های هرز تنها بصورت مکانیکی و دستی در سه نوبت در هر سال انجام گرفت.

در این پژوهش ۱۰ اکوتیپ یونجه شامل چهار اکوتیپ برتر مناطق سردسیری و چهار اکوتیپ مهم و رایج گرمسیری و دو رقم خارجی مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۳). دو آزمایش جداگانه (محیط) شامل آبیاری نرمال بر اساس شروع آبیاری بعد از ۷۰ میلیمتر تبخیر از سطح تشتک تبخیر کلاس A و آزمایش قطع آبیاری ۲۰ روزه از اول تیرماه و سپس از سرگیری آبیاری نرمال و در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه ردیف کاشت برای هر اکوتیپ به طول چهار متر و فاصله بین ردیف ۵۰ سانتیمتر با میزان مصرف بذر ۲۵ کیلوگرم در هکتار و در سه تکرار به اجرا درآمد. زمان کشت اواسط شهریور ۱۳۹۵ بود و سال اول به عنوان سال استقرار یونجه در نظر گرفته شد. در طول فصل زراعی از فروردین تا مهر ماه، در آزمایش آبیاری نرمال در هر یک از سال های اجرا ۱۸ نوبت آبیاری انجام گرفت و در آزمایش تنش آبی در هر دو سال تعداد دفعات آبیاری ۱۶ نوبت بود. در آزمایش قطع آبیاری از ۳۱ خرداد ۹۶ تا ۲۱ تیر ۹۷ میزان تبخیر از سطح تشتک تبخیر کلاس A مقدار ۲۲۰ میلی متر بود

جدول ۳- کد، نام و منشأ اکوتیپ های مورد بررسی در آزمایش

Table 3. Code, name and the origin of alfalfa ecotypes investigated in the experiment

کد	اکوتیپ	منشأ	کد	اکوتیپ	منشأ
Code	Ecotype	Origin ⁺	Code	Ecotype	Origin
G1	بنی BAMI	بوهمی - گرمسیری L-W	G6	KFA6	بوهمی - سردسیری L-C
G2	یزدی YAZDI	بوهمی - گرمسیری L-W	G7	KFA13	بوهمی - سردسیری L-C
G3	یکشهری NIKSHAHRI	بوهمی - گرمسیری L-W	G8	لاک LAKLAK	بوهمی - سردسیری L-C
G4	بهدادی BAGHDADI	بوهمی - گرمسیری L-W	G9	Mesasersa	خارجی - گرمسیری E-W
G5	KFA17	بوهمی - سردسیری L-C	G10	Diablo Verde	خارجی - سردسیری E-C

+ L: Landrace, E: Exotic, C: Cold region, W: Warm region

۹۹۸۹ مترمکعب در هکتار آب مصرف شد. در آزمایش دوم که قطع ۲۰ روزه آبیاری از اول تیرماه بود در سال اول ۱۶ نوبت آبیاری با مصرف ۱۰۱۹۲ مترمکعب در هکتار و در سال دوم اجرای آزمایش ۱۳ نوبت آبیاری با مصرف ۸۰۵۵ متر مکعب در هکتار در مجموع انجام شد.

از شاخص حساسیت به تنش (SSI) برای ارزیابی اولیه اکوتیپ های مورد بررسی نسبت به تنش قطع ۲۰ روزه آبیاری در تیرماه، استفاده شد. مقدار این شاخص از طریق رابطه زیر برآورد شد (Fischer & Maurer, 1978).

$$SSI = (1 - Y_s / Y_p) / SI$$

$$SI = 1 - (\bar{Y}_s / \bar{Y}_p)$$

در این رابطه SI، شدت تنش می باشد که در آن \bar{Y}_s و \bar{Y}_p به ترتیب میانگین عملکرد همه اکوتیپ ها به ترتیب در محیط های واجد و فاقد تنش می باشد. مقادیر پایین تر SSI بیانگر تحمل بیشتر به خشکی است، به عبارتی دیگر، هر چه مقدار YS به YP نزدیکتر باشد، مقاومت آن ژنوتیپ به خشکی بیشتر است و لذا SI آن ژنوتیپ کوچکتر است. شاخص حساسیت کوچکتر از یک، نشان دهنده مقاومت بیشتر اکوتیپ به خشکی است.

نمونه برداری برگ جهت اندازه گیری صفات فیزیولوژیک به طور یکسان از گره انتهایی ساقه انجام گرفت. زمان نمونه برداری برگ ۱۹ تیرماه در هر دو آزمایش نرمال و تنش بود که یک روز قبل از آبیاری مجدد بوده است. نوبت آبیاری آزمایش نرمال مطابق با محاسبات ذکر شده ۱۴ تیرماه بود.

اندازه گیری محتوای نسبی آب برگ (Relative Water Content) مطابق فرمول

گردد قرار داده شد و پس از سرد شدن در دمای اتاق، هدایت الکتریکی هر محلول در لوله آزمایش (EC_2) اندازه گیری شد و نفوذپذیری نسبی غشاء سلول از طریق رابطه زیر محاسبه شد. رابطه نفوذپذیری غشاء و پایداری غشاء سلول بصورت معکوس است.

$$\frac{(EC_1 - EC_0)}{(EC_2 - EC_0)} \times 100 = \text{نفوذپذیری نسبی غشاء سلول (درصد)}$$

شاخص کلروفیل برگ (Chlorophyll Content Index) با استفاده از دستگاه کلروفیل متر مدل Opti-Sciences CCM-200 انجام شد. بدین صورت سه بوته بطور تصادفی انتخاب و عدد کلروفیل متر در برگ گره انتهایی در شرایط تنش و عدم تنش رطوبتی قرائت شد و میانگین این اعداد بعنوان میزان کلروفیل برگ در هر کرت در نظر گرفته شد (Lawlor, 2002). مقاومت روزنه‌ای (Stomatal Resistance) برگ با استفاده از دستگاه پرومتر مدل DELTA-DEVICES در نوزدهمین روز قطع آبیاری (۱۹ تیر ماه) در هر دو آزمایش برآورد شد. بدین ترتیب، در ساعات ۱۱ تا ۱۳ پس از عمود شدن نور خورشید، کالیبراسیون دستگاه در محیط تنش و نرمال با استفاده از صفحه کالیبراسیون برای شش قطر متفاوت روزنه صورت گرفت سپس اعداد بدست آمده از برگ یونجه در سه بوته با استفاده از دستگاه پرومتر و اعداد حاصل از صفحه کالیبراسیون در معادله خط رگرسیون قرار گرفت و مقاومت روزنه‌ای بر حسب سانتیمتر بر ثانیه تخمین زده شد (Lawlor, 2002).

کاهش دمای کانوپی (Canopy Temperature)

زیر تعیین شد (Ritchie *et al.*, 1990). پس از نمونه برداری از برگ تمامی تیمارهای آزمایشی، وزن تر آنها با ترازوی دقیق اندازه گیری شد (FW). سپس تمامی نمونه‌ها در آب مقطر قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت بعد از ۲۴ ساعت وزن اشباع برگ‌ها اندازه گیری شد (SW). سپس برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در آون قرار گرفتند و وزن خشک هر کدام اندازه گیری گردید (DW).

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

پایداری غشاء سلول (Cell Membrane Stability) از طریق سنجش نشت الکترولیتی (Electrolyte Leakage) برگ‌ها در محیط تنش خشکی میزان پایداری غشاء سلولی و تحمل سایر فرآیندهای گیاهی به تنش را از جمله فتوسنتز را نشان می‌دهد و می‌تواند به عنوان شاخصی از تحمل به تنش راهگشای محققین برای درک بهتر تحمل یا حساسیت ژنوتیپ‌ها نسبت به تنش باشد. نشت الکترولیت توسط دستگاه تعیین هدایت الکتریکی (EC Meter) سنجش شد (Zhao *et al.*, 1992). به این منظور مقدار ۰/۵ گرم بافت تازه برگ از هر کرت را در لوله آزمایش حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر ۲ بار تقطیر قرار داده شد و هدایت الکتریکی EC_0 در هر لوله اندازه گیری شد. سپس نمونه‌ها در سردخانه با دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و هدایت الکتریکی هر محلول در لوله آزمایش (EC_1) اندازه گیری شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه اتوکلاو با فشار ۲ بار و دمای ۱۳۴ درجه سانتی

حسب گرم، حجم محلول بر حسب میلی لیتر و میزان جذب بر اساس عدد خوانده شده در طول موج مشخص توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر است.

برای اندازه گیری عملکرد ماده خشک، ابتدا علوفه تر یونجه در زمان ۱۰ درصد گلدهی بوته ها در هر کرت (۶ مترمربع) برداشت و بلافاصله توزین شد و سپس با قرار دادن نمونه در آون در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت، عملکرد ماده خشک و درصد رطوبت اندازه گیری گردید و در نهایت عملکرد ماده خشک با رطوبت استاندارد ۱۳ درصد محاسبه شد.

تجزیه واریانس داده های فیزیولوژیک و مقایسه میانگین صفات حاصل از آزمایش به روش توکی (HSD) و با استفاده از نرم افزارهای EXCEL 2016 و SPSSv.22 انجام و سپس تفسیر قرار گرفت.

نتایج و بحث

پس از اندازه گیری عملکرد علوفه تر چین های برداشت علوفه در هر سال و هر محیط، مجموع سالیانه عملکرد علوفه اکوتیپ ها در شرایط آبیاری کامل و قطع آبیاری به مدت ۲۰ روز تعیین شد و سپس شاخص حساسیت به تنش (SSI) برای هر اکوتیپ محاسبه گردید (جدول ۴). همانطور که مشاهده می شود در سال دوم، عملکرد علوفه تر اکوتیپ ها در شرایط کم آبی به مراتب کمتر از سال اول است که با توجه به میزان تبخیر در مدت قطع آبیاری ۲۰ روزه در سال دوم (۲۹۳ میلی متر) نسبت به دوره مشابه سال اول (۲۲۰ میلی متر) قابل تصور و توجیه پذیر است. شاخص حساسیت به تنش کمتر

با دماسنج مادون قرمز لیزری مدل TM_958 در سه بوته متوالی تخمین زده شد و کاهش دمای کانوبی از تفاضل دمای محیط و میانگین این اعداد بدست آمد (Hirayama et al., 2006).

رنگیزه های فتوسنتزی و کاروتنوئیدهای برگ طبق روش زیر اندازه گیری شد (Arnon, 1967). پس از استخراج به روش شیمیائی میزان جذب نوری آن با استفاده از اسپکتروفوتومتر مدل PG T70+UV/VIS خوانده شد. بدین منظور مقدار نیم گرم از ماده تر گیاهی با استفاده از نیتروژن مایع خرد شد و ۲۰ میلی لیتر استن ۸۰٪ به نمونه اضافه و سپس در دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. عصاره جدا شده فوقانی حاصل از سانتریفیوژ به بالن شیشه ای منتقل گردید. مقداری از نمونه داخل بالن سپس به طور جداگانه در طول موج های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل a، و ۶۴۵ نانومتر برای کلروفیل b و ۴۷۰ برای کارتنوئیدها توسط اسپکتروفوتومتر مقدار جذب را قرائت شد. در نهایت با استفاده از فرمول های زیر میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئیدها بر حسب میلی گرم بر گرم وزن تر نمونه به دست آمد.

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 \times A_{663} - 0.86 \times A_{645}) V / 100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 \times A_{645} - 3.6 \times A_{663}) V / 100W$$

$$\text{Carotenoids} = 100(A_{470}) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b}) / 227$$

که در آن W، V و A به ترتیب وزن تر بر

جدول ۴- میانگین عملکرد ماده خشک اکوتیپ‌های یونجه مورد آزمایش و شاخص حساسیت به تنش (عدم آبیاری به مدت ۲۰ روز) طی سال‌های ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷.

اکوتیپ Ecotype	سال ۱۳۹۶				سال ۱۳۹۷			
	عملکرد ماده خشک (تن در هکتار)		عملکرد ماده خشک (تن در هکتار)		عملکرد ماده خشک (تن در هکتار)		عملکرد ماده خشک (تن در هکتار)	
	آبیاری کامل Full irrigation	قطع ۲۰ روزه آبیاری No-watering for 20 days	آبیاری کامل Full irrigation	قطع ۲۰ روزه آبیاری No-watering for 20 days	آبیاری کامل Full irrigation	قطع ۲۰ روزه آبیاری No-watering for 20 days	آبیاری کامل Full irrigation	قطع ۲۰ روزه آبیاری No-watering for 20 days
بمی	16.17	15.35	0.51	14.11	12.59	0.51		
BAMI	16.17	15.35	0.51	14.11	12.59	0.51		
یزدی	19.32	16.93	1.23	18.59	14.20	1.12		
YAZDI	19.32	16.93	1.23	18.59	14.20	1.12		
نیکشهری	15.64	13.97	1.06	13.59	12.00	0.56		
نیکشهری بنیادی	15.64	13.97	1.06	13.59	12.00	0.56		
NIKSHAHRI	15.64	13.97	1.06	13.59	12.00	0.56		
BAGHDADI	17.67	17.04	0.35	14.70	12.60	0.68		
KFA17	19.10	18.14	0.50	14.00	10.85	1.07		
KFA6	21.38	19.39	0.92	16.03	13.10	0.87		
KFA13	18.85	16.42	1.28	15.92	11.86	1.21		
لکی لکی	20.51	17.61	1.41	14.11	11.29	0.95		
LAKLAK	20.51	17.61	1.41	14.11	11.29	0.95		
Mesasersa	18.08	15.59	1.37	16.87	11.44	1.53		
Diablo Verde	15.37	13.25	1.37	12.16	8.60	1.39		

۱) شاخص حساسیت به تنش

1. Stress Susceptibility Index

برای عملکرد ماده خشک در سطح پنج درصد معنی دار است و به عبارت دیگر دو محیط آبیاری کامل و قطع آبیاری به مدت ۲۰ روز تفاوت کاملاً معنی داری بر محصول نشان می دهند. همچنین اکوتیپ های مورد بررسی از نظر محتوای کلروفیل برگ، کاهش دمای کانوپی، میزان مقاومت روزنه ای، مقدار کلروفیل a، کاروتنوئیدها و عملکرد ماده خشک در سطح احتمال یک درصد و از نظر محتوای آب نسبی برگ در سطح پنج درصد با هم تفاوت معنی دار دارند. این اکوتیپ ها تنها از نظر صفت فیزیولوژیک میزان نشت الکترولیت ها تفاوت معنی دار با هم نداشتند. این امر نشان دهنده آن است صفات فیزیولوژیک در شرایط تنش کم آبی می تواند شاخص مناسبی در تفکیک اکوتیپ های یونجه باشد. اثر متقابل اکوتیپ در محیط برای اکثر صفات فیزیولوژیک مورد بررسی و عملکرد علوفه خشک غیر معنی دار شد و تنها مقدار کاروتنوئیدها برای این اثر متقابل در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. اثر سال برای بیشتر صفات فیزیولوژیک غیر معنی دار بود و تنها مقدار کلروفیل b، کاروتنوئیدها و عملکرد ماده خشک به ترتیب در سطح احتمال

نشانگر تحمل بیشتر تنش است. بر این اساس با توجه به پتانسیل عملکرد ماده خشک و سطح تنش قطع ۲۰ روزه آبیاری، در سال اول اکوتیپ های بغدادی، KFA17 و بمی اکوتیپ های مقاوم به تنش و اکوتیپ های لک لک، Diabloverde و Mesasersa حساس بودند. در سال دوم اجرای آزمایش اکوتیپ های بمی، نیکشهری و بغدادی مقاوم و اکوتیپ های Mesasersa و Diabloverde حساس به تنش بودند. رابطه بین عملکرد علوفه در شرایط بدون تنش و شاخص حساسیت به تنش، در هر دو سال آزمایش مثبت و غیر معنی دار بود (جدول ۵).

در تحقیقی اشاره شد پتانسیل عملکرد و حساسیت به تنش مستقل از هم هستند، هرچند تفاوت هایی در ارتباط با رابطه بین پتانسیل عملکرد و شاخص حساسیت به تنش وجود دارد که مربوط به استفاده از ژنوتیپ های مختلف و سطوح متفاوت تنش است (Ehdaei *et al.*, 1988).

تجزیه واریانس مرکب داده های فیزیولوژیک نتایج نشان داد (جدول ۶) اثر محیط (رژیم آبیاری) برای تمامی صفات فیزیولوژیک مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد و

جدول ۵- همبستگی بین عملکرد ماده خشک در شرایط بدون تنش (پتانسیل عملکرد) و شاخص حساسیت به تنش

Table 5. Relationship between dry matter yield under no stress condition and stress susceptibility index

	عملکرد ماده خشک در شرایط بدون تنش	
	Dry matter yield under no stress condition	
شاخص حساسیت به تنش	سال ۱۳۹۶	سال ۱۳۹۷
	2017	2018
SSI	0.106 ^{ns}	0.263 ^{ns}

ns: ضریب همبستگی پیرسون معنی دار نیست.

ns: Pearson correlation coefficient with non-significant difference.

صفت شاخص کلروفیل برگ و مقدار کلروفیل a در سطح احتمال پنج درصد معنی دار شد. این امر نشان دهنده آن است که اکوتیپ ها در مجموع دو محیط در دو سال آزمایش رفتار متفاوتی از نظر صفات فیزیولوژیکی و عملکرد از خود نشان می دهند.

پنج و یک درصد معنی دار شدند. همچنین تفاوت معنی داری برای اثر سال در محیط در تمامی نه صفت مورد پژوهش مشاهده نگردید. این در حالی است که اثر متقابل سال در اکوتیپ برای صفات محتوای آب نسبی برگ، مقدار کاهش دمای کانوپی، مقاومت روزنه ای و عملکرد ماده خشک در سطح احتمال یک درصد و برای دو

جدول ۶ - تجزیه واریانس مرکب عملکرد و صفات فیزیولوژیکی اکوتیپ های یونجه طی دو سال آزمایش (۹۷-۱۳۹۶).

Table 6. Combined analysis of variance for yield and physiological traits over the two years of the experiment (2017-18).

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی D.F.	میانگین مربعات Mean Squares					رنگیزه های فتوسنتزی Photosynthetic pigments			عملکرد ماده خشک (تن در هکتار) Dry matter yield (t/h)
		محتوای نسبی آب برگ RWC	نشت الکترولیت ها E. L.	شاخص کلروفیل برگ CCI	کاهش دمای کانوپی CTD	مقاومت روزنه ای SR	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b	کاروتنوئیدها Carotenoids	
محیط Environment	1	13484.2**	10448.1**	8048.8**	19.67**	7288.7**	4.027**	0.980**	0.101**	294.48*
تکرار (محیط) Rep (Env.)	4	539.79	310.54	42.37	0.56	25.68	0.003	0.009	0.003	37.90
اکوتیپ Ecotype	9	174.02*	45.77 n.s.	187.98**	1.38**	228.43**	0.040**	0.016 n.s.	0.001**	27.74**
اکوتیپ × محیط Env × Eco.	9	103.94 n.s.	26.30 n.s.	24.65 n.s.	0.10 n.s.	61.31 n.s.	0.010 n.s.	0.007 n.s.	0.001**	2.92 n.s.
تکرار (اکوتیپ × محیط) Eco. × Rep (Env.)	36	81.82	37.50	62.45	0.23	56.14	0.009	0.013	0.000	3.26
سال Year	1	678.15 n.s.	709.36 n.s.	120.36 n.s.	0.57 n.s.	937.27 n.s.	0.023 n.s.	0.079*	0.055**	452.80**
سال × محیط Year × Env.	1	2.13 n.s.	697.16 n.s.	2.22 n.s.	0.64 n.s.	183.64 n.s.	0.019 n.s.	0.019 n.s.	0.000 n.s.	14.56 n.s.
سال × تکرار (محیط) Year × Rep (Env.)	4	187.98	111.60	132.70	0.43	287.15	0.028	0.009	0.002	7.92
سال × اکوتیپ Year × Eco.	9	162.65**	36.68 n.s.	207.70*	1.02**	134.66**	0.019*	0.015 n.s.	0.000 n.s.	9.00**
سال × محیط × اکوتیپ Year × Env. × Eco.	9	37.46 n.s.	19.58 n.s.	68.29 n.s.	0.09 n.s.	87.52**	0.012 n.s.	0.008 n.s.	0.001**	0.77 n.s.
خطا Error	36	46.38	42.13	75.63	0.219	29.98	0.009	0.023	0.000	1.04
ضریب تغییرات C.V.		17.04	27.22	26.00	30.31	21.25	12.23	25.83	13.36	24.9

*، ** و n.s. به ترتیب اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪، ۱٪ و عدم اختلاف معنی دار

*, ** and ns. are significant at 0.05, 0.01 probability levels and non-significant, respectively.

آبی ۱/۰۶ درجه سانتی گراد بود که کاهش ۴۳ درصدی در کم کردن دمای کانوپی در شرایط تنش آبی داده نشان داده است. در شرایط فراهم بودن آب برای یونجه کمترین مقاومت روزانه ای وجود داشت که ۲۲/۲۲ ثانیه بر سانتی متر بود و مقدار مقاومت روزانه ای در شرایط کم آبی ۲۰ روزه ۳۷/۸۷ ثانیه بر سانتی متر بوده است و مقدار مقاومت روزانه برگ ۷۰ درصد افزایش یافته است. در شرایط کم آبی مکانیسم های مختلف باعث بسته شدن روزنه ها می شود و در این شرایط گیاه می خواهد با بسته شدن روزنه های خود به حفظ رطوبت و جلوگیری از اتلاف آب کمک کند ولی افزایش دمای کانوپی در اثر کاهش تعرق و کاهش تثبیت دی اکسید کربن، پی آمد این واکنش خواهد بود (Hirayama *et al.*, 2006). بررسی میزان رنگیزه های فتوسنتزی نشان داد میزان کلروفیل a در حالت بدون تنش ۱/۶۱ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ و در شرایط کم آبی ۰/۷۹۳ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ بوده است. کاهش ۵۱ درصدی را از این نظر نشان داده است. تنش کم آبی باعث شکسته شدن کلروپلاست و کاهش میزان کلروفیل و ناپایداری کمپلکس کلروفیل با پروتئین می شود و تشکیل پلاستید های جدید کلروفیل a کاهش می یابد و تغییر در کلروفیل a به دلیل تغییر در سیستم های فتوسنتزی در شرایط تنش خشکی اتفاق می افتد (Kulshreshtha *et al.*, 1987). میزان کلروفیل b در شرایط بدون تنش آبی ۰/۴۲۳ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ و در شرایط کم آبی ۰/۲۴۹ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ بوده است و

مقایسه میانگین اکوتیپ ها نشان داد (جدول ۷) محتوای آب نسبی برگ در محیط آبیاری کامل ۶۶/۲۶ درصد و در محیط قطع آبیاری ۴۴/۰۶ درصد بود که به آن معنی است تنش کم آبی موجب کاهش ۳۲ درصدی محتوای آب نسبی در مجموع آزمایش شده است. محتوای نسبی آب برگ بالاتر به معنای توانایی برگ در حفظ مقادیر بیشتر آب از طریق تنظیم اسمزی و یا توانایی ریشه در جذب آب است (Schonfeld *et al.*, 1988). پایداری غشا سلول با مقدار نشت الکترولیت ها و نفوذپذیری غشا رابطه عکس دارد. مقدار نشت الکترولیت ها در محیط آبیاری کامل ۷/۸۵ درصد و در محیط کم آبیاری ۲۶/۵۱ درصد بود که افزایش نفوذپذیری و یا کاهش پایداری غشا سلول به میزان ۷۲ درصد را در شرایط تنش آبی ۲۰ روزه نشان می دهد. به نظر می رسد که پایداری غشا سلول در شرایط تنش با سنتز پروتئین ها و قابلیت های سیستم فتوسنتزی در ارتباط باشد. در آزمایشی گزارش شد که تنش خشکی باعث تخریب غشا سلولی و افزایش نفوذپذیری یون ها در اثر افزایش حلالیت و پراکسیداز چربی های غشا سلول می شود (Saneoka *et al.*, 2004). شاخص کلروفیل برگ در محیط آبیاری کامل با ۴۲/۵۸ درصد و مقدار محتوای کلروفیل برگ در محیط کم آبیاری با ۲۶/۲۰ درصد بود که در شرایط تنش آبی مقدار کلروفیل برگ با توجه به این شاخص کاهش ۳۸ درصدی داشته است. کاهش دمای کانوپی در شرایط کم آبی کاهش یافت به طوری که در شرایط آبیاری کامل کاهش دمای کانوپی ۱/۸۷ درجه سانتی گراد و در محیط کم

جدول ۷- میانگین عملکرد و صفات فیزیولوژیکی اکوتیپ‌های یونجه مورد بررسی طی دو سال و در دو محیط آبیاری کامل و قطع آبیاری (۲۰ روزه).

Table 7. Mean comparisons for yield and physiological traits of alfalfa ecotypes over the two years under full irrigation and no-watering for 20 days

محیط	محتوای نسبی آب برگ (درصد) RWC (%)	نشت الکترولیت‌ها (درصد) E. L. (%)	شاخص کلروفیل برگ (درصد) CCI (%)	کاهش دمای کانومی (درجه سانتی گراد) CTD (°C)	مقاومت روزانه‌ی ثانیه بر سانتی متر SR (S/cm)	رنگیزه‌های فتوسنتزی (میلی گرم بر گرم وزن تر) Photosynthetic pigments (mg/g F.W)			عملکرد ماده خشک (تن در هکتار) Dry matter yield (t/h)
						کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b	کاروتنوئیدها Carotenoids	
Environment									
آبیاری کامل	65.26	7.85	42.58	1.87	22.22	1.160	0.430	0.210	16.61
Full irrigation									
قطع ۲۰ روزه آبیاری	44.06	26.51	26.20	1.06	37.81	0.793	0.249	0.152	14.12
No-watering for 20 days									
سال									
Year									
۱۳۹۶	57.04	19.61	35.39	1.40	27.22	0.962	0.314	0.160	17.31
2017									
۱۳۹۷	52.28	14.75	33.39	1.53	32.81	0.990	0.365	0.202	13.43
2018									
اکوتیپ									
Ecotype									
بمی	53.43	16.08 ^a	30.13	1.10	33.61	0.952	0.323 ^a	0.187	14.56
BAMI									
یزدی	55.30	17.95 ^a	37.29	1.71	25.59	1.053	0.362 ^a	0.186	17.26
YAZDI									
نیکشهری	50.10	20.35 ^a	30.58	1.01	34.71	0.903	0.326 ^a	0.174	13.80
NIKSHAHRI									
بغدادی	53.85	16.44 ^a	36.62	1.57	31.88	0.984	0.292 ^a	0.179	15.63
BAGHDADI									
KFA17	60.16	17.30 ^a	32.63	1.59	28.37	0.993	0.358 ^a	0.182	15.52
KFA6	54.95	13.79 ^a	39.93	1.98	23.69	1.037	0.407 ^a	0.179	17.48
KFA13	58.02	19.23 ^a	35.94	1.86	30.27	1.011	0.379 ^a	0.185	15.76
لک لک	55.35	15.97 ^a	38.18	1.51	25.96	1.001	0.334 ^a	0.184	15.88
LAKLAK									
Mesasersa	58.11	15.81 ^a	34.87	1.24	28.80	0.967	0.312 ^a	0.190	15.49
Diablo Verde	47.37	18.87 ^a	27.75	1.08	37.26	0.864	0.300 ^a	0.164	12.35

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون، بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ با هم تفاوت معنی دار ندارند

Based on Tukey test, means with similar letters have a significant difference at 5% probability level.

با ۱/۹۸ درجه سانتی گراد در اکوتیپ KFA6 و کمترین در اکوتیپ نیکشهری با ۱/۰۱ درجه سانتی گراد مشاهده گردید. دامنه تغییرکاهش دمای کانوپی بین اکوتیپ ها ۴۹ درصد بوده است. میزان مقاومت روزنه ای با مقدار هدایت روزنه رابطه عکس دارد. در بین اکوتیپ ها رقم Diabloverde با ۳۷/۲۶ ثانیه بر سانتی متر بیشترین مقاومت روزنه ای را داشت که مرتبط با عملکرد پایین این رقم است در حالی که اکوتیپ KFA6 با ۲۳/۶۹ ثانیه بر سانتی متر کمترین مقاومت روزنه ای را در مجموع آزمایش داشته است. بالاترین عملکرد علوفه تر در کل آزمایش نیز با ۴۸/۵۷ تن در هکتار متعلق به این اکوتیپ بوده و در تایید روابط فیزیولوژیک می باشد. برای عملکرد مطلوب در شرایط تنش گیاه باید روزنه ها را باز نگه دارد تا آب و مواد غذایی را بهتر از خاک دریافت کند (Verona & Calcagno, 1991). بررسی رنگیزه های فتوسنتزی a و b و کاروتنوئید هادر بین اکوتیپ ها نشان داد از لحاظ مقدار کلروفیل a اکوتیپ یزدی و KFA6 به ترتیب با ۱/۰۵۳ و ۱/۰۳۷ بیشترین مقدار و رقم Diabloverde با ۰/۸۶۴ میلی گرم بر گرم کمترین مقدار را داشته است. اکوتیپ KFA6 و رقم Diabloverde با ۰/۴۰۷ و ۰/۲۴۹ میلی گرم بر گرم به ترتیب بالاترین و کمترین مقدار کلروفیل b را داشتند و از نظر میزان کارتنوئید های استخراج شده از نمونه بافت تازه برگ رقم Diabloverde و Mesasersa بیشترین و کمترین مقادیر کاروتنوئید برگ را به ترتیب با ۰/۲۱۰ و ۰/۱۵۲ میلی گرم بر گرم دارا بودند. در مجموع بالاترین عملکرد ماده خشک در اکوتیپ

به میزان ۴۱ درصد در شرایط کم آبی کاهش در میزان کلروفیل مشاهده شده است. مقدار کاروتنوئید ها نیز به طور مشابه در محیط آبیاری کامل با متوسط ۰/۲۱۰ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ بیشتر از مقدار آن با ۰/۱۵۲ میلی گرم بر گرم در شرایط تنش آبی بود. کاروتنوئید ها با کاهش مقدار پراکسیداسیون چربی ها و کاهش میزان پراکسید هیدروژن موجب حفاظت بیشتر از غشا سلول و رنگیزه های فتوسنتزی شده و از کاتابولیسم کلروفیل جلوگیری می کنند (Costa *et al.*, 2005). قطع ۲۰ روزه آبیاری باعث کاهش ۱۵ درصدی عملکرد ماده خشک یونجه از ۱۶/۶۱ به ۱۴/۱۲ تن در هکتار شده است.

میانگین صفات فیزیولوژیکی اکوتیپ ها نشان داد محتوای آب نسبی برگ در اکوتیپ KFA17 با ۶۰/۱۶ درصد و در رقم Diabloverde با ۴۷/۳۷ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار در طی دو سال و دو محیط بوده است که نشان دهنده ۲۶ درصد نوسان بین بیشترین و کمترین مقدار محتوای آب نسبی برگ در بین اکوتیپ ها است. کمترین میزان نشت الکترولیت ها در کل آزمایش در اکوتیپ KFA6 با ۱۳/۷۹ درصد و بیشترین میزان در اکوتیپ نیکشهری با ۲۰/۳۵ درصد مشاهده شد که اکوتیپ ها از این نظر دامنه تفاوت ۳۲ درصدی داشته اند. مقدار شاخص کلروفیل برگ در اکوتیپ KFA6 با ۳۹/۹۳ درصد بیشترین و در رقم Diabloverde با ۲۷/۷۵ درصد کمترین بوده است که نوسان ۳۰ درصدی بین اکوتیپ ها از نظر محتوای کلروفیل برگ طی دو سال و در مجموع دو آزمایش نشان داده شده است. بیشترین کاهش دمای کانوپی

جدول ۸- ضرایب همبستگی بین صفات فیزیولوژیک و عملکرد ماده خشک اکوتیپ‌های یونجه در شرایط آبیاری کامل و قطع آبیاری ۲۰ روزه در طول دو سال ۹۷-۱۳۹۶.
 Table 8. Correlation coefficients between physiological traits and dry matter yield in alfalfa ecotypes under full irrigation and no-watering for 20 days over the two years (2017-18).

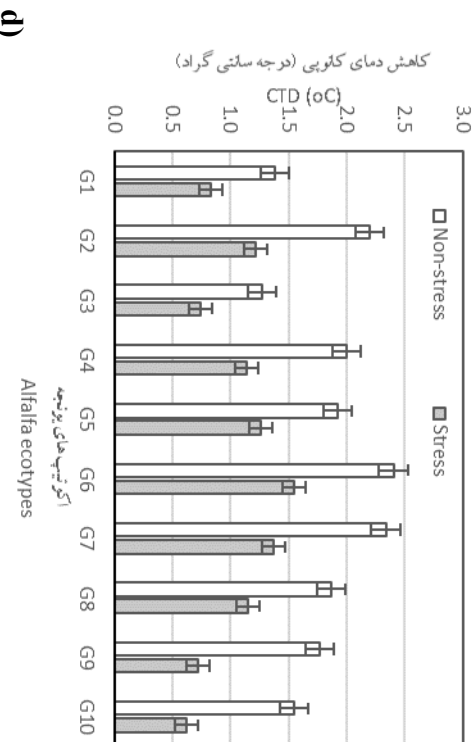
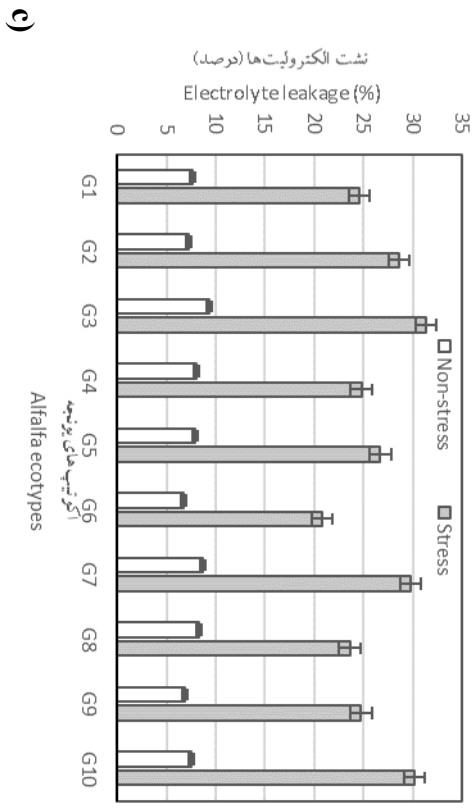
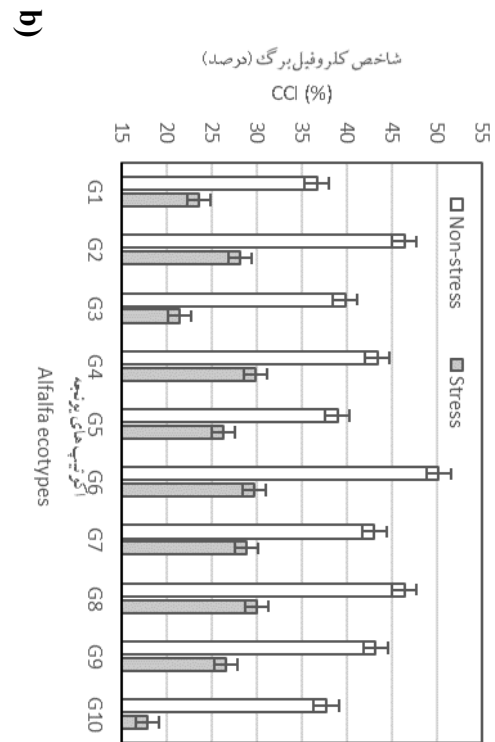
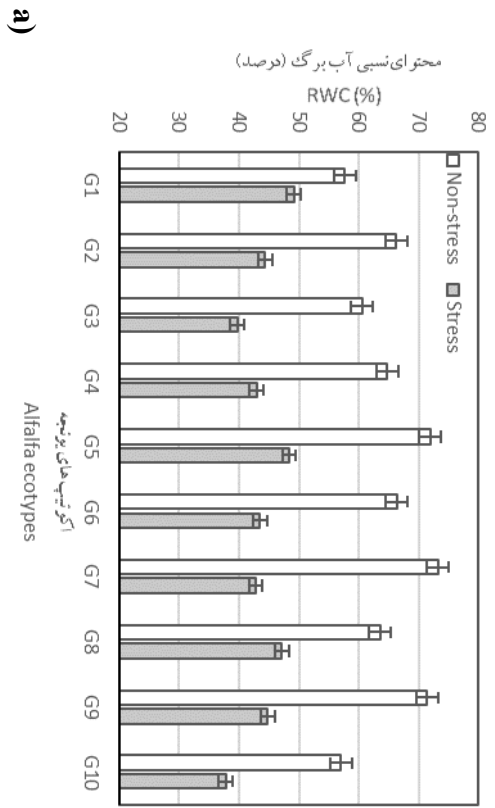
صفت	محتوای نسبی آب برگ	نسبت الکترولیت‌ها E. L.	شاخص کلروفیل برگ CCI	کاهش دمای کانویی CTD	مقاومت روزنه‌ای SR	کلروفیل a Chl. a	کلروفیل b Chl. b	کاروتنوئیدها Carotenoids	عملکرد ماده خشک Dry matter yield
محتوای نسبی آب برگ RWC	-0.63**								
نسبت الکترولیت‌ها E. L.		-0.62**							
شاخص کلروفیل برگ CCI	0.61**		-0.72**						
کاهش دمای کانویی CTD	0.57**	-0.52**	0.63**						
مقاومت روزنه‌ای SR	-0.69**	0.57**	-0.72**	-0.57**					
کلروفیل a Chl. a	0.72**	-0.69**	0.67**	0.62**	-0.69**				
کلروفیل b Chl. b	0.40**	-0.49**	0.48**	0.39**	-0.46**	0.62**			
کاروتنوئیدها Carotenoids	0.44**	-0.64**	0.43**	0.48**	-0.33**	0.71**	0.44**		
عملکرد ماده خشک Dry matter yield	0.64**	-0.32**	0.42**	0.47**	-0.59**	0.41**	0.15	0.14	

** ضریب همبستگی پیرسون در سطح احتمال ۱٪ معنی دار است.

** Pearson correlation coefficient with significant difference at 1% probability level.

محیط آزمایش آبیاری کامل و قطع ۲۰ روزه آبیاری، صفات محتوای آب نسبی برگ، مقدار شاخص کلروفیل، کاهش دمای کانوپی و مقدار رنگیزه های فتوسنتزی در محیط بدون تنش آبی بالاتر و مقدار نشت الکترولیت ها و مقاومت روزنه ای در محیط تنش آبی بیشترین مقادیر را داشتند که امری قابل انتظار است (نمودار ۱). بر این اساس اکوتیپ KFA13 بالاترین مقدار آب نسبی برگ را با ۷۳/۲۲ درصد در بین اکوتیپ ها دارا بود و اکوتیپ KFA6 بیشترین مقادیر شاخص کلروفیل برگ با ۵۰/۱۹ درصد، کاهش دمای کانوپی با ۲/۴ درجه سانتی گراد و رنگیزه های فتوسنتزی با ۱/۹۲۷ میلی گرم بر گرم وزن تر برگ را داشت. بیشترین پایداری غشا سلول و یا کمترین میزان نشت الکترولیت ها با ۶/۷۶ درصد در محیط بدون تنش آبی در اکوتیپ KFA6 مشاهده شد و بیشترین مقدار هدایت روزنه ای و یا کمترین میزان مقاومت روزنه با ۱۵/۷۶ ثانیه بر سانتی متر در اکوتیپ KFA6 مشاهده گردید. در محیط آبیاری کامل بیشترین عملکرد ماده خشک در اکوتیپ یزدی و KFA6 به ترتیب با ۱۸/۹۵ و ۱۸/۷۰ تن در هکتار و با برتری ۱۴/۲ و ۱۲/۷ درصد نسبت به میانگین عملکرد ۱۰ اکوتیپ در شرایط بدون تنش آبی مشاهده گردید. در محیط تنش بالاترین عملکرد ماده خشک به ترتیب مربوط به اکوتیپ KFA6 و یزدی با ۱۶/۲۵ و ۱۵/۵۶ تن در هکتار بود که برتری ۱۵ و ۱۰ درصدی نسبت به میانگین عملکرد ماده خشک تولید شده اکوتیپ ها در محیط تنش آبی داشت.

KFA6 با ۱۷/۴۸ تن در هکتار مشاهده شد که با توجه به برتری صفات فیزیولوژیکی مرتبط با تولید علوفه در این اکوتیپ قابل انتظار است. ارزیابی ضریب همبستگی بین صفات فیزیولوژیک نشان می دهد (جدول ۸) محتوای نسبی آب برگ تنها با مقدار نشت الکترولیت ها و مقاومت روزنه ای همبستگی منفی و معنی دار دارد و با دیگر صفات فیزیولوژیک مانند شاخص کلروفیل برگ، کاهش دمای کانوپی و رنگیزه های فتوسنتزی همبستگی مثبت و معنی دار وجود دارد. بیشترین ضریب همبستگی محتوای نسبی آب با مقدار کلروفیل a به میزان ۰/۷۲ بود. مقدار نشت الکترولیت ها از غشا سلول در ارتباط مستقیم و معنی دار با میزان مقاومت روزنه ای است و به عبارت دیگر نفوذپذیری غشا با میزان هدایت روزنه ای در ارتباط مستقیم است. شاخص کلروفیل برگ با مقدار مقاومت روزنه ای ارتباط معکوس دارد و بالاترین ضریب همبستگی شاخص کلروفیل برگ با صفت کلروفیل a به میزان ۰/۶۷ است. به طور مشابه ضریب همبستگی بین کاهش دمای کانوپی با کلروفیل a با ۰/۶۲ بیشترین مقدار بود. همبستگی بین عملکرد ماده خشک با تمام صفات فیزیولوژیک مورد بررسی به جز مقدار کلروفیل b و مقدار کاروتنوئیدها دارای اختلاف معنی دار بوده است. همانطور که قابل پیش بینی است عملکرد همبستگی منفی و معنی داری با میزان نشت الکترولیت ها یا ناپایداری غشا سلول و مقاومت روزنه ای دارد و بالاترین ضریب همبستگی عملکرد ماده خشک با محتوای نسبی آب برگ به میزان ۰/۶۴ می باشد. در بین دو



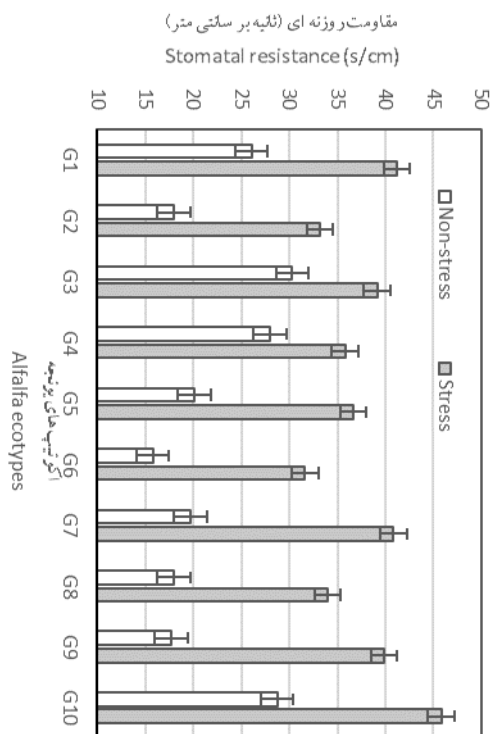
نتیجه گیری

از آنجا که یکی از چالش های موجود در غربال ژرم پلاسما های موجود در شرایط تنش رطوبتی، زمان بر و پرهزینه بودن فرآیند ارزیابی بدلیل طولانی بودن دوره رشد یونجه و چند چین بودن آن است: شاخص های فیزیولوژیک به دلیل اندازه گیری آسان، کم هزینه و بویژه سریع می تواند به عنوان معیار مناسبی در انتخاب اکوتیپ یونجه با عملکرد مطلوب در شرایط تنش رطوبتی باشد. همانطور که مشاهده شده در مجموع آزمایش، اکوتیپ KFA6 بالاترین عملکرد ماده خشک به میزان ۱۷/۴۸ تن در هکتار و برتری ۱۴ درصدی نسبت به میانگین اکوتیپ های مورد بررسی، کمترین میزان نشت الکترولیتی یا بالاترین مقدار پایداری غشا سلول را دارا بوده است. همچنین این اکوتیپ کمترین مقاومت روزنه ای که در ارتباط با حداکثر هدایت روزنه ای است و منجر به فتوسنتز بیشتر برگ ها می شود را به خود اختصاص داده است. دیگر صفات فیزیولوژیک مورد ارزیابی نیز نشان از کارآیی مطلوب معیارهای فیزیولوژیک در راستای تفکیک اکوتیپ پرمحصول بوده است که می تواند در برنامه های اصلاحی جهت انتخاب رقم مورد استفاده قرار گیرد.

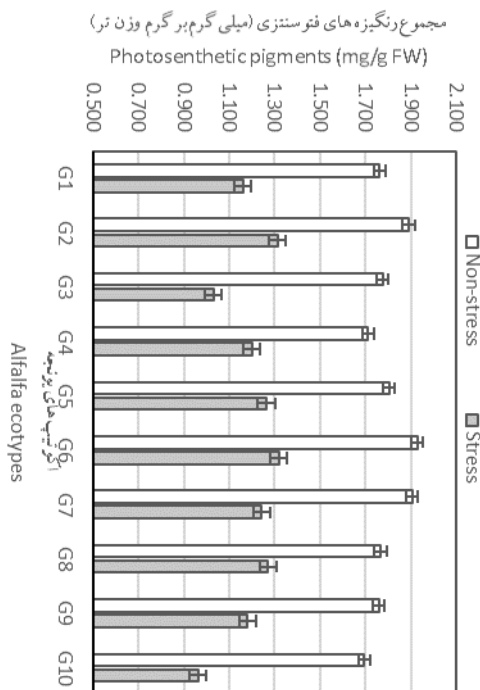
سپاسگزاری

بدینوسیله از زحمات مسئولین و همکاران بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه ای مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و تکسین واحد یونجه، آقای مهندس مجتبی جوکار سپاسگزاری می کنم.

ع)



د)



References:

- Arnon, A. N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agronomy Journal*, 23:112-121.
- Bhatnagar-Mathur, P., Vadez, V., and Sharma, K.K. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Report*, 27:411–424.
- Bray, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology*, 103:1035–1040.
- Carter, P. R. and Scheaffer, C. C. 1983. Alfalfa response to soil water deficits. I- growth, forage quality, yield and water use efficiency. *Crop Science*, 23: 669-675.
- Costa, H.L., Martelli da silva, I. M., and Pomeroy, D. 2005. Production of β -carotene by a *Rhodotorula* strain. *Biotechnology Letter*, 9: 373-375.
- Doorenbos, J. and Kassam, A.K. 1979. Yield response to water. *Irrigation and Drainage Paper* 33. FAO, United Nations, Rome, p. 176.
- Feher, J., Majer, P., Sass, L., Lantos, C., Csiszár, J., Turoczy, Z., Mihály, R., Mai, A., and Pauk, J. 2014. Phenotyping shows improved physiological traits and seed yield of transgenic wheat plants expressing the alfalfa aldose reductase under permanent drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36. 10.1007/s11738-013-1445-0.
- Ehdaie, B., Wains, J. G., and Hall, A. E. 1988. Differential response of landrace and improved spring wheat genotypes to stress environments. *Crop Science*, 28: 838-842.
- Ehsanpour, A.A. and Razavizadeh, R. 2005. Effect of UV-Con drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(2), 107-110.
- Fischer, R.A. and Mourer, R. 1978. Drought resistance in spring wheat cultivars. I. Grain yield response. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29: 897-912.
- Hana, B. and Bischofa, J. C. 2004. Direct cell injury associated with eutectic crystallization during Freezing. *Cryobiology*, 48: 8-21.
- Hirayama, H., Wada, Y., and Neato, H. 2006. Estimation of drought tolerance based on leaf temperature in upland rice breeding. *Breeding Science*, 56: 47–54.
- Koochaki, A. and Nasiri-Mahalati, M. 1994. *Crop ecology*. Vol. 1: Relation between plant and environment. Ferdowsi University publish.

- Kulshreshtha, S. D. P., Mishra, R., and Gupta, K. 1987. Changes in content of chlorophyll, proteins and lipids in whole chloroplast and chloroplast membrane fractions at different leaf water potentials in drought resistance and sensitive genotype of wheat. *Photosynthetica*, 21:65-70.
- Lawlor, D. W., Johnson, A. E., and Legg, B. J. 1981. Growth of spring barley under drought, crop development, photosynthesis, dry matter accumulation and nutrient content. *Journal of Agricultural Science*, 96:167-186.
- Lawlor, D.W. and Cornic, G. 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell Environment*, 25: 275-294.
- Li, F. R., Gao, C.Y., Zhao, H.L., and Li, Y.X. 2002. Soil conservation effectiveness and energy efficiency of alternative rotations and continuous wheat cropping in the Loess plateau of northwest China. *Agricultural Ecosystem Environment*, 91:101-111.
- Mc Williams, D. 2002. Drought strategies for alfalfa. Extension handbook, Department of Extension Plant Sciences, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico. P-1-5.
- Metochis, Chr. and Orphanos, P.I. 1981. Alfalfa yield and water use when forced into dormancy by withholding water during the summer. *Agronomy Journal*, 73(6),1048-1050.
- Mofidian, S.M.A. and Moghaddam, A. 2013. Analysis of ecotype location interaction in cold-region alfalfa ecotypes. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 15(2), 71-85.
- Mofidian, S.M.A., Aghashahi, A., and Moghaddam, A. 2013. Quantitative and qualitative forage yield of cold-region alfalfa ecotypes of Iran. *Seed and Plant Improvement Journal*, 29-1(4), 729-745.
- Mofidian, S. M. A., Mokhtarzadeh, A. A., Monirifar, H., Beheshti, A. R., and Souri, J. 2012. Determination of forage productivity potential of cold-region alfalfa ecotypes in cold and mild – cold areas. *Agronomy Journal (Pajouhesh & Sazandegi)*, 94:50-59.
- Ottman, M. J. and Tickes, B. R. 2016. Alfalfa irrigation termination, Yuma. Forage and Grain: A College of Agriculture Report.
- Ritchie, S. W, and Nguyen, H. T. 1990. Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30: 105-111.
- Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., and Blumwald, E. 2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought

- tolerance in a flowering plant. *Proceeding of National Academic Science, USA* 104:19631–19636.
- Saneoka, H., Moghaieb, R.E.A., Premachandra, G.S., and Fujita, K. 2004. Nitrogen nutrition and water stress effects on cell membrane stability and leaf water relations in *Agrostis palustris* Huds. *Environmental Experiment Botany*, 52: 131–138.
- Schonhorst, M. H., Thompson, R. K., and Dennis, R. E. 1963. Does it pay to irrigate alfalfa in the summer? *Program of Agriculture in Arizona*, 15(6):8 -9.
- Schonfeld, M. A., Joonson, R. C., Carver, B. F., and Mornhinweg, D. W. 1988. Water relations in winter wheat as drought resistance indicators. *Crop Science*, 28:526-531.
- Sharp, R. E. and Davies, W. J. 1979. Solute regulation by roots and shoots of water stressed maize plants. *Planta*, 197:43-49.
- Sharrat, B., Baker, D., and Scheaffer, C. 1986. Climatic effect of alfalfa dry matter production. Part 1. Summer harvest. *Agricultural Meteorology*, 39: 121-129.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling path-ways. *Current Opinion in Plant Biology*, 3:217–223.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Seki, M. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 6:410–417.
- Sutcliffe, J. 1979. Plants and water study. In *Biology*, No: 14. Edward Arnold, 2nd ed. Plant American Press. New York. PP. 203-241.
- Verona, C. and Calcagno, F. 1991. Study of stomatal parameters for selection of drought resistant varieties in *Triticum durum* DESF. *Euphytica*, 57: 275-283.
- Zhang, T., Long-Xi, Y., Zheng, P., Li, Y., Rivera, M., Main, D., and Greene, S. L. 2015. Identification of loci associated with drought resistance traits in heterozygous autotetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.) using genome-wide association studies with genotyping by sequencing, *PLoS ONE* 10(9): e0138931, doi:10.1371/journal.pone.0138931.
- Zhao, Y., Aspinall, D., and Paleg, L.G. 1992. Protection of membrane integrity in *Medicago sativa* L. by glycine betaine against the effects of freezing. *Journal of Plant Physiology*, 140: 541-543.

Physiological response of some important alfalfa ecotypes to water-limited conditions

S. M. A. Mofidian^{1*}, J. Ahmadi², A. Moghaddam³

1- PhD Student in Plant Breeding, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran and Faculty Member of Seed and Plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.(Corresponding author).

2- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

3- Assistant Professor, Seed and plant Improvement Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: December 2018 Accepted: November 2019- DOI: 10.22092/aj.2019.124487.1367

Extended Abstract

Mofidian, S. M. A., Ahmadi, J and A. Moghaddam. Physiological response of some important alfalfa ecotypes to water-limited conditions **Applied Research in Field Crops Vol 32, No. 03, 2019- Page: 4-6:** 18-39(in Persian)

Introduction

Water scarcity is one of the major limiting factors to agricultural production across the globe and it is predicted that drought spells will occur more frequently in the future due to the long-term effects of global warming (Rivero et al., 2007). This has led to a decrease in canopy size, loss in photosynthesis and consequently reduced crop yields. Alfalfa, being perennial and multi cut, as well as having an efficient root system, can tolerate water limited conditions by dormancy and is able to restart its biological activities after irrigating (Mc Williams, 2002). The mechanisms of response to water stress are complex and include activation of growth regulators in molecular and physiological levels. In addition, the yield potential and stability of some Iranian alfalfa ecotypes in different locations have been investigated previously (Mofidian & Moghaddam, 2013).

Email address of the corresponding author: amofidian@ymail.com

Material and Methods: The experiment was carried out with 10 warm and cold region alfalfa ecotypes in two distinct environments at Seed and Plant Improvement Institute (SPII), Karaj, Iran, over the years 2016-2018. The environments included full irrigation and no watering for 20 days from 22th of June. To conduct a preliminary evaluation of the ecotypes response to water stress, stress susceptibility index (SSI) based on fresh forage yield was calculated. The most important physiological traits measured in this study were as follows: relative water content (RWC), chlorophyll content index (CCI), canopy temperature depression (CTD), and stomatal resistance (SR), Chlorophyll a and b contents and carotenoids. Combined analysis of variance and mean comparisons were done by SPSS Ver.22 and Excel 2016.

Results and Discussion: The effect of no watering stress on all of the physiological traits was significant ($P < 0.01$). The ecotypes showed a significant difference in dry matter yield and all physiological measurements except for electrolyte leakage and chlorophyll b content. The year effect indicated a significant difference for chlorophyll b ($P < 0.05$); carotenoids and dry matter yield ($P < 0.01$) but it was not found to be significant for the rest of traits. Among the interactions, environment \times year interaction showed no significant effect for all the studied traits. Although, ecotype \times environment interaction was significant just for carotenoids ($P < 0.01$), ecotype \times year interaction was significant for Dry matter yield, RWC, CTD and SR ($P < 0.01$); and CCI, chlorophyll a ($P < 0.05$), as well. Under full irrigation regime and cut-off irrigation treatment, RWC was respectively 66.26 and 44.06 percent, which indicated that water stress decrease RWC by 32 percent. Electrolyte leakage averaged 26.51 percent under the stress environment, exhibiting a 72 percent decrease in cell membrane stability relative to full irrigation scenario. The chlorophyll content index in non-stress condition was 38 percent greater than that of under stress condition. The canopy temperature depression decreased by 43 percent during water stress imposition. No water shortage treatment led to the least stomatal resistance of 22.22 s/cm; however, this value was 37.87 s/cm under water-limited conditions, which showed a difference of 70 percent.

Conclusion: The minimum stress susceptibility index at the first and second year, 0.35 and 0.51, were observed in BAGHDADI and BAMI ecotype respectively, which, among the investigated alfalfa ecotypes, were found to be the most resistance to no watering for 20 days. Overall, KFA6 ecotype showed the minimum electrolyte leakage (13.79 s/cm) and stomatal resistance (23.69 s/cm),

respectively. Moreover, KFA6 ecotype had the maximum photosynthetic pigments of 1.623 mg in fresh leaf (gr) that led to the production of 17.48 t/ha dry matter yield and superiority of 14 percent as compared to the two-year mean of all ecotypes under full irrigation and no watering conditions.

Keywords: Canopy temperature, stomatal resistance, cell membrane stability, photosynthetic pigments, and alfalfa.

References:

Mc Williams, D. 2002. Drought strategies for alfalfa. Extension handbook, Department of Extension Plant Sciences, New Mexico State University, Las Cruces, New Mexico. P-1-5.

Rivero, R.M., Kojima, M., Gepstein, A., Sakakibara, H., Mittler, R., Gepstein, S., and Blumwald, E.2007. Delayed leaf senescence induces extreme drought tolerance in a flowering plant. Proceeding of National Academic Science, USA 104:19631–19636.

Mofidian, S.M.A., and Moghaddam, A. 2013. Analysis of ecotype location interaction in cold-region alfalfa ecotypes. Iranian Journal of Crop Sciences, 15(2): 71-85.