جداسازی باکتری‌های *Sinorhizobium meliloti* از خاک‌های تحت کشت یونجه در کرج و بررسی تأثیر آنها بر عملکرد یونجه

محمدطاهر نظامی[1] و علیرضا فلاح نصرت‌آباد

دانشیار گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج؛ Taher.nezami@yahoo.com

استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج؛ rezafayah@yahoo.com

دریافت: 92/4/31 و پذیرش: 92/9/13

چکیده

یونجه (Medicago sativa L.) یکی از مهم‌ترین لگوم‌های علوفه‌ای است که بیش از 600 هزار هکتار از اراضی زراعی کشور را به خود اختصاص داده است. این گیاه قادر است در صورت وجود باکتری *Sinorhizobium meliloti* در خاک و مناسب بودن شرایط اقلیم و خاک، مقدار قابل ملاحظه‌ای از نیتروژن مولکولی هوا را تثبیت نماید. تعداد 20 نمونه خاک از مناطق مختلف کرج نمونه برداری شد و برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نمونه ها اندازه‌گیری شد. سپس با کاشت بذر یونجه در شرایط گلخانه‌ای، تعداد32 جدایه باکتری جداسازی و تعداد 20 جدایه منسوب به *S. meliloti* شناسایی گردید و با استفاده از آزمون آلودگی، تشخیص جدایه‌ها تأیید شد. برای بررسی تأثیر 20 جدایه S. meliloti بر عملکرد یونجه و مقایسه آن با مصرف کود نیتروژنی در حضور باکتری‌های *S. meliloti* آزمایشی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل فاکتورهای تلقیح (شامل تیمار بدون تلقیح یا شاهد، تیمار تلقیح با باکتری، تیمار کود نیتروژنی) در سه تکرار در مجموع 72 تیمار انجام شد. نتایج تجزیه خاک‌ها نشان داد که مقدار فسفر، بور، آهن و روی در اکثر مزارع یونجه کمتر از حد بحرانی بود و کمبود این عناصر یکی از عوامل محدود کننده تولید و همچنین تثبیت نیتروژن در مزارع استان بود. نتایج آزمایش گلخانه‌ای نشان داد تأثیر جدایه‌های جدا شده و کود نیتروژنی بر عملکرد با شاهد تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال 5 درصد داشت. .تأثیر تعداد نه جدایه روی ارتفاع گیاه،وزن تر و خشک ریشه و تأثیر 10 جدایه روی وزن غده نسبت به شاهد بدون تلقیح در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. مصرف نیتروژن باعث کاهش معنی-دار گره‌زایی نسبت به شاهد و تیمارهای تلقیح شده گردید. بیشترین وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار S_{11} با میانگین 1/38 گرم می‌باشد که نسبت به تیمار S_9 با میانگین 1/36 گرم در یک گروه آماری قرار دارند و هر دو نسبت به شاهد با میانگین 0/93 گرم افزایش معنی‌داری نشان دادند. کمترین وزن خشک نیز مربوط به تیمار S_{17} با میانگین 0/77 گرم بود.

واژه های کلیدی: کود نیتروژنی، غده، ،همزیستی، تثبیت نیتروژن، لگومینوز

مقدمه

تاریخچه یونجه سرگذشت مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای دنیا و اولین گیاه علوفه‌ای اهلی شده است که بشر اولیه آن را به درستی به عنوان یک گیاه با ارزش از لحاظ تغذیه تشخیص داده است. یونجه سابقه تاریخی بسیار طولانی دارد و قدمت کشت آن به سال‌ها قبل از میلاد مسیح و به ابتدای تاریخ تمدن می‌رسد. باید اشاره کرد که

[1]: نویسنده مسئول، آدرس: کرج، مهر شهر، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، گروه مهندسی علوم خاک

ارزش یونجه تنها در توان ذخیره نمودن مواد غذایی مانند پروتئین و مواد معدنی مختلف از قبیل کلسیم و حتی انواع ویتامین‌های مختلف (ده نوع ویتامین به خصوص ویتامین‌های A وC) نیست بلکه این گیاه تأثیر مهمی در اصلاح زمین‌های زراعی از طریق بهبود تهویه، زهکشی، افزایش مواد آلی و نیتروژن خاک دارد. زهران (1999) گزارش کرد که همزیستی ریزوبیوم با گیاهان خانواده لگومینوز بزرگ‌ترین و مهم‌ترین سیستم تثبیت کننده نیتروژن در زمین‌های زراعی بوده و مقدار نیتروژن تثبیت شده توسط این نوع همزیستی، حدود 90 میلیون تن در سال تخمین زده می‌شود. سپینک (1998) گزارش داد چنانچه بشر بخواهد با روش شیمیایی هابر- بوش این کار را انجام دهد هزینه‌ای معادل 30 میلیارد دلار در بر خواهد داشت. مصرف این مقدار نیتروژن سبب به مخاطره انداختن محیط زیست می‌گردد. امروزه دانشمندان دریافتند که مصرف بی‌رویه کودهای نیتروژنی یکی از علل افزایش گازهای گلخانه‌ای و گرم شدن کره زمین می‌باشد. پیرزیس (2000) مقدار تثبیت نیتروژن در یونجه توسط باکتری همزیست *sinorhizobium meliloti* را بین 60 تا500 کیلوگرم در هکتار در سال گزارش کرد که به طور متوسط 225 کیلوگرم در هکتار در سال ارزیابی شده است. بنابراین بایستی راه‌کارهایی جهت افزایش برقراری این نوع همزیستی و به حداقل رساندن موانع و مشکلات انجام تثبیت بویژه در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین پیدا نمود، تا شاهد کاهش مصرف کودهای نیتروژنی و کاهش اثرات سوء ناشی از مصرف بی‌رویه این کودها باشیم. سپهری (1382) گزارش داد که ورود عناصر سنگین از طرق مختلف به خاک از جمله از طریق ناخالصی‌های موجود در کودهای شیمیایی باعث کاهش تثبیت نیتروژن توسط ریزوبیوم‌ها می‌گردد که لازم است در این موارد از سینوریزوبیوم‌های مقاوم به عناصر سنگین استفاده کرد.

شندرام و ماتو (1997) نیتروژن را یکی از مهم-ترین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه عنوان کردند. زهران (1999) گزارش داد که این اسم در دویست سال پیش توسط آنتونی لاوزیر[1] برای این عنصر انتخاب شد. معنای این کلمه «بدون حیات[2]» می‌باشد؛ بدان معنی که بدون این عنصر، حیاتی وجود ندارد چون بخشی از ساختار ترکیبات بسیار مهم مانند پروتئین‌ها می‌باشد. ونس (2001) گزارش داد گیاهان نیتروژن مورد نیاز خود را از دو منبع نیتروژن خاک شامل نیتروژن کودهای شیمیائی، کودهای حیوانی، کودهای سبز، معدنی شدن نیتروژن و نیتروژن اتمسفر (تثبیت نیتروژن ملکولی) به دست می‌آورند.

ونس (2001) و بوکمن (1997) گزارش دادند برای تولید هر تن کود شیمیائی تقریباً 1/3 تن نفت یا 900 متر مکعب گاز طبیعی نیاز می‌باشد در حال حاضر میزان مصرف کودهای شیمیائی نیتروژنی در جهان حدود 88 میلیون تن می‌باشد. این بدان معنی است که هر سال برای تولید این نهاده کشاورزی تقریباً 115 میلیون تن نفت یا 79 میلیارد متر مکعب گاز طبیعی مصرف می‌شود. ونس (2001) گزارش داد که برای تأمین غذای جهان در سال 2040 به 40 میلیون تن کود شیمیائی نیتروژنی دیگر نیاز داریم. همچنین برای تأمین غذای بشر در آن سال، به 20 میلیون تن کود شیمیائی فسفری و رودخانه‌ای با دبی ده برابر رودخانه نیل برای آبیاری نیاز داریم. بوکمن (1997) در سال 2040 میلادی گزارش داد که سالانه 156 میلیون تن نفت یا 108 مترمکعب گاز طبیعی نیاز خواهیم داشت و این در حالی است که با روند مصرف فعلی، حداکثر زمان استفاده از مخازن نفتی و گازی جهان را تا 50 سال آتی تخمین زده‌اند.

پس استفاده از کودهای شیمیائی نیتروژنی به هیچ وجه با مفاهیم کشاورزی پایدار سنخیت ندارد چون در کشاورزی پایدار بایستی تولید به همراه حفظ یا ارتقاء بهره‌وری از منابع و ایجاد شرایط زیست محیطی مناسب برای تکامل همه گونه‌های موجودات زنده باشد که متأسفانه در این راهکار وجود ندارد (ونس، 2001). در مقابل این روش، فرآیند تثبیت نیتروژن مولکولی (BNF[3]) وجود دارد. تخمین‌های متفاوتی در مورد سهم تثبیت نیتروژن مولکولی در چرخه نیتروژن از 44 تا 200 میلیون تن نیتروژن در سال و با متوسط 140 میلیون تن در سال گزارش شده است (شندرام و ماتو ،1997). با توجه به آنکه 30-25 درصد از اراضی جهان به لگوم‌ها اختصاص دارد (35 تا 44 میلیون تن نیتروژن) و از طرفی 30 درصد از اراضی نیز شامل لگوم‌های مرتعی می‌شوند (45 میلیون تن نیتروژن)، لذا بخش عمده‌ای از این تثبیت (90-75 میلیون تن) به سیستم همزیستی ریزوبیوم - لگوم تعلق دارد(زهران، 1999؛ پیپلس و همکاران، 1995).

نکته قابل ذکر آن است که مقدار نیتروژن تثبیت شده در سیستم مذکور معادل مصرف کود شیمیائی نیتروژنی در کل جهان است. سیستم همزیستی ریزوبیوم - لگوم یکی از مهم‌ترین سیستم‌های تثبیت نیتروژن می‌باشد.

[1] Antonie Lavosier
[2] Without life
[3] Biological Nitrogen Fixatio

این سیستم از دو عضو یعنی لگوم‌های میزبان به عنوان ماکروسیمبیونت[1] و ریزوبیوم به عنوان میکروسیمبیویت[2] تشکیل شده است. مجموعه داده‌های آزمایشگاهی و مزرعه‌ای نشان می‌دهد که لگوم‌ها این پتانسیل را دارند که سالانه چند صد کیلوگرم نیتروژن در هر هکتار تثبیت نمایند (جدول 2). مقدار نیتروژن تثبیت شده توسط بسیاری از لگوم‌ها توسط عوامل محیطی مربوط به رشد گیاه مانند عناصر غذایی خاک، عرضه آب، آفات و بیماری‌های گیاهی تنظیم می‌شود (پیپلس و همکاران، 2002).

لگوم‌ها در آب و هوای مختلف تقریباً به ازاء هر تن وزن خشک اندام هوایی 25-20 کیلوگرم نیتروژن در اندام‌های هوایی تثبیت می‌کنند. پیپلس و همکاران (2002)گزارش دادند که برخی از عوامل ممکن است باعث کاهش تثبیت نیتروژن گردد که از جمله آنها می‌توان به عملیات کشاورزی نامناسب مانند شخم بیش از حد، ایش‌های طولانی، دادن کودهای شیمیایی نیتروژنی، تناوب نامناسب، عدم تلقیح یا استفاده از مایه تلقیح های نامناسب اشاره کرد. علاوه بر مقدار نیتروژنی که در اندام‌های هوائی تثبیت می‌شود ریشه‌های لگوم ممکن است به ازاء هر کیلوگرم نیتروژنی که در اندام‌های هوائی تثبیت می‌شود بیش از 0/7 کیلوگرم نیتروژن تثبیت نمایند. همچنین در همزیستی ریزوبیوم - لگوم باید به این نکته توجه کرد که اهمیت این دو عنصر یکسان نبوده و در این میان گیاه به عنوان یک عضو دائمی از اهمیت بیشتری برخوردار است و مقدار تثبیت نیتروژن بستگی زیادی به فیزیولوژی گیاه میزبان دارد (براکول و همکاران، 1995). به هر حال در صورت وجود ریزوبیوم‌های کارآ، مقاوم و دارای قدرت رقابت بالا نیز نمی‌توان انتظار داشت که گیاه در مواجه با عوامل محدود کننده‌ای چون بیماری‌های گیاهی، کمبود عناصر غذایی، سمیت عناصر غذایی (مانند منگنز، آلومینوم و غیره)، شوری، شرایط نامناسب pH، علف‌های هرز، فتوسنتز ناکافی، درجه حرارت‌های نامناسب، رطوبت نامناسب، تأثیرات ناشی از چرا و سوء مدیریت، بتواند از حداکثر پتانسیل تثبیت نیتروژن خود استفاده کند (براکول و همکاران، 1995).

با توجه به اینکه تحقیقات کمی در زمینه جداسازی جدایه‌های بومی یونجه در استان البرز انجام شده است لذا این تحقیق به منظور بررسی وضعیت عناصر غذایی در کشتزارهای یونجه و جداسازی و بررسی تأثیر آنها بر عملکرد یونجه جهت کاهش مصرف کود شیمیایی نیتروژنی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی 90 در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و گلخانه مؤسسه تحقیقات خاک و آب کرج انجام شد. پس از نمونه برداری خاک از تعداد 20 مزرعه اطراف کرج مشخصات طول و عرض جغرافیایی مناطق مورد مطالعه با استفاده از دستگاه GPS ثبت شد. برای تهیه خاک مورد نظر، تعداد 10 زیر نمونه به ازاء هر هکتار مزرعه از عمق 30-0 سانتی‌متری برداشته شد. به منظور اطلاع از وضعیت حاصخلیزی خاک در اراضی یونجه زار اطراف کرج، مقدار پتاسیم، فسفر، نیتروژن، آهن، روی، مس، منگنز، کربن آلی، کربنات کلسیم و ویژگی‌هائی چون pH، هدایت الکتریکی (E.C) و بافت خاک نیز اندازه‌گیری شد (احیائی و بهبهانی‌زاده، 1372). چون در این تحقیق امکان جمع‌آوری گرهک از ریشه‌های عمیق یونجه در همه مناطق وجود نداشت بدین منظور مقدار دو کیلوگرم از نمونه خاک مرکب برداشته شد. نمونه‌ها بدون هیچگونه عملیاتی به گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی حمل و سپس به گلدان‌های دو کیلوگرمی که از قبل آماده شده بودند منتقل شدند.

سپس بذور یونجه رقم همدانی که از قبل استریل و جوانه‌دار شده بودند در هر یک از گلدان‌ها به تعداد 7 عدد کشت شدند. پس از 4 ماه از زمان کاشت، آزمایش متوقف و گرهک‌های ریشه‌ای هر خاک جداسازی شد. گرهک‌های ریشه‌ای پس از خشک شدن توسط دستمال کاغذی تا زمان جداسازی باکتری، در لوله-های حاوی سیلیکاژل نگهداری شدند (دیت و هالیدی، 1987). برای جداسازی باکتری از گرهک پس از خروج گرهک‌های خشک شده از لوله حاوی سیلیکاژل، برای مدت یک ساعت در آب مقطر نگهداری شده و پس از آن گرهک‌های ریشه‌ای با استفاده از الکل 96 درجه، کلرید جیوه 0/1 درصد اسیدی و شستشوهای مکرر با آب مقطر سترون، استریل سطحی شدند (وینسنت، 1970). آنگاه گرهک‌ها با استفاده از یک میله شیشه‌ای به شدت له شده و مقدار 0/1 میلی‌لیتر از سوسپانسیون مذکور روی محیط YMA (محیط مخصوص ریزوبیوم) حاوی کنگورد کشت داده شدند (یک و همکاران، 1993). بدین‌ترتیب به ازاء هر نمونه گرهک، سه تشتک پتری کشت داده شده و برای مدت 3-4 روز در گرمخانه در دمای 28 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن باکتری‌های دارای مشخصات اولیه ریزوبیوم واکشت شده و در نهایت کلنی‌های لعابی

---

1. Macrosymbiont
2. Microsymbiont

که رنگ کونگورد را جذب نکرده و گرام منفی بودند به عنوان باکتری‌های منسوب به *S. meliloti* بر روی محیط شیبدار YMA حاوی سه گرم در لیتر کربنات کلسیم کشت داده شدند (جهت نگهداری باکتری بیش از دو هفته). پس از چند روز محیط‌های شیبدار به منظور نگهداری به یخچال منتقل شدند.

به منظور تأیید تشخیص جدایه‌ها و اینکه آنها متعلق به گونه *S. meliloti* باشند، از آزمون آلوده سازی گیاه استفاده شد. سپس 20 مایه تلقیح از 20 جدایه جدا شده، تهیه شد (برای تهیه مایه تلقیح از محیط YMB استفاده شد) تا میزان کارایی جدایه‌های جدا شده در منطقه آب و هوایی کرج بر عملکرد یونجه رقم همدانی بدست آید. بدین منظور در سال 90 در گلخانه مؤسسه تحقیقات خاک و آب آزمایشی با استفاده از جارلئونارد و برای مدت پنج ماه انجام شد. هر کدام از تیمارها با توجه به شماره خاک مورد مطالعه نامگذاری شد ($S_1,S_2,...S_{20}$)؛ تیمار شاهد با علامت (W_{21}) و تیمارهای مصرف 30، 50 و 70 پی‌پی‌ام نیتروژن به ترتیب به صورت ($N_{30},N_{50}\&N_{70}$) مشخص شد. طرح به صورت کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و در پایان آزمایش گلخانه‌ای وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن غده‌ها و ارتفاع گیاهان اندازه‌گیری شد. برای تجزیه تحلیل آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS در سطح احتمال 5 درصد و برای رسم شکلها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز خاک 20 نمونه خاک نشان داد 80 درصد از خاک‌های نمونه‌برداری شده دارای پ‌هاش بین 8/58-8 بوده، 40 درصد از خاک‌ها دارای هدایت الکتریکی کمتر از 2 دسی‌زیمنس بر متر و 5 درصد از خاک‌ها دارای ماده آلی کمتر از یک درصد بودند. ماده آلی در 75 درصد از خاک‌ها3-2، در 15 درصد از خاک‌ها 3/5-3 و در 5 درصد از خاک‌ها 4-3/5 درصد بود. همچنین بافت خاک در این 20 نمونه خاک متفاوت و 7 گروه مختلف را شامل شد. این گروه‌ها شامل 35 درصد لومی رسی، 20 درصد لومی، 15 درصد رسی، 10 درصد سلیتی لومی رسی و سیلتی رسی و 5 درصد لومی شنی و لومی سیلتی بود. در 80 درصد از خاک‌ها میزان نیتروژن کل خاک کمتر از 0/3 درصد و در 20 درصد از خاک‌ها 0/5-0/3 درصد بود. در 10 درصد از خاک‌ها میزان کربنات کلسیم کمتر از 10 درصد و در 35 درصد از خاک‌ها 15-10، و در 55 درصد از خاک‌ها 22-15 درصد بود. در 40 درصد از خاک‌ها مقدار فسفر کمتر از ده میلی-گرم در کیلوگرم، 25 درصد از خاک‌ها 20-10، 20 درصد از خاک‌ها 31-20، 5 درصد از خاک‌ها 36/1-31 و 10 درصد از خاک‌ها 187/5-36/1 میلی‌گرم در کیلوگرم بود. مقدار پتاسیم در 30 درصد از خاک‌ها کمتر از سیصد میلی‌گرم در کیلوگرم، در 35 درصد از خاک‌ها 400-300، در 10 درصد از خاک‌ها 500-400 و در 25 درصد از خاک‌ها 825-500 میلی‌گرم در کیلوگرم بود. (جدول 1).

در 45 درصد از خاک‌ها مقدار آهن کمتر از 4/8 میلی‌گرم در کیلوگرم، 35 درصد از خاک‌ها 4/8-5/8 میلی‌گرم در کیلوگرم، 15 درصد 5/8-6/8 میلی‌گرم در کیلوگرم و 5 درصد از خاک‌ها 6/8-12/6 میلی‌گرم در کیلوگرم بود. مقدار منگنز در 10 درصد از خاک‌ها کمتر از 5 میلی‌گرم در کیلوگرم، 35 درصد 8-5، 20 درصد از خاک‌ها 10-8 و 35 درصد 14/75-10 میلی‌گرم در کیلوگرم بود. میزان مس در 20 درصد از نمونه‌ها کمتر از 1 میلی‌گرم در کیلوگرم، 40 درصد از نمونه‌ها 1/5-1 میلی‌گرم در کیلوگرم، 30 درصد از نمونه‌ها 1/88-1/5 میلی‌گرم در کیلوگرم، و در 10 درصد از خاک‌ها 2-1/88 میلی‌گرم در کیلوگرم بود. مقدار روی در 30 درصد از خاک‌ها کمتر از 1 میلی‌گرم در کیلوگرم،30 درصد از خاک‌ها 1/8-1، در 35 درصد از خاک‌ها 3/2-1/8، و در 5 درصد خاک‌ها 4/25-3/2 میلی‌گرم در کیلوگرم بود. مقدار بور در 40 درصد از خاک‌ها کمتر از 1 میلی‌گرم در کیلوگرم، در 25 درصد از خاک‌ها 1/5-1 میلی‌گرم در کیلوگرم، در 20 درصد از نمونه‌ها 2-1/5 و در 15 درصد از خاک‌ها 2/5-2 میلی‌گرم در کیلوگرم بود(جدول 1).

جدول 1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

شماره خاک	CEC (meq/100g)	EC ds/m	pH	درصد کربنات کلسیم (%TNV)	درصد ماده آلی (%OM)	درصد ازت کل (%N)	پتاسیم قابل استفاده (میلی گرم در کیلوگرم)	فسفر قابل استفاده (میلی گرم در کیلوگرم)	تجزیه اندازه‌ای ذرات			بافت
									شن %	سیلت %	رس %	
1	17/22	1/68	8/26	12/1	4/93	0/5	412/5	9/7	19	42	39	Si.C.L
2	14/6	1/27	8/14	10/8	2/14	0/21	311/1	4	16	47	37	Si.C.L

3	11/1	3/55	8/05	9/5	2/56	0/26	709/8	36/1	23	53	24	Si. L
4	23	2/82	9/37	20/5	2/83	0/28	497/4	31	21	36	43	C
5	23/3	3/42	9/2	19/9	2/64	0/26	702/6	85	21	33	46	C
6	21/1	3/1	8/58	21/67	2/18	0/22	514/2	22	20	34	46	C
7	20	1/6	8/3	13/6	2/29	0/23	365	6	37	27	36	C.L
8	19/1	2/5	8/15	11	2/49	0/25	281/2	10	36	33	31	C.L
9	14/2	2/18	8/44	15/55	1/76	0/18	277	9	43	35	22	L
10	17/72	3/23	8/14	10/75	2/64	0/26	243/1	10/7	42	34	24	L

ادامه جدول 1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

شماره خاک	CEC (meq/100g)	EC ds/m	pH	درصد کربنات کلسیم (%TNV)	درصد ماده آلی (%OM)	درصد ازت کل (%N)	پتاسیم قابل استفاده (ppm)	فسفر قابل استفاده (ppm)	تجزیه اندازه‌ای ذرات			بافت
									شن %	سیلت %	رس %	
11	7/4	4/5	8/41	15/1	2/14	0/21	323/1	12/1	73	17	10	Si.L
12	22/3	1/94	8/14	11	2/6	0/26	337/2	8	19	41	40	Si.C
13	19/6	1/75	7/71	8/6	2/6	0/26	247/7	12	33	38	29	C.L
14	19/7	1/8	9/1	19/3	3/21	0/32	370/3	31	30	43	27	C.L
15	19/5	3/53	8/8	18/3	3/48	0/35	825	3/1	31	45	24	L
16	21/1	1/44	8/43	15/6	2/75	0/28	330/5	7/6	16	41	43	Si.C
17	19/9	1/96	8/31	15/2	2/94	0/3	393	14	38	33	29	C.L
18	20/2	2/28	8/58	17/7	2/87	0/3	253/1	23/2	35	29	36	C.L
19	16/8	2	8/24	14/8	2/87	0/3	205/4	20/6	37	36	27	L
20	9/37	3/24	8/51	16/8	3/17	0/32	519/4	187/5	34	46	20	C.L

ادامه جدول 1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

	عناصر میکرو (میلی‌گرم در کیلوگرم خاک)				
شماره خاک	Fe	Mn	Cu	Zn	B
1	4/8	12/5	1/74	1/08	1/63
2	5	13/5	1/82	0/92	1/17
3	3/8	6/25	0/94	0/64	1/68
4	3/2	4	0/96	0/06	2/13
5	4/2	7/25	1/08	0/7	2
6	3/6	5/25	1/16	0/62	1
7	6/2	11	1/62	2/6	2/18
8	5/2	8/5	1/32	2	0/56
9	5/8	8	1/4	1/96	0/05
10	5/2	6	1/24	2/2	1
11	5/2	6	0/78	1/8	0/95
12	5/4	12/5	2	1	2/3
13	6/2	9/75	1/5	2	1/06
14	5/8	6/75	2	2/8	0/63
15	4/2	11/5	1/72	1/7	1/06
16	4/6	14/75	1/9	0/8	0/4
17	3/8	9/25	1/38	1/72	0/4
18	4/2	9/25	1	0/72	0/75
19	12/6	11	1/88	3/2	0/63
20	6/8	4/75	0/78	4/25	1/63

بررسی جداسازی و تأثیر 20 جدایه منسوب به S. meliloti بر عملکرد یونجه همدانی نشان داد که فاکتورهای بکار رفته روی صفات مورد بررسی دارای اثرات معنی‌داری می‌باشند که اثر این فاکتورها در هر صفت به ترتیب ذیل می‌باشد.

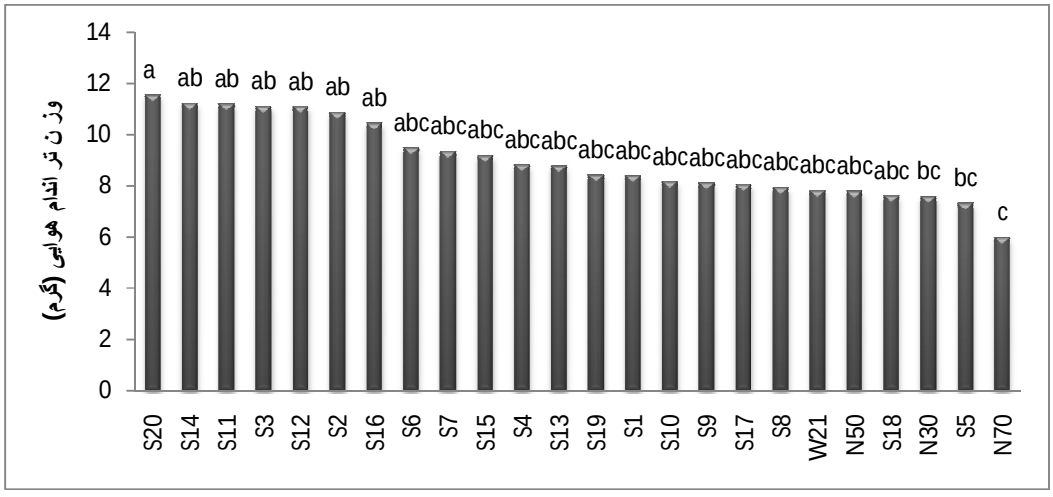
جدول 2- نتایج تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه

	میانگین مربعات						
منابع	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	وزن غده	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر اندام هوایی	ارتفاع	تغییرات درجه آزادی
تیمار	7/509*	0/06*	0/055*	0/099*	7/02*	66/44*	23
خطا	0/712	0/021	0/005	0/051	3/878	29/505	48

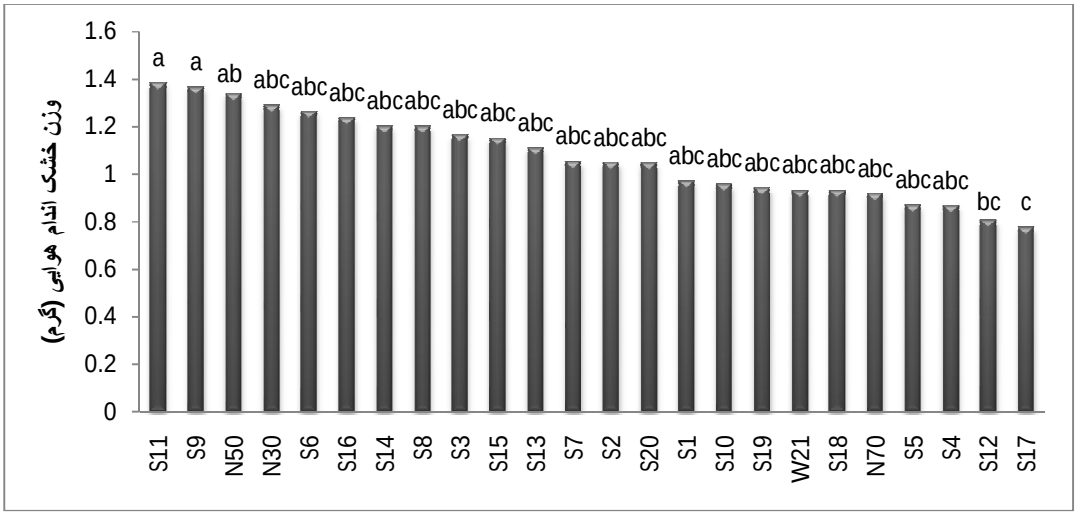
*معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد

نتایج مربوط به تأثیر جدایه‌های جدا شده از خاک‌های مختلف بر وزن تر اندام هوایی نشان می‌دهد که تلقیح باکتری تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن تر اندام هوایی در سطح احتمال 5 درصد نشان داد. بطوریکه در شکل (1) پیداست بیشترین وزن تر مربوط به جدایه جدا شده از خاک شماره 20 بوده که نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد. کمترین وزن تر هم مربوط به تیمار عدم تلقیح و اضافه کردن 70 پی‌پی‌ام نیتروژن می‌باشد. نتایج این آزمایش نشان داد که اکثر باکتری‌ها توانایی افزایش وزن تر را داشتند.

همچنین نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به تأثیر جدایه‌های مختلف نشان داد که تیمارها تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک در سطح احتمال 5 درصد داشته است. مقایسه میانگین وزن خشک بین تیمارها (شکل 2) نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین وزن خشک مربوط به تیمار S_{11} با میانگین 1/38 گرم می‌باشد که نسبت به تیمار S_9 با میانگین 1/36 گرم در یک گروه آماری قرار دارند که هر دو نسبت به شاهد با میانگین 0/93 گرم افزایش معنی-داری نشان دادند. کمترین وزن خشک نیز مربوط به تیمار S_{17} با میانگین 0/77 گرم بود. نتایج این آزمایش نیز اثر اکثریت جدایه‌های جدا شده بر افزایش وزن خشک گیاه را نشان می‌دهد.

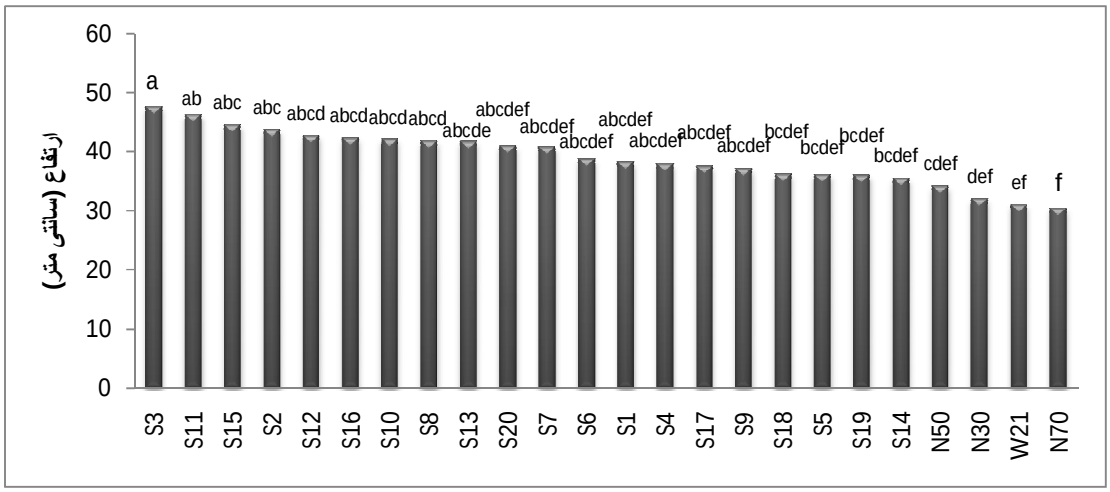


شکل 1- مقایسه تیمارهای مختلف از نظر وزن تر اندام هوایی



شکل 2- مقایسه تیمارهای مختلف از نظر وزن خشک اندام هوایی

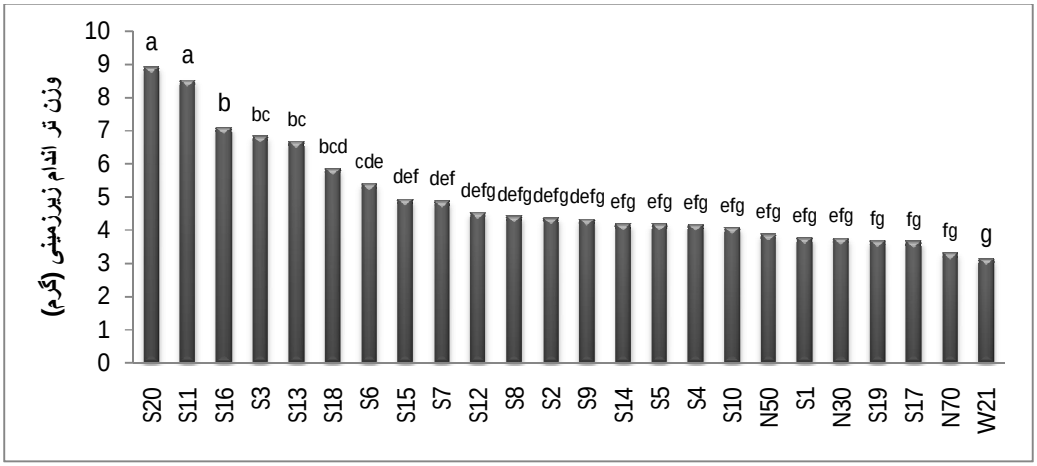
نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین تیمارهای مختلف از لحاظ ارتفاع گیاه، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 5 درصد وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها (شکل 3) نشان داد تعداد هشت جدایه جدا شده اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد از نظر ارتفاع گیاه داشت. بیشترین ارتفاع گیاه مربوط به تیمار S_3 با میانگین 47/66 سانتی‌متر می‌باشد که نسبت به شاهد با میانگین 31 سانتی‌متر اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد. کمترین ارتفاع هم مربوط به تیمار عدم تلقیح با مصرف 70 پی‌پی‌ام نیتروژن (N_{70}) می‌باشد که با تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری نشان داد. این نتایج باز نشان داد کلیه باکتری‌ها توانایی افزایش ارتفاع گیاه را داشتند.



شکل 3- مقایسه تیمارهای مختلف از نظر ارتفاع

نتایج مربوط به تأثیر جدایه‌های مختلف بر وزن تر ریشه نشان می‌دهد (شکل 4). همانطور که در جدول پیداست تلقیح باکتری تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن تر ریشه داشته است. مقایسه میانگین بین تیمارها نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 5 درصد وجود دارد. بیشترین وزن تر ریشه مربوط به تیمار S_{20} با میانگین 8/91 گرم می‌باشد که نسبت به تیمار S_{11} با میانگین 8/51 گرم در یک گروه آماری قرار دارند که هر دو نسبت به شاهد با میانگین 3/13 گرم افزایش معنی-داری نشان دادند. کمترین وزن خشک نیز مربوط به تیمار W_{21} (شاهد) بود. نتایج این آزمایش هم اثر اکثریت جدایه‌های جدا شده بر افزایش وزن تر ریشه را نشان

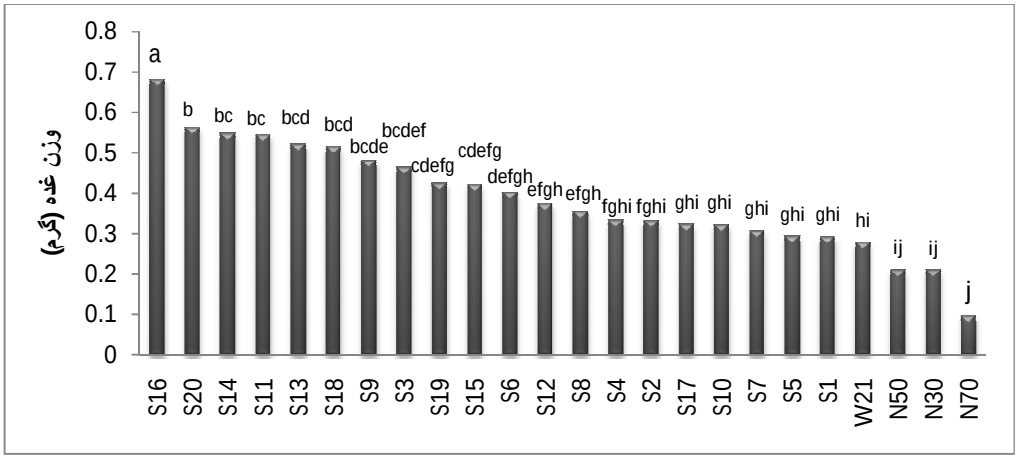
می‌دهد. از طرفی نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد بین تیمارهای مختلف از لحاظ عملکرد وزن خشک ریشه، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال 5 درصد وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها (شکل 5) نشان داد بین تیمار شاهد و9 جدایه جدا شده اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین وزن خشک ریشه مربوط به تیمار S_{13} با میانگین 0/81 گرم می‌باشد که نسبت به دو تیمار S_{20} و S_{16} با میانگین 0/78 گرم در یک گروه آماری قرار گرفتند که هر سه نسبت به شاهد با میانگین 0/30 گرم افزایش معنی‌داری نشان دادند. کمترین وزن خشک نیز مربوط به تیمار W_{21} (شاهد) بود. نتایج این آزمایش هم اثر اکثریت جدایه‌های جدا شده بر افزایش وزن خشک ریشه را نشان می‌دهد.



شکل 4- مقایسه تیمارهای مختلف از نظر وزن تر اندام زیرزمینی

شکل 5- مقایسه تیمارهای مختلف از نظر وزن خشک اندام زیرزمینی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر عوامل آزمایشی بر وزن غده گیاه یونجه در سطح احتمال 5 درصد معنی‌دار نشان داد. که مبین این مطلب است که کاربرد جدایه‌های مختلف جدا شده از خاک‌های متفاوت باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در وزن غده گیاه شد. نتایج مقایسه میانگین بین تیمارها (شکل 6) نشان داد که 10 جدایه سبب افزایش معنی‌دار وزن غده نسبت به شاهد شده است. همانطور که در شکل پیداست بیشترین وزن غده مربوط به جدایه جدا شده از خاک شماره 16 (S_{16}) با میانگین 0/68 گرم می‌باشد که نسبت به شاهد با میانگین 0/27 گرم اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان می‌دهد. از طرفی مصرف کود نیتروژنی بدون تلقیح سبب کاهش معنی‌دار غده زنی و وزن غده نسبت به شاهد و سایر تیمارها شد.



شکل 6- مقایسه تیمارهای مختلف از نظر وزن غده‌ها

بحث و نتیجه‌گیری

در این آزمایش نقش تلقیح در افزایش عملکرد و عکس العمل گیاه به تلقیح به خوبی مشهود بود. با توجه به اینکه تمام شرایط کشت (نوع خاک و مواد غذایی) برای جدایه‌ها یکی بود اکثر گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند از طرفی بین خود جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری بر عملکرد مشهود بود. برترین جدایه‌های جدا شده در شرایط گلخانه و آب و هوایی کرج مربوط به جدایه‌های S_{20}، S_{16}، S_{11}، S_{13}، S_3 و S_9 بود. همچنین برای دستیابی به حداکثر پتانسیل تولید و همچنین تثبیت نیتروژن بایستی به تغذیه یونجه توجه جدی نمود. بسیاری از لگوم‌ها می‌توانند با ریزوبیوم‌ها همزیستی داشته باشند ولی زمانی از این همزیستی سود خواهند برد که ریشه‌ها در معرض ریزوبیوم‌های کارار و سازگار باشند تا در این همزیستی گرهک‌های کاملاً کارایی ایجاد شوند بنابراین جمعیت ریزوبیوم‌ها در خاک-های زراعی نقش کلیدی در تولید لگوم‌ها دارد (آمارگار،2001). با توجه به اینکه تراکم جمعیت با عواملی چون پ‌هاش، اشباع بازی، بافت خاک، مواد آلی، میانگین بارندگی و یا درجه حرارت ارتباط دارد هر چند بیشتر مواقع تفاوت‌هایی که در تراکم جمعبت دیده می-شود با استفاده از تغییرات ساده‌ای است که در پارامترهای محیطی رخ می‌دهد قابل تفسیر و توضیح نمی‌باشد آمارگار (2001). با توج به اینکه شرایط محیطی و کشت تا حد امکان یکسان سازی شده بود نشان داد بعضی از جدایه‌ها عملکرد بهتری نسبت به تغییرات آب و هوایی نشان دادند. نتایج این آزمایش نشان داد که کلیه باکتری‌ها توانایی خود را در ایجاد گره حفظ کرده بودند. اخیراً سویه‌های جداسازی شده از *Medicago ruthenica* که قادر به گره‌دار کردن *Phaseolus vulgaris* بودند در گونه جدیدی تحت عنوان *Rhizobium mongolense* جای گرفتند وانا برکوم و همکاران (1998).

در تحقیقی که توسط عسکری و همکاران (1390) بر تلقیح گیاه یونجه با جدایه بومی و استاندارد *ریزوبیوم ملیلوتی* انجام شد نشان داد که تلقیح باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد شد. همچنین اظهار کردند که اثرات مثبت تلقیح بر شاخص‌های وزنی ریشه بیش از سایر شاخص‌ها مشاهده گردید که با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد. ریزوباکترهای محرک رشد گیاهان PGPR به دو روش مستقیم و غیرمستقیم سبب رشد گیاهان می‌شوند. فرایندهای افزایش رشد به روش مستقیم شامل تثبیت نیتروژن، حل‌کردن فسفر غیرمحلول، جداکردن آهن توسط تولید سیدروفورها و تولید هورمون‌های گیاهی مثل اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، ژیبرلین‌ها و کاهش غلظت اتیلن می‌باشد. روش غیرمستقیم افزایش رشد گیاهی توسط PGPR شامل تولید آنتی‌بیوتیک، سنتز متابولیت‌های ضدقارچی، تولید آنزیم‌های لیزکننده دیواره سلولی قارچی و مقاومت نسبت به تنش‌های زیستی و غیرزیستی می‌باشد (احمد و همکاران، 2011). تلقیح سویا با *Rhizobium japonicum* و ذرت با *Pseudomonas putida* نیز باعث افزایش ارتفاع گیاه، تعداد گره، سطح برگ، وزن خشک کل و وزن دانه در هر گیاه نسبت به گیاه کنترل شده است (دادسون و همکاران، 1984؛ غلامی و همکاران، 2009). پنبه تلقیح‌یافته با *Azotobacter chroococcum* و *Azospirillum lipoferum* به ترتیب افزایش 21 و 5 درصدی محصول دانه و ارتفاع گیاه نسبت به گیاهان کنترل را نشان داد (انجوم و همکاران، 2007). مهم‌ترین مکانیسم تحریک رشد توسط جدایه‌های ریزوبیومی، تولید فیتوهورمون‌های ایندولی (IAA)

می‌باشد که نتیجه آن رشد بهتر ریشه، به دنبال آن افزایش جذب آب و عناصر غذایی (فسفر، نیتروژن و پتاسیم) توسط گیاه و افزایش رشد می‌باشد. باکتری‌های ریزوبیومی توانایی تولید این فیتوهورمون‌ها را دارند اما این توانایی در بین گونه‌های مختلف ریزوبیومی و نیز در بین جدایه‌های متعلق به هر گونه، یکسان نیست. بنابراین اثر گونه‌ها و جدایه‌های مختلف ریزوبیومی بر گیاهان متفاوت است (اعتصامی و همکاران، 2011)، همانطور که در این تحقیق نیز اثر جدایه بومی و استاندارد ریزوبیوم ملیلوتی بر گیاه یونجه متفاوت بود. تثبیت N2 نیز به عنوان یک سازوکار مؤثر در افزایش رشد گیاهان به دنبال تلقیح باکتریایی مطرح است (باشان و همکاران، 1989). علاوه بر این سه گونه، از گیاه یونجه کاشته شده در خاک‌های نسبتاً اسیدی (5<pH<6) اورگون آمریکا توسط اردلی و همکاران (1995) و همچنین در آرژانتین و اروگوئه توسط دل پاپا و همکاران (1999) نیز سویه‌هایی جدا شد که متعلق به یک گروه تاکسسونومیکی از ریزوبیوم‌های ناشناخته بود و سویه‌های این گروه روی یونجه و لوبیا گره‌های غیر مؤثر ایجاد کردند.

فهرست منابع:

۱. احیائی، م.ع. و بهبانی‌زاده، ع. ا. 1372. شرح روش‌های تجزیه شیمیائی خاک، جلد اول، نشریه شماره 893، موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران.

۲. خاوازی،ک. ح. رحیمیان، م.ج. ملکوتی و م. افشاری. 1385. وضعیت عناصر غذایی در خاک‌های زیر کشت یونجه در استان همدان، مجله خاک و آب. جلد 4، شماره 2، صفحه: 14-1.

۳. سپهری،م.1382. اثرات آلودگی خاک به کادمیوم بر رشد، توان گره زایی و تثبیت نیتروژن سویه‌های بومی سینوریزوبیوم ملیلوتی. پایان نامه کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه تهران. 179 صفحه.

۴. عسکری، م. حسین‌هانی هزاوه، ش. 1391. اثرات تلقیح باکتریایی ریزوبیوم ملیلوتی ***rhizobium meliloti*** بومی و استاندارد بر رشد گیاه یونجه (***Medicago sativa***) تحت آلودگی SO_2 هوا. مجله سلول و بافت. جلد 3، شماره 3، صفحه: 259-270.

5. Ahemad M, Khan MS. Functional Aspects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Recent Advance. Insight Microbio. 2011; 1(3): 39-54.
6. Amarger, N. (2001). Rhizobia in field. Advan. Agronomy. 73: 109-169.
7. Anjum MA, Sajjad MR, Akhtar N, et al. Response of cotton to Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) inoculation under different levels of nitrogen. Agri. Res. Pakistan 2007; 45(2):135-142.
8. Bashan Y, Levanony H, Mitiku G. Changes in proton efflux of intact wheat roots induced by Azospirillum brasilense Cd. Cana. J. of Microb. 1989; 35: 691-697.
9. Beck, D. P., Materon, L. A. and Afandi, F. (1993). Practical *Rhizobium* –Legume Technology Manual. Technical Manual No. 19, ICARDA, Syria.
10. Bockman, O. C. (1997). Fertilizers and biological nitrogen fixation as source of plant nutrients: perspectives for future agriculture. Plant Soil 194:11-14.
11. Brockwell, J., Bottomley, P. J., and Thies, J. E. (1995). Manipulation of rhizobia microflora for improving crop productivity and soil fertility a critical assessment. Plant Soil 174: 143-180.
12. Dadson RB, AcquaahG. Rhizobium japonicum, nitrogen and phosphorus effects on nodulation, symbiotic nitrogen fixation and yield of soybean (Glycine max (L.) Merrill) in the Southern Savanna of Ghana. Field Crops Res. 1984; 9:101-108.
13. Date, R. A., and Halliday, J. (1987). Collection, isolation, cultivation, and maintenance of Rhizobia. In: Elkan, G. H. (ed.). Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, New York.

14. Eardly, B. D., Wang, F. S., Whittam T. S., and Selander, R. K. (1995). Species limits in *Rhizobium* population that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Appl. Environ. Microbiol. 61: 507-512.
15. Etesami H, Alikhani H. Evaluation of plant growth hormones production (auxins) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes and the loss of chemical fertilizers. Agronomy Journal (Pajouhesh and Sazandegi). 2011; 92: 53-62.
16. Gholami A, Shahsavani S, Nezarat S. The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of Maize. World Academy of Sci. Engi. and Tech. 2009; 49: 19-24.
17. Peoples, M. B., Giller, K. E., Herridge, D. F., and Vessey, J. K. (2002). Limitations to biological nitrogen fixation as a renewable source of nitrogen for agriculture. In: Finan M. T., Mark, R. O., Layzell, D. B., Vessey, J. K., Newton, W. (eds.). Nitrogen Fixation: Global Perspectives, CABI Publishing, UK.
18. Peoples, M. B., Landha, J. K., and Herridge, D. F. (1995). Enhancing legume N_2-fixation through plant and soil management. Plant Soil 174:83-101.
19. Pierzyski, G. M., J. T. Sims, and G. F. Vance. 2000. Soil and Environmental quality.(2nd edition). CRC Press, Boca Raton,FL.
20. Shantharam, S., and Mattoo, A. (1997). Enhancing biological nitrogen fixation: an apprasial of current and alternative technologies of N input into plants. Plant Soil 194: 2055-216.
21. Spaink, H. P., A. Kondorsi and P. J. J. Hooykaas. 1998. The Rhizobiaceae Molecular Biology of model Plant-Associated Bacteria. Kluwer, Academic Press. PP.566.
22. Van Berkum, P., Beyene, D., Bao, G. P., Cambell, T. A., and Eardly, B. D. (1998). *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen –fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. Int. J. Syst. Bacteriol. 48: 13-22.
23. Vance, C. P. (1998). Legume symbiotic nitrogen fixation: Agronomic aspects. In: spaink, H. P., Kondorosi, A., and Hooykass, P.J.J. (eds.) The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant – Associated Bacteria. Kluwer Academic Press. Netherland.
24. Vance, C. P. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquistion: plant nutrition in a world of declining renewable resources. Plant Physiol. 127:390-397.
25. Zahran, H. H. (1999). *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under sever conditions and in an arid climate. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 968-989.