# بررسی غلظت نیتروژن و پروتئین کل سه رقم یونجه تلقیح شده تحت تنش شوری

**عاطفه فضائلی[1]، حسین بشارتی[2] و نجات پیرولی بیرانوند[3]**
1- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد دانشگاه زنجان
2- عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهران
3- عضو هیأت علمی پژوهشکده تحقیقات کشاورزی پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای کرج
atefehfazaeli@yahoo.com

## چکیده
به منظور مطالعه تلقیح باکتری سینوریزوبیوم‌ملیلوتی بر غلظت نیتروژن و میزان پروتئین کل اندام هوایی یونجه تحت تنش شوری آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی با سه سطح شوری (صفر، 6 و 12 دسی‌زیمنس بر متر شامل مخلوط نمک‌های $NaCl + CaCl_2 + MgCl_2$)، سه سطح باکتری (بدون باکتری، باکتری مقاوم به شوری و باکتری حساس به شوری)، سه رقم یونجه (همدانی، قره‌یونجه و قارقالوق) و در سه تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد با افزایش شوری غلظت نیتروژن و پروتئین کل اندام هوایی یونجه به طور معنی‌داری در سطح 1% کاهش یافت، درصورتیکه تلقیح باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی مقاوم به شوری منجر به افزایش معنی‌دار پارامترهای مذکور تحت تنش شوری شد. بین ارقام مختلف یونجه از لحاظ شاخص‌های اندازه‌گیری شده در شرایط شور تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

**کلمات کلیدی: پروتئین، سینوریزوبیوم ملیلوتی، شوری، یونجه**

## مقدمه
آب و خاک شور از مهمترین عوامل محدود کننده تولید محصول در مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می‌شوند (Pazira و Homaee، 2003). یونجه از جمله گیاهان نسبتاً حساس به شوری است، اما این لگوم تحمل کمتری به تنش شوری نسبت به ریزوبیوم همزیست خود دارد ( Zahran، 1999). آستانه تحمل به شوری یونجه 2 دسی‌زیمنس-بر متر است و ماکزیمم شوری که تحمل می‌کنند 16 دسی‌زیمنس‌بر متر است ( Shannon، 1984). ولی باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی 300 تا 700 میلی‌مولار NaCl را تحمل می‌کند (Embalomatis و همکاران، 1994). Cordovilla و همکاران (2003) در مطالعه روی 4 نمونه لگوم گزارش نمودند که تنش شوری از 50 تا 200 میلی-مولار با تأثیر منفی در رشد گیاه میزبان، باکتری، همزیستی بین آنها و بالاخره تثبیت نیتروژن، عملکرد را به طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار می‌دهد.

## مواد و روشها
قبل از شروع آزمایش گلخانه‌ای دو جدایه 59 (مقاوم به شوری) و 36 (حساس به شوری) انتخاب و در محیط کشت YMB[1] تکثیر شدند تا به بذور تلقیح شوند. درصد مؤثر بودن همزیستی[2] در جدایه شماره 59، 110/7% و در جدایه شماره 36، 122/3% بود.

[1]- Yeast Manitol Broth
[2]- Symbiotic Effectivness(SE)

آزمایش گلخانه‌ای کشت یونجه در قالب طرح کاملاً تصادفی به صورت فاکتوریل با سه سطح شوری (صفر، 6 و 12 دسی‌زیمنس بر متر شامل مخلوط نمک‌های $NaCl + CaCl_2 + MgCl_2$)، سه سطح باکتری (بدون باکتری، باکتری مقاوم به شوری، باکتری حساس به شوری)، سه سطح رقم یونجه (همدانی، قره‌یونجه و قارقالوق) و سه تکرار انجام گرفت. بذور سالم و هم‌اندازه (که با محلول اتانول 95% و هیپوکلریدسدیم 5% استریل سطحی شدند) در انکوباتور جوانه‌دار شدند. پس از آماده سازی گلدان‌ها با خاک غیر شور و غیر گچی با بافت متوسط ، به هر بذر 1 میلی‌لیتر مایه تلقیح ریزوبیومی تلقیح شد. گلدان‌ها تا مرحله ظهور برگ‌ها با آب معمولی آبیاری شدند و سپس تیمار شوری اعمال شد. نسبت سدیم جذب سطحی شده (SAR) در محلول با شوری 6 دسی‌زیمنس بر متر برابر 9/52 و در محلول با شوری 12 دسی‌زیمنس بر متر برابر با 9/47 بود. هر بار با در نظر گرفتن نیاز آبشویی گلدان‌ها آبیاری می‌شد تا EC آب خروجی از گلدان‌ها تقریباً برابر EC ورودی (تیمار مورد نظر) باشد (برین و همکاران، 1385). به دلیل اینکه بیشترین میزان تثبیت نیتروژن در مراحل اولیه گلدهی در گیاه یونجه رخ می‌دهد (Djilianov و همکاران، 2003)، گیاهان در مرحله شروع گلدهی در گیاه شاهد، برداشت و غلظت نیتروژن و پروتئین اندام هوایی اندازه‌گیری شد. غلظت نیتروژن از روش کجلدال اندازه‌گیری شد (Cottenie، 1980)، محتوی پروتئین با ضرب کردن نیتروژن کل در 6/25 محاسبه شد (Tawfik، 2008). نتایج بدست آمده به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح 5% مقایسه شدند. نتایج آزمایش توسط نرم‌افزار Mstat-C مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 1) نشان می‌دهد، تأثیر شوری، باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی و اثر متقابل آن‌ها بر غلظت نیتروژن و پروتئین اندام هوایی معنی‌دار ($P < 0/01$) گردید.

**جدول 1. تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده**

| منابع تغییر | درجه آزادی | غلظت نیتروژن | میزان پروتئین |
|---|---|---|---|
| (R)باکتری | 2 | 7/147** | 279/2** |
| (V)رقم | 2 | 0/004 | 0/16 |
| (S)شوری | 2 | 2/837** | 11/82** |
| R × V | 4 | 0/036 | 1/52 |
| S × R | 4 | 0/948** | 37/03** |
| S × V | 4 | 0/048 | 1/86 |
| S × V ×R | 8 | 0/027 | 1/05 |
| خطا | 52 | 0/020 | 0/08 |
| %CV | | 4/35 | 4/35 |

****،*: به ترتیب معنی‌دار در سطح 1 و 5 %**

مقایسه میانگین‌ها نشان داد (جدول 2) با افزایش شوری از صفر به 6 و 12 دسی‌زیمنس بر متر غلظت نیتروژن و پروتئین در اندام هوایی به ترتیب 8/6 و 18/11 درصد نسبت به شاهد کاهش یافت. Bernstein و همکاران (1966) اظهار داشتند که با افزایش شوری، درصد نیتروژن در گیاهان سویا و یونجه کاهش می‌یابد.

مقایسه میانگین عامل باکتری نشان می‌دهد (جدول 2) با تلقیح باکتری‌های سینوریزوبیوم ملیلوتی غلظت نیتروژن و پروتئین در اندام هوایی گیاه یونجه افزایش می‌یابد ولی اختلاف معنی‌داری بین سطح دوم و سوم باکتری تلقیح شده مشاهده نگردید به عبارت دیگر سطح دوم و سطح سوم باکتری به یک میزان غلظت نیتروژن و پروتئین را افزایش دادند و دلیل این امر را می‌توان به بیشتر بودن تحمل به شوری ریزوبیوم‌ها نسبت به لگوم‌های همزیستشان مربوط دانست. Tawfik (2008) گزارش داد ریزوباکترین تحمل شوری را در لوبیا چشم بلبلی با افزایش تجمع متابولیت‌های غیر سمی از قبیل قندها، پرولین، گلیسین‌بتائین بهبود بخشید.

اثر متقابل تلقیح باکتری و کاربرد شوری بر غلظت نیتروژن و پروتئین کل ($p < 0/01$) نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح مورد بررسی بود (جدول 1). مقایسه میانگین تیمارها (جدول 2) نشان دادند در تیمار بدون تلقیح باکتری، با افزایش شوری غلظت نیتروژن به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. ولی در گیاهان تلقیح شده با باکتری R36 با افزایش شوری از 0 به 6 دسی‌زیمنس بر متر کاهش غلظت نیتروژن معنی‌دار نبود ولی وقتی شوری از 6 به 12 دسی‌زیمنس بر متر افزایش یافت، کاهش معنی‌داری در مقدار نیتروژن مشاهده شد. بیشترین درصد نیتروژن در شرایط شوری 12 دسی‌زیمنس بر متر مربوط به باکتری R59 بود، این سویه از باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی توان تحمل شوری بالاتری نسبت به باکتری R36 داشته و لذا در شرایط شور برای تلقیح به ریشه یونجه این سویه پیشنهاد می‌شود. Bekki و همکاران (2006) ملاحظه نمودند با افزایش نمک، تثبیت نیتروژن توسط باکتروئیدهای جدا شده از گره‌های دو گونه یونجه M.ciliaris و M.sativa کاهش یافت، باکتروئیدهای جدا شده از گره‌های گونه M.ciliaris نسبت به شوری مقاومتر از گونه M.sativa بودند بنابراین در شرایط شور باکتری‌های جدا شده از گونه M.ciliaris را برای تلقیح به گیاهان توصیه کردند .

**جدول 2. مقایسه میانگین اثرات اصلی باکتری و شوری و اثرات متقابل باکتری و شوری بر شاخص های اندازه گیری شده در گیاه یونجه**

| تیمار | غلظت نیتروژن | میزان پروتئین |
|---|---|---|
| | درصد | |
| R0 | 2/68 b | 16/73 b |
| R36 | 3/53 a | 22/05 a |
| R59 | 3/60 a | 22/51 a |
| S0 | 3/59 a | 22/41 a |
| S6 | 3/28b | 20/51 b |
| S12 | 2/94 c | 18/37 c |
| $R_o$ S0 | 3/41 bc | 21/30 bc |
| $R_o$ S6 | 2/58 d | 16/13 d |
| $R_o$ S12 | 2/04 e | 12/75 e |
| R36S0 | 3/66 a | 22/87 a |
| R36 S6 | 3/62 a | 22/64 a |
| R36 S12 | 3/30 c | 20/64 c |
| R59 S0 | 3/69 a | 23/08 a |
| R59 S6 | 3/64 a | 22/75a |
| R59 S12 | 3/47 b | 21/7 b |

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل در یک حرف مشترک هستند، فاقد اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال 5% می‌باشند.

## نتیجه‌گیری

با افزایش شوری از صفر به 6 و 12 دسی‌زیمنس بر متر غلظت نیتروژن و پروتئین اندام‌های هوایی یونجه به طور معنی-داری کاهش یافت. تلقیح گیاهان لگومینوز با جدایه‌های بومی ریزوبیوم مقاوم به شوری و خشکی در شرایط نامساعد محیطی علاوه بر کاهش آلودگی محیط زیست، باعث بهبود رشد گیاه می‌شود، طبق نتایج حاصله تحت شرایط شوری، گیاهان تلقیح شده با باکتری R59 از درصد نیتروژن و پروتئین کل بالاتری نسبت به گیاهان شاهد برخوردار بودند، لذا در شرایط شور برای تلقیح به ریشه یونجه این سویه پیشنهاد می‌شود.

## منابع

برین م علی اصغرزاده ن و صمدی ع، 1385. اثر شوری حاصل از کلرید سدیم و مخلوط املاح بر غلظت پرولین و برخی شاخص های رشد گوجه فرنگی در همزیستی با قارچ های میکوریز آربوسکولار. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد 37، شماره 1. صفحه‌های 147تا 139.

Bekki A, Trinchant JC and Rigaud J, 2006. Nitrogen fixation ($C_2H_2$ reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. Plant Physiol 74:72 – 76.

Bernstein L and Ogata G, 1966. Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybeans and alfalfa. J. Agron 58:201-203.

Cordovilla MDP, Ocana A, Ligero F and Lluch C, 2003. Salinity on growth analysis and nutrient composition in four grain legumes-Rhizobium symbiosis. J. Plant Nutr 18: 1595-6109.

Cottenie A, 1980. Soil and plant testing as a basis of fertilizer recommendations. FAO Soils Bulletin 38/2, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 7–93.

Embalomatis A, Papacosta DK and KatinaKis P, 1994. Evaluation of *Rhizobium meliloti* strains isolated from indigenous population northen Greece. J.Agric Crop Sci 172: 73-80.

Djilianov D, Prinsen E, Oden S, Onckelen HV and Muller J, 2003. Nodulation under salt stress of alfalfa lines obtained after in vitro selection for osmotic tolerance. Plant Science 165: 887-894.

Pazira E and Homaee M, 2003. Salt affected resources in Iran extension and reclamation. Water-Saving Agriculture and Sustainable Use of Water and Land Resources. 855-865.

Shannon M, 1984. Breeding selection and the genetics of salt tolerance. In salt tolerance in plants, Salinity tolerance in plants. Strategies for Crop Improvement, eds. Staples RC Toenniessen GH Wiley, New York. pp. 300-308.

Tawfik KM, 2008. Evaluating the Use of *Rhizobacterin* on Cowpea Plants Grown under Salinity. Res J Agric Biol Sci 1:26-33.

Zahran HH, 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiol. Mol Biol Rev 63: 968-989.