عوامل موثر بر جمعیت Rhizobium meliloti خاک و تشکیل غده در مزارع یونجه

مجتبی یحیی‌آبادی، اکبر گندمکار و احمد موسوی

به ترتیب اعضای هیأت علمی و محقق مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان، مرکز تحقیقات کشاورزی صفی‌آباد دزفول و هیأت علمی و محقق مرکز تحقیقات کشاورزی اصفهان

مقدمه

گیاهان لگوم طی فرایندی که تثبیت ازت نام دارد از طریق همزیستی با باکتری‌های ریزوبیوم خاک ، می‌توانند ازت مورد نیاز خود را بدست آورند(۵). این فرآیند در درون گره‌های ریشه ای این گیاهان رخ می‌دهد. باکتریهای ریزوبیوم موجود در این غده‌ها ازت اتمسفر را به آمونیاک تبدیل می‌کنند(۷). پتانسیل تثبیت ازت مستقیماً به وجود باکتریهای ریزوبیوم کارآمد، گره سازی مؤثر و فاکتورهای رشد گیاه بستگی دارد. هر گونه شرایط نامساعد خاک یا تنش‌های محیطی که روی رشد گیاه اثر منفی دارند، باعث کندی فرآیند تثبیت ازت می‌شوند(۴). این فرآیند همچنین تحت تأثیر مقادیر ازت قابل استفاده در خاک می‌باشد. مقادیر بالای ازت خاک تثبیت ازت را کاهش می‌دهد زیرا لگوم ها قبل از اینکه شروع به تثبیت ازت اتمسفر نمایند ترجیحاً از ازت قابل استفادهٔ خاک مصرف می‌کنند. هنگامیکه ازت نیتراته خاک به بیش از ۳۵ کیلوگرم در هکتار برسد تشکیل گره بر ریشه محدود می‌شود. برعکس اگر میزان ازت خاک خیلی کم باشد رشد گیاه کاهش می‌یابد. در ابتدای تشکیل گره‌ها، لگوم ها نیاز به ۱۵ کیلوگرم در هکتار ازت از منابع دیگر دارند که معمولاً ازت باقیمانده در خاک، این نیاز آنها را برطرف می‌کند، در غیر اینصورت افزودن ۲۰ تا ۳۰ کیلوگرم در هکتار کودهای ازته لازم می‌باشد(۱). موفقیت ریزوبیوم در هریک از مراحل همزیستی، وابسته به این است که باکتری‌ها بتوانند تنش‌های محیطی مختلف را تحمل نمایند و با شرایط محیطی سازگاری داشته باشند(۶). در بسیاری از مناطق یونجه‌کاری استان اصفهان بدلیل تغییرات در خصوصیات خاک و مدیریت مزرعه در مناطق مختلف ، سیستم همزیستی لگوم- ریزوبیوم از کیفیت و درجه غده بندی متفاوتی برخوردار می‌باشد. این آزمایش به منظور بررسی برخی عوامل محدود کننده غده سازی ریشه یونجه در تعدادی از مزارع یونجه استان اصفهان پیشنهاد و به مورد اجرا گذاشته شد.

مواد و روش‌ها

غده های نمونه‌برداری شده از مزارع یونجه پس از شستشو و استریل شدن (با الکل ۹۶درصد و کلرید جیوه ۰/۱ درصد) در محیط سیلیکاژل نگهداری شد. بعضی خصوصیات خاک مثل وزن مخصوص ظاهری، بافت خاک، pH، EC درصد کربن آلی ، مقادیر عناصر ازت کل، فسفر و پتاسیم اندازه‌گیری شد. سپس درجه غده‌بندی در مناطق مختلف با استفاده از جدول طبقه‌بندی غده‌سازی وینسنت تعیین شد(۸). شمارش ریزوبیوم‌های خاک هر منطقه به روش MPN و براساس روش وینسنت(۱۹۷۰) انجام گردید (۸). براین اساس ابتدا پس ازله کردن غده‌های استریل شده در سرم فیزیولوژیک، آن را روی پلیت های حاوی YMA کشت داده و پس از خالص سازی، برای تهیه سوسپانسیون باکتری، آن را به محیط YMB تلقیح کرده سپس ارلن حاوی YMB و ریزوبیوم ملیلوتی به انکوباتور شیکردار منتقل شد . از طرفی بذور یونجه استریل شده با الکل، کلرید جیوه و آب مقطر استریل را که برروی آب- آگار ۱/۵ درصد جوانه زده ، داخل لوله اسلنت حاوی محیط غذایی Dilworth قرار می‌دهیم و ته لوله را با فویل آلومینیم پوشانده به اتاقک رشد منتقل گردید و سپس برای تست تأییدی غده زنی، سوسپانسیون تهیه شده به کنار بذرجوانه زده داخل اسلنت تزریق شد. به منظور تخمین جمعیت ریزوبیوم در خاک، از روش آلوده سازی ریشه گیاه در روشMPN استفاده شد. برای این کار از ناحیه ریزوسفر حدود ۲۰ گرم خاک در داخل ظرف پتری دیش که قبلاً در آون استریل شده بودند ریخته شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. از نمونه خاک ، ۶ سری رقت و هر سری در سه تکرار تهیه شد(۸).

در شمارش ریزوبیومها به روش MPN ، از طریقه آلوده کردن گیاه استفاده می‌شود. در این روش رقت‌های تهیه شده از خاک به لوله‌های حاوی بذر جوانه زده یونجه دراسلنتDilworth تلقیح شده ولوله‌هایی که گرهک در آنها تشکیل شده به عنوان لوله مثبت در نظر گرفته می‌شوند. برای انجام این کار از ۶ سری رقت (10^{-2} تا 10^{-7}) به

تعداد سه لوله در هر سری استفاده شد. پس از دو هفته انکوبه کردن لوله‌های تلقیح شده در اتاقک رشد، لوله‌های مثبت هر سری قرائت و MPN آنها با استفاده از جدول تعیین شد(۸).

نتایج و بحث

براساس ضرایب همبستگی ساده بدست آمده بین خصوصیات مختلف خاک و درجه گره‌بندی ریشه و جمعیت ریزوبیومها، پارامترهایی مثل وزن مخصوص ظاهری خاک و میزان فسفر و پتاسیم خاک، اثرات معنی‌دارتری از خود نشان دادند(جدول۱). براساس آنالیز رگرسیون چند مرحله‌ای (گام به گام) نتایج، میزان پتاسیم خاک در سطح یک درصد و مقدار وزن مخصوص ظاهری خاک در سطح پنج درصد با درجه گره‌سازی ریشه معنی‌دار می‌باشد. براساس معادله گام به گام بین مقادیر K وBD و جمعیت ریزوبیوم‌ها به روش MPN با استفاده از آنالیز رگرسیون چند مرحله‌ای ، مقدار پتاسیم خاک اثر مهمی برگره سازی ریشه و جمعیت ریزوبیوم‌ها دارد. از طرفی، آنالیز رگرسیون چند مرحله‌ای نشان داد که فسفر نیز تأثیر معنی‌داری بر جمعیت ریزوبیوم دارد. کمبود فسفر یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تثبیت ازت مولکولی محسوب می‌شود. گیاهانی که قادر به تثبیت ازت مولکولی هستند، در مقایسه با گیاهان مصرف کننده ازت معدنی، به مقادیر بیشتری از عنصر فسفر نیازمندند. (۳)

جدول(۱) ضرایب همبستگی ساده تعیین شده بین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و درجه غده سازی و جمعیت ریزوبیومها

پارامترها	EC dS/m	pH	OC	N	P	K	Clay	BD
			%		$mgKg^{-1}$		%	g/cm3
درجه غده سازی ریشه	-۰/۲۲	-۰/۰۴	۰/۴۱*	۰/۴۳*	۰/۴۳*	۰/۴۶**	۰/۱۶	-۰/۴۱*
جمعیت ریزوبیومها(MPN)	-۰/۳۲*	-۰/۱۶	۰/۳۷*	۰/۳۹*	۰/۵۶**	۰/۶۲**	۰/۲۰	-۰/۴۰*

.** و * -بترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد معنی‌دار است

منابع مورد استفاده

1-Biederbeck, V. 1995. Soil improvement with legumes including legumes in crop rotation. Canada-Saskatchewan Agreement on soil Conservation.

2-Collins, M., D. J. Lang and K. A. Kelling. 1986. Effects of phosphorus, potassium and sulfur on alfalfa nitrogen fixation under field condition. Agron. J. 78: 959-963.

3-Leung, K. and P. Y. Bottomley. 1987. Influence of phosphate on the growth and nodulation characteristic of Rhizobium trifolii. Appl. Environ. Microbiol, 53:2098-2105.

4-Lindemann, W.C. and C.R. Glover. 2003. Nitrogen Fixation by Legumes. Guide A-129. New Mexico State University.

5-Sprent, Janet, I. 1990. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall.

6-Valssak, M. and J. Vanderleyden. 1997. Factors influencing Knodule occupancy by inoculant rhizobia. Crit Rev. Plant. Sci. 16:163-229.

7-Vance, C. P. and P. H. Graham. 1997.16th. North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference. Vincent, J. M. 1982. Enumeration and Determination of Growth: 35-45.