

## بررسی تأثیر همزیستی سویه‌های سینوریزوبیوم ملیوتی بر سه گونه یونجه یکساله

مجید دشتی، ناصر خداپنده، حسین حیدری شریف‌آباد، عادل جلیلی<sup>۱</sup>

مصرف بی‌رویه کودهای نیتروژنی که خود متکی به منابع انرژی حاصل از سوخته‌های فسیلی است در طی نیم قرن اخیر صدمات جبران‌ناپذیری را بر طبیعت وارد ساخته است. با وجود این ۶۵ درصد از کل نیتروژن مصرفی در کشاورزی از طریق تثبیت بیولوژیک نیتروژن صورت می‌گیرد و این امر در تولید محصولات زراعی در کشاورزی پایدار حائز اهمیت است. گونه‌های مختلف یونجه‌های یکساله از طریق افزایش حاصلخیزی و بهبود کیفیت فیزیکی خاک و نیز از طریق کنترل علفهای هرز بر عملکرد غلات تأثیر مثبت می‌گذارند. متوسط افزایش سالانه ازت توسط یونجه‌های یکساله در مراتع جنوب استرالیا ۷۰ کیلوگرم تخمین زده شده است. لذا مسأله تثبیت نیتروژن در یونجه‌های یکساله بویژه در ارتباط با انتخاب سویه‌های مناسب باکتری باید بطور همه جانبه مورد بررسی قرار گیرد.

تأثیر نژادهای مختلف ریزوبیوم بر میزان همیشه یکسان نیست، برخی نژادها ازت بیشتری نسبت به سایرین تثبیت می‌کنند. دلیل این امر پیچیده بوده و عدم کارایی ممکن است تحت تأثیر فاکتورهای محیطی از جمله نور، حرارت، شرایط خاک (شوری pH، رطوبت و سطح عناصر غذایی) و یا برخی خصوصیات ژنتیکی باکتری قرار گیرد. سویه‌های مختلف *Sinorhizobium meliloti* قادرند گونه‌های مختلف یونجه، سنبله و شبدر شیرین را تلقیح نموده و در تشکیل غده‌های ریشه‌های تثبیت کننده ازت مؤثر باشند. این تحقیق اختصاص به بررسی تأثیر دو سویه ریزوبیوم بر رشد و تثبیت نیتروژن در سه گونه یونجه یکساله دارد. اهدافی که از این تحقیق دنبال می‌شود عبارتند از تعیین بهترین گونه یونجه یکساله که قادر به تولید گروه و تثبیت نیتروژن در حضور سویه‌های مورد آزمایش باشد و نیز مقایسه این سویه‌ها از نظر کارایی تثبیت نیتروژن.

این آزمایش در شرایط گلخانه انجام گرفت. گلدانها در شرایط نور طبیعی قرار داشتند. متوسط درجه حرارت محیط در طی دوره رشد گیاه  $25 \pm 4$  درجه سانتیگراد بود.  
گونه‌های یونجه یکساله شامل :

*Medicago polymorpha* ، *Medicago scutellata* cv.rabinson ، *Medicago truncatula* cv. jernalong

<sup>۱</sup> به ترتیب عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان خراسان، عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی کرج، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

تیمارهای باکتری شامل:

۱- سویه WSM540<sup>۱</sup>، ۲- سویه همدانی (جدا شده از خاک مزرعه یونجه واقع در فاصله ۱۰ کیلومتری همدان)، ۳- شاهد بدون باکتری و آبیاری با یک میلی مولار نیترات جهت تسهیل در جوانه‌زنی، بذور یکنواختی از نظر اندازه انتخاب و سطح آنها خراش داده شد. ضدعفونی سطحی بذور توسط اتانول و کلرور جیوه انجام گردید و سپس بذور با آب استریل شستشو داده شدند. به لحاظ احتمال وجود باکتریهای تثبیت کننده ازت و نیز مقدار زیاد ازت در خاک، کوارتز بعنوان بستر کشت انتخاب شد. ظرفیت نگهداری آب در کوارتز حدود ۱۶ درصد تعیین گردید. کیسه‌های کوارتز قبل از استفاده با آب جاری، کاملاً شسته شدند و سپس در اتوکلاو به مدت یکساعت، استریل گردیدند. پس از پر کردن گلدانها با کوارتز استریل (تا ۲ سانتی‌متر لبه بالائی گلدان)، سطح آنها کاملاً فشرده شد و گیاهچه‌های با طول ریشه کمتر از یک سانتی‌متر به فاصله مساوی از یکدیگر در داخل گلدانها نشا شدند. پس از اتمام عمل کاشت لایه نازکی از سنگریزه به قطر ۱/۵ سانتی‌متر در سطح گلدانها پخش شد. آبیاری کلیه گلدانها قبل از تلقیح باکتری با استفاده از آب استریل صورت گرفت. با تلقیح باکتری‌ها به منظور تعیین تعداد باکتریهای زنده در هر میلی‌لیتر عمل شمارش باکتریها با استفاده از روش رقیق‌سازی ترتیبی<sup>۲</sup> انجام گردید و تعداد باکتری<sup>۳</sup>  $10^9 \times 3$  عدد در هر میلی‌لیتر تعیین شد. کلیه گیاهچه‌هایی که با سویه‌ها ریزوبیوم تلقیح شدند با استفاده از محلول غذایی بدون ازت هوگلند<sup>۳</sup> و تیمارهای شاهد که قبلاً با باکتری تلقیح نشدند با استفاده از محلول غذایی کامل هوگلند (محتوی یک میلی‌مولار نیترات) آبیاری شدند. پس از تهیه محلولهای غذایی، pH آنها با استفاده از هیدروکسیم پتاسیم در ۶/۵ تنظیم شد. گلدانها روز در میان و در صورت نیاز هر روز آبیاری می‌شدند. ۶۰ روز پس از کاشت، گیاهان با دقت از گلدان خارج شدند و به تفکیک ریشه، اندام هوایی و گره جدا گردیدند. پس از شمارش گره‌های فعال، نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شدند. طرح آماری بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گردید.

اثر سویه‌ها ریزوبیوم بر وزن خشک اندامهای هوایی، تعداد گره، وزن خشک گره‌ها و میزان تثبیت نیتروژن معنی‌دار بود ( $P < 1\%$ ). بجز گونه *M. polymorpha*، گونه‌های دیگر یونجه عکس‌العمل خوبی به تلقیح با ریزوبیوم از خود نشان دادند. بیشترین وزن خشک اندامهای هوایی در گونه *M. scutellata* و با سویه تجارتي WSM540 حاصل گردید، اما بیشترین میزان تثبیت نیتروژن مربوط به گونه *M. truncatula* با سویه WSM540 بود. گیاهچه‌هایی که با یک میلی‌مولار نیترات آبیاری شدند دارای

<sup>1</sup> Nitri-life, Group A; Inoculant service, victoria, Australia

<sup>2</sup> Serial dilution

<sup>3</sup> Hoagland N-Free Nutrient Solution

وزن خشک و نسبت اندامهای هوایی به ریشه بالاتری در مقایسه با تیمارهای تلقیح سویه بودند. نتایج نشان دادند که نبت ۱/۸:۱ و ۱/۵:۱ در گونه‌های *M. truncatula* و *M. scutellata* که از طریق تثبیت ازت رشد کردند، حاکی از وجود تنش نیترژن در این گیاهان است. با وجود اختلاف معنی‌دار بین سویه‌های ریزوبیوم از نظر تعداد گره، وزن خشک گره‌ها اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. این امر به دلیل وزن خشک بیشتر هر گره در گونه *M. scutellata* می‌باشد. نتایج نشان دادند که گونه *M. truncatula* نسبت به گونه *M. scutellata* توانایی تولید گره زیادتری با سویه‌های مورد مطالعه دارد. افزایش تعداد گره در اثر تلقیح با سویه WSM540 منجر به افزایش معنی‌داری در میزان تثبیت نیترژن در مقایسه با سویه دیگر گردید. اما سوشها اختلاف معنی‌داری از حیث این صفت در گونه *M. truncatula* نداشتند.