مطالعه کارآئی همزیستی و تثبیت نیتروژن جدایه‌های فرانکیا در توسکای قشلاقی (*Alnus glutinosa*)

احسان کهنه [۱]، امیر لکزیان [۲]، علیرضا آستارائی [۳] و کاظم خاوازی [۴]
۱- دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ۲- استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ۳- دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، ۴- دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور کرج

چکیده
توسکای قشلاقی (*Alnus glutinosa*) از گونه‌های بومی سریع‌الرشد و با ارزش جنگل‌های هیرکانی است که اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی زیادی دارد. شناسایی جدایه های موثر فرانکیا، جهت افزایش استقرار، رشد و عملکرد درختان ضروری می باشد. بدین منظور ده گره ریشه‌ای فرانکیا از ریشه درختان توسکای قشلاقی در نقاط مختلف استان گیلان برداشت شد. سوسپانسیون گره‌ها در شرایط گلخانه‌ای به نهال‌های رشد کرده در شن استریل تلقیح شد. پس از ده هفته گیاهان برداشت شده و بیوماس اندام هوایی، میزان نیتروژن تثبیت شده و کارآیی همزیستی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که جدایه‌های فرانکیا اثر معنی داری بر خصوصیات مورد بررسی نهالها داشتند. بطوریکه تیمار AG۶ برترین جدایه شناخته شد و توانست وزن خشک اندام هوایی و میزان نیتروژن تثبیت شده را بترتیب ۱۴۸ و ۳۰۱ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش دهد. از نظر موثر بودن همزیستی نیز با جدایه AG۵ در گروه برتر قرار گرفت؛ بنابراین میتوان نتیجه‌گیری کرد که تلقیح با جدایه یا سویه‌های مناسب فرانکیا برای رشد بهتر و کمک به استقرار نهال‌های توسکا ضرورت دارد.

واژه‌های کلیدی: فرانکیا، توسکا، کارآیی همزیستی

مقدمه
در توده جنگلی بیشترین مقدار تثبیت بیولوژیکی نیتروژن به همزیستی گیاهان اکتینوریزایی نسبت داده شده که از این میان همزیستی فرانکیا با درخت توسکا اهمیت ویژه‌ای دارد. فرانکیا مهمترین همزیست توسکا می باشد بطوریکه بررسی ها نشان داده از هر ۶۰۰ هزار درخت توسکا فقط یکی فاقد گره است (Tremblay *et al*., ۱۹۸۴). در اثر همزیستی توسکا با فرانکیا گره‌های ریشه‌ای تشکیل شده که این گره‌ها محل تثبیت نیتروژن مولکولی و تأمین‌کننده نیتروژن مورد نیاز گیاه می‌باشد (Wolters *et al*.,۱۹۹۷). در خاکهای با نیتروژن کم، توسکا برای جذب و تامین نیتروژن مورد نیاز خود به فرانکیا وابسته است (Markham and Zekveld, ۲۰۰۷) و در شرایط کمبود عناصر غذایی از نظر نیترژون خودکفا هستند (Vares *et al*., ۲۰۰۴). به همین دلیل توسکاها در شرایط سخت بخوبی مستقر شده و زنده می مانند، بعلاوه سایر گیاهان غیراکتینوریزی نیز از این همزیستی سود می برند. مقادیر تثبیت بیولوژیکی ۱۳۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در سال توسط این همزیستی گزارش شده است (Newton *et al*.,۱۹۶۸، Binkley,۱۹۸۱). نیتروژن تثبیت شده از طریق بقایای برگی به خاک بازگشته (Huss-Danell and Frej, ۱۹۸۶) و باعث بهبود وضعیت نیتروژن خاک می‌شود (Binkley,۱۹۸۶).
توسکای قشلاقی با نام علمی *Alnus glutinosa* یکی از گونه‌های بومی سریع‌الرشد و با ارزش جنگل‌های هیرکانی است که به‌عنوان گونه پیشاهنگ در برنامه کلان جنگل‌کاری و احیاء جنگل‌های مخروبه شمال کشور اهمیت خاصی دارد؛ بنابراین با توجه به اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی این گونه، شناسایی روش‌های افزایش استقرار و عملکرد بیشتر این گونه ضروری است. متأسفانه تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با جداسازی، شناسایی و کاربرد فرانکیای بومی ایران انجام نشده است، لذا هدف از این تحقیق بررسی کارآیی همزیستی و میزان تثبیت نیتروژن جدایه‌های فرانکیا همزیست با توسکای بومی ایران جهت کمک به افزایش رشد و عملکرد گیاه میزبان است.

مواد و روش‌ها
به منظور تهیه مایه تلقیح فرانکیا تعداد ده گره جوان و فعال از ریشه‌های توسکای قشلاقی از نقاط مختلف استان گیلان برداشت شد. گره‌های جمع‌آوری شده در محفظه یخ به آزمایشگاه انتقال یافته و خاک چسبیده به گره‌ها به خوبی با آب شسته شد. گره‌ها به مدت یک دقیقه با محلول ضدعفونی کننده حاوی ۱% کلرین فعال و سپس آب اکسیژنه ۳۰% ضدعفونی سطحی شده و چندین بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. وزن مساوی از پره‌های هر گره با تیغ استریل جدا شده و داخل لوله اپندورف با آب مقطر استریل له شد ((Benson, ۱۹۸۲ سپس با محلول ساکارز ۲% به حجم رسانده شد (Reddell *et al*.,۱۹۸۸).

بذر توسکای قشلاقی به مدت ده دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم (۱% کلرین فعال) ضدعفونی شده و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد جوانه دار شدند (Wolters *et al.*,۱۹۹۷). بذر جوانه‌زده به گلدان پلاستیکی حاوی شن استریل منتقل شده و به صورت هفتگی تا یک هفته قبل از افزودن مایه تلقیح، با محلول غذایی با غلظت کم نیتروژن (یک چهارم) آبیاری شدند Hoagland and Arnon ۱۹۵۰)).

آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با دوازده تیمار و در سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل ده جدایه فرانکیا، شاهد بدون تلقیح فرانکیا و مصرف کود و شاهد با مصرف کود نیتروژنه به مقدار ۶/۵۲ میلی گرم در لیتربودند (Schrader و Graves۲۰۰۸) بعد از رسیدن نهال‌ها به سن شش هفته، حجم مساوی از هر مایه تلقیح به اطراف ریشه نهال اضافه شد. نهال‌های شاهد نیز حجم مساوی از سوسپانسیون استریل شده دریافت کردند (Reddell *et al.*,۱۹۸۸). دو هفته بعد از تلقیح و هر هفته تا زمان برداشت، نهال‌ها با محلول غذایی ۴/۱ هوگلند فاقد نیتروژن آبیاری شدند. بعد از ده هفته گیاهان برداشت شده، وزن خشک اندام هوایی، مقدار نیتروژن اندام هوایی به روش کجلدال و کارآیی موثر بودن همزیستی تعیین و اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین‌ها با بهره گیری از آزمون توکی در محیط SAS انجام شد.

نتایج و بحث

با تجزیه واریانس داده‌ها مشخص شد که جدایه‌های فرانکیا در سطح آماری یک درصد تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک اندام هوایی، تثبیت نیتروژن و کارآیی همزیستی نهال‌ها داشته اند (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که جدایه AG۶ با بیشترین وزن خشک اندام هوایی با سایر تیمارها تفاوت معنی داری دارد و نسبت به تیمار شاهد افزایش وزنی حدود ۱۴۸ درصد داشته است. اگرچه سایر تیمارها هم نسبت به شاهد باعث افزایش وزن خشک نهالها شده بودند اما این افزایش فقط در چهل درصد جدایه‌ها معنی دار بود (شکل ۱).

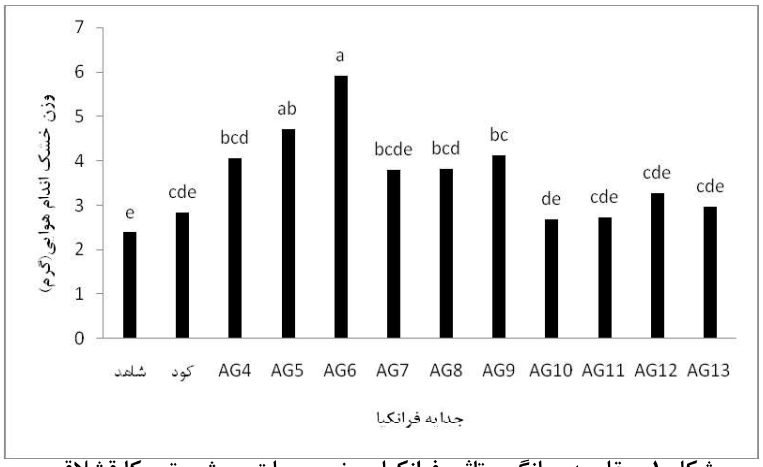
مقایسه میانگین مقادیر نیتروژن جذب شده نشان داد که فقط جدایه‌های AG۵، AG۶ و AG۹ باعث افزایش معنی‌دار جذب نیتروژن نسبت به شاهد شده اند، بیشترین مقدار نیتروژن هم توسط جدایه AG۶ تثبیت شده است که نسبت به شاهدها بترتیب ۳۰۱ و ۱۸۳ درصد افزایش داشته است (شکل ۲).

با مقایسه میانگین درصد موثر بودن همزیستی جدایه‌های فرانکیا مشخص شد که بجز جدایه‌های AG۱۰ و AG۱۱ که نسبتا موثر هستند سایر جدایه‌ها موثر می باشند و موثرترین جدایه، AG۶ می باشد که از نظر آماری فقط با جدایه AG۵ در یک گروه قرار دارد و با سایر جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری دارد (شکل ۳).

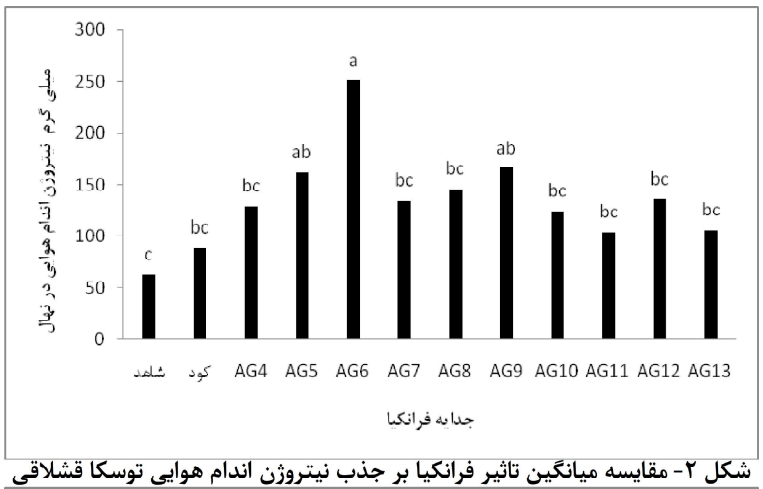
Schrader و Graves(۲۰۰۸) گزارش کردند که نهالهای توسکا *Alnus nitida* و *Alnus* maritime تلقیح شده با سوش‌های مختلف فرانکیا در مقایسه با نهالهای شاهد رشد بیشتری داشته و نیتروژن بیشتری را جذب کرده‌اند. Oliveira *et al*(۲۰۰۵) هم گزارش کردند که میزان تثبیت نیتروژن در نهال‌های توسکای قشلاقی تلقیح شده با جدایه‌های مختلف فرانکیا نسبت به نهال‌های شاهد بیشتر بوده است. براساس گزارش Sheppard *et al*(۱۹۸۸) تلقیح توسکای قشلاقی با چهار نوع مختلف فرانکیا باعث بهبود رشد گیاه و افزایش میزان جذب نیتروژن شده است. افزایش غلظت و میزان تثبیت بیولوژیکی نیتروژن بدنبال تلقیح فرانکیا میتواند بیانگر کارآیی ریزجانداران مورد استفاده باشد. افزایش غلظت عناصر غذایی در نهال‌های تلقیح شده هم می تواند بعنوان مزیتی برای مقاومت گیاه در برابر تنشهای محیطی مورد استفاده قرار گیرد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های فرانکیا بر پارامترهای مورد بررسی توسکای قشلاقی

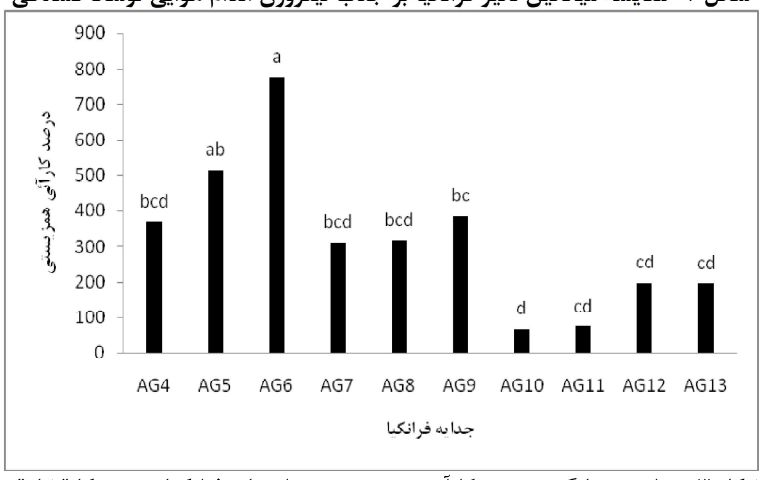
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		درجه آزادی	میانگین مربعات
		وزن خشک	نیتروژن		کارآیی همزیستی
جدایه فرانکیا	۱۱	۱۶/۳۴**	۸/۶۷۶۲**	۹	۷/۱۳۶۰۹۶**
خطای آزمایشی	۲۴	۵۵/۵	۱/۹۱۹	۲۰	۳/۱۱۶۰۳
ضریب تغییرات %		۳۲/۱۳	۵۲/۲۲		۶۵/۳۳



شکل ۱- مقایسه میانگین تاثیر فرانکیا بر خصوصیات رویشی توسکا قشلاقی



شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر فرانکیا بر جذب نیتروژن اندام هوایی توسکا قشلاقی



شکل ۳- مقایسه میانگین درصد کارآیی همزیستی جدایه‌های فرانکیا در توسکا قشلاقی

منابع

Wolters D.J., Akkermans A.D.L. and VanDijk C.۱۹۹۷. Ineffective Frankia Strains in wet stands of *Alnus Glutinosa* L. Gaertn. In the Netherlands, Soil Bio.Biochem., ۲۹(۱۱/۱۲):۱۷۰۷-۱۷۱۲

Newton M., ElHassen B.A. and Zavitkovski J.۱۹۶۸. Role of red alder in western forest succession. In: "Biology of Alder". U.S. Dep. Agric., For.Sev., Pacific Northwest For., Range Exp. Stn., Portland, Oregon, pp.۷۳-۸۳.

Binkley D.۱۹۸۱. Nodule biomass and acetylene reduction rates of red alder and Sitka alder on Vancouver Island, B.C., Canadian Journal of Forest Research, ۱۱: ۲۸۱-۲۸۶.

Binkley D.۱۹۸۶. Forest nutrition, Wiley, New York, ۲۹۰pp.

Benson D.R.۱۹۸۲. Isolation of Frankia Strains from Alder Actinorhizal Root Nodules, Appl. Environ. Microbiol. ۴۴(۲): ۴۶۱-۴۶۵.

Reddell P., Rosbrook P.A., Bowen G.O., Gwale D.۱۹۸۸. Growth response in casuarinas cunninghamiana planting inoculation with Frankia. Plant Soil, ۱۰۸: ۷۶-۸۶.

Hoagland D.R., Arnon D.I. ۱۹۵۰. The water culture method for growing plant without soil, Calif. Agric. Expt. Sta. Circ., ۳۴۷.

Huss-Danell K. and Frej A.K.۱۹۸۶. Distribution of Frankia in soils from forest and afforestation sites in northern Sweden, Plant and Soil, ۹۰: ۴۰۷-۴۱۸.

Oliveira R.S., Castro P.M., Ldodd J.C. and Vosatka M.۲۰۰۵. Synergistic effect of Glomus intraradices and Frankia spp.on the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline anthropogenic sediment. Chemosphere ۶۰: ۱۴۶۲-۱۴۷۰.

Schrader J.A., Graves W.R. ۲۰۰۸. Nodulation and Growth of *Alnus nitida* and *Alnus maritime* Inoculated with Species-speci c and Non-speci c Frankia. Journal of Environmental Horticulture,۲۶(۱):۲۹-۳۴.

Sheppard L.J., Hooker J.E.,Wheeler C.T. and Smith R.I.۱۹۸۸. Glasshouse evaluation of the growth of *Alnus rubra* and *Alnus glutinosa* on peat and acid brown earth soils when inoculated with four sources of Frankia. Plant and Soil, ll۰: ۱۸۷-۱۹۸.

Tremblay F.M., Nesme X.,and Lalonde M.۱۹۸۴.Selection and micropropagation of nodulating and non-nodulating clones of *Alnus crispa* (Ait.) Pursh. Plant and Soil, ۷۸, ۱۷۱-۱۷۹.

Markham J.H. and Zekveld C.۲۰۰۷. Nitrogen fixation makes biomass allocation to roots independent of soil nitrogen supply. Canadian Journal of Botany ۸۵: ۷۸۷-۷۹۳.

Abstract

Alnus glutinosa is native to the Hyrcanian forests and have many economic and ecological importance. Identification of Effective isolates of Frankia, is necessary to enhance the growth and yield of trees. Then we inoculated seedlings of *A. glutinosa* with Frankia isolated from ten root nodules of *A. glutinosa* in different locations of Guilan province, northern Iran. The seedlings were grown in pots filled with sterilized sand in a greenhouse. The shoot dry weight, $N_۲$-fixation and symbiotic effectiveness were measured ۱۰ weeks after inoculation. Analysis of variance revealed that Frankia isolates had significant effects on the growth and N contents of seedlings. The seedlings inoculated with AG۶ had the highest $N_۲$- xing capacity and S.E compared to control and the shoot dry weight and nitrogen content of seedlings was increased ۱۴۸ and ۳۰۱ percent respectively compared to the control. The results showed the importance of inoculation for the production of healthy, fast growing seedlings and clarify the advantages of inoculation with selected isolates of Frankia.

Keywords: Frankia, Alder, Symbiotic effectiveness