

تأثیر باکتری‌های سینوریزوبیوم (*Sinorhizobium* sp.) بر رشد، گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در گیاه شنبليله

سارا لركی و عبدالرضا اخگر¹

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ s.larki65@gmail.com

استادیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ arakhgar@yahoo.com

دریافت: 92/5/29 و پذیرش: 93/11/29

چکیده

لگوم‌ها گروه مهمی از گیاهان هستند که در سرتاسر جهان به عنوان محصولات غذایی و علوفه‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. این گیاهان می‌توانند نیاز نیتروژنی خود را از طریق ایجاد همزیستی با گروهی از باکتری‌ها که به باکتری‌های ریزوبیومی معروفند تامین نمایند. کاربرد سویه‌هایی از باکتری‌های ریزوبیومی به عنوان کودهای زیستی و به منظور افزایش تولید گیاهان لگوم یک روش مناسب در کشاورزی پایدار است. در این مطالعه ابتدا کارایی همزیستی تعداد 20 جدایه سینوریزوبیوم که از گره‌های گیاهان شنبليله جداسازی شده بودند تعیین گردید. نتایج نشان داد که 25 درصد از جدایه‌ها مؤثر، 30 درصد نسبتاً مؤثر و 45 درصد غیرمؤثر بودند. سپس در یک آزمون گلخانه‌ای تأثیر چهار جدایه منتخب شامل SR4، SR5، SR12 و SR16 (دارای بالاترین کارایی همزیستی) بر گره‌زایی، تثبیت نیتروژن و رشد گیاه شنبليله مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، تمام جدایه‌ها وزن خشک اندام هوایی و ریشه را نسبت به شاهد به طور معنی‌داری و به ترتیب بین 76 تا 110 و 17 تا 82 درصد افزایش دادند. همچنین تلقیح شنبليله با جدایه‌های سینوریزوبیوم باعث افزایش جذب عناصر نیتروژن، فسفر، آهن، روی و مس در اندام هوایی گیاه گردید.

واژه‌های کلیدی: تثبیت نیتروژن، سینوریزوبیوم، شنبليله، کارایی همزیستی

¹ نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، دانشگاه ولی عصر، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

مقدمه

امروزه در برنامه‌ریزی برای سیستم‌های کشاورزی پایدار، استفاده از همزیستی ریزوبیوم - لگوم ضرورتی اساسی تلقی می‌شود. تمام فواید این همزیستی و شرط اصلی برای این‌که بتوان از آن به‌عنوان جایگزین مناسب برای کودهای شیمیایی استفاده کرد این است که گیاه از ابتدای رویش در خاک به تعداد کافی از سویه‌های فعال و کاملاً مؤثر ریزوبیوم دسترسی داشته باشد، به‌طوری که سیستم همزیستی بتواند با حداکثر ظرفیت خود تثبیت نیتروژن را انجام دهد. برای تأمین این هدف، تلقیح باکتری‌های ریزوبیومی به بذر ضروری است (اسپانیک و همکاران، 1996). عوامل محیطی، وجود باکتری‌های بومی و کاربرد نیتروژن بیش از حد در این مسئله تأثیر بسزایی دارد (گراهام، 1981؛ وارگاس و همکاران، 2000). از عواملی که مقدار نیتروژن تثبیت شده را کنترل می‌کند می‌توان به نیتروژن قابل دسترس در خاک، سازگاری دو طرف همزیست و عوامل محیطی مثل رطوبت و دما اشاره کرد (زهران، 1999). تخمین زده شده است که حدود 65 درصد از نیتروژنی که در حال حاضر در کشاورزی مصرف می‌شود از طریق تثبیت بیولوژیک حاصل می‌شود و انتظار می‌رود که در آینده اهمیت بیشتری در این زمینه پیدا کند (شیخ و همکاران، 2000).

با این حال میزان نیتروژن تثبیت شده به تعداد و سازگاری باکتری‌ها و دسترسی به مواد معدنی که برای گره‌زایی و تثبیت نیتروژن مؤثر هستند، بستگی دارد (زهران، 1999). شنبليله در ایران به‌صورت خودرو در استان‌های اصفهان، اردبیل، لرستان، فارس، کرمان، سیستان و بلوچستان، خراسان، سمنان، آذربایجان شرقی و غربی یافت می‌شود. تقریباً در تمام قسمت‌های ایران، مدت‌هاست که شنبليله (*Trigonella foenum-graecum*) به عنوان سبزی و همچنین یک گیاه ادویه‌ای کشت می‌شود و سطحی در حدود 400 هکتار با عملکرد دانه 0/8 تن بر هکتار را به خود اختصاص داده است. بذور شنبليله به‌صورت محلی به عنوان رنگینه‌ی زرد با اهداف دارویی و آرایشی به‌کار می‌رود. همچنین از آنجایی که برگرداندن این گیاه به خاک می‌تواند باعث بهبود شرایط خاک شود، لذا به‌طور گسترده به‌عنوان کود سبز مورد استفاده قرار می‌گیرد (صادق‌زاده اهری و همکاران، 2010). همانند سایر لگوم‌ها، شنبليله نیز می‌تواند شرایط خاک را از طریق تثبیت نیتروژن اتمسفری با کاهش نیاز به کودهای نیتروژنه برای محصولات بعدی تغییر دهد (پتروپولوس، 2002). این گیاه میزان باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی می‌باشد. سیستم آنزیمی باکتری،

یک منبعی از نیتروژن تثبیت شده را برای گیاه میزبان فراهم می‌کند و گیاه نیز عناصر غذایی و انرژی را برای فعالیت‌های باکتری تأمین می‌نماید (دیلوورث و پارکر، 1969). عبدلگانی و همکاران (1999) نشان دادند که تلقیح گیاهان با باکتری‌های سینوریزوبیوم منجر به افزایش میزان پروتئین در گیاه شنبليله شده است. همچنین تلقیح بذور شنبليله با باکتری‌های سینوریزوبیوم سازگار و مؤثر می‌تواند منجر به بهبود شرایط و کیفیت بذر گردد. در تحقیقی دیگر که توسط بونیا و همکاران (2006) صورت گرفت مشخص شد که بیشترین عملکرد در تولید بذر و علوفه به گلدان‌های تلقیح شده با باکتری سینوریزوبیوم میلیوتی اختصاص داشت. همچنین بیشترین کارایی مصرف آب و جذب عناصر غذایی نیز در گلدان‌های تلقیح شده مشاهده گردید. خیریا و سای (2003) نیز گزارش کردند که کاربرد باکتری‌های سینوریزوبیوم میزان تولید بذر و وزن خشک اندام هوایی گیاه شنبليله را افزایش داد. به گزارش الشیخ و همکاران (2001) پاسخ شنبليله به کودهای بیولوژیک با توجه به رقم، کود و نوع خاک متفاوت بود و تلقیح این گیاه با سینوریزوبیوم منجر به افزایش وزن خشک اندام هوایی گردید.

هدف از این تحقیق تعیین کارایی همزیستی باکتری‌های سینوریزوبیوم میلیوتی جدا شده از گره‌های شنبليله و بررسی جدایی‌های مؤثر منتخب از نظر تثبیت نیتروژن، گره‌زایی و جذب عناصر غذایی جهت بهبود عملکرد این گیاه بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های سینوریزوبیوم از گره

ابتدا از مزارع مختلف زیرکشت شنبليله واقع در روستاها، شهرها و شهرستان‌های استان‌های کرمان و خوزستان گیاهانی که از رشد مناسبی برخوردار بودند، انتخاب شدند و پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه بیولوژی دانشگاه ولیعصر رفسنجان، ریشه‌ها با آب جاری به آرامی شسته و گره‌هایی که دارای رنگ صورتی یا قرمز، شاداب، درشت، و سفت‌تر از بقیه بودند انتخاب شدند. گره‌ها توسط پنس و قیچی همراه با کمی ریشه در اطراف گره (به منظور جلوگیری از ایجاد زخم و آلودگی)، از ریشه جدا شدند. برای ضدعفونی کردن، ابتدا گره‌ها به مدت پنج تا شش ثانیه در الکل اتیلیک 96 درصد و سپس سه دقیقه در محلول هیپوکلرور سدیم پنج درصد غوطه‌ور شدند و به منظور زدودن هیپوکلرور سدیم، گره‌های ضدعفونی شده برای چندین بار با آب مقطر استریل

گلخانه نگهداری شدند. در طول دوره رشد از محلول غذایی هوگلند (هوگلند و آرنون، 1950) فاقد نیتروژن به منظور تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه یونجه استفاده گردید. پس از گذشت این مدت وزن خشک اندام هوایی اندازه‌گیری و کارایی همزیستی با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید.

$$S.E = (T_2 - T_0) / (T_1 - T_0) \times 100$$

S.E = کارایی همزیستی

T2 = وزن خشک اندام هوایی گیاه تلقیح شده با جدایه‌ی

باکتری

T1 = وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار شاهد مثبت

(بدون جدایه همراه با کود نیتروژن)

T0 = وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار شاهد منفی

(بدون جدایه و بدون کود نیتروژن)

در ضمن به منظور مقایسه میزان تثبیت نیتروژن در تیمارهای مورد آزمون، مقدار نیتروژن موجود در اندام هوایی گیاه به وسیله دستگاه کجلدال اندازه‌گیری شد.

بررسی تأثیر باکتری‌های سینوریزوبیوم دارای کارایی

همزیستی بالا بر شاخص‌های رشد و جذب عناصر

بدین منظور یک آزمون گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً

تصادفی با پنج سطح باکتری شامل چهار باکتری

سینوریزوبیوم که در آزمون قبلی بیشترین کارایی همزیستی را از خود نشان دادند، همراه با شاهد بدون باکتری در سه تکرار انجام شد. جهت تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری، ابتدا باکتری‌ها بر روی محیط جامد YMA کشت داده شدند. سپس جدایه‌ها در محیط کشت مایع YMB بر روی شیکر با 150 دور بر دقیقه در دمای 26 درجه‌ی سلسیوس به مدت 72 ساعت رشد داده شدند.

به منظور اجرای آزمون گلخانه‌ای، گلدان‌های دو کیلوگرمی با یک خاک طبیعی (غیر استریل) و غیر شور با بافت لومی شنی پر شدند (جدول 1). پنج میلی‌گرم نیتروژن از منبع اوره (به‌عنوان استارتر) به هر کیلوگرم خاک اضافه شد. بذور شنبلیله با محلول هیپوکلرور سدیم پنج درصد استریل سطحی شده بر روی محیط آب - آگار جوانه‌دار شدند. در هر گلدان تعداد 15 عدد بذر جوانه‌دار شده کشت گردید. بذور شنبلیله در تیمارهای مربوطه با سوسپانسیون جدایه‌های برتر تلقیح شدند. در طول دوره‌ی رشد، آبیاری با آب مقطر و تا حد 70 درصد ظرفیت زراعی (به روش وزنی) انجام شد. پس از گذشت دو هفته از کشت و استقرار گیاهچه‌ها، در هر گلدان تعداد 10 گیاهچه که از نظر اندازه مشابه بودند نگه داشته شدند و بقیه از گلدان خارج گردیدند. پس از گذشت دو و نیم ماه و رسیدن گیاهان به مرحله‌ی گلدهی، گیاهان از قسمت

شسته شدند. آنگاه چند گره درشت‌تر، پس از جدا نمودن ریشه‌های همراه آن، به لوله‌های آزمایش کوچک حاوی یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم 0/85 درصد) انتقال داده و بوسیله میله شیشه‌ای استریل له شدند. 100 میکرولیتر از عصاره ایجاد شده داخل یک لوله اپندورف 1/5 میلی‌لیتری منتقل و 900 میکرولیتر آب مقطر استریل به آن اضافه گردید. سپس به کمک لوپ، مقداری از این سوسپانسیون روی محیط کشت YMA¹ (هر لیتر شامل 0/5 گرم عصاره مخمر، 10 گرم مانیتول، 0/2 گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، 0/5 گرم K_2HPO_4 ، 0/1 گرم NaCl، 2/5 میلی‌لیتر کنگورد یک درصد و 15 گرم آگار که در pH=6/8 تنظیم گردید) منتقل و به صورت خطی کشت گردید. پلیت‌های کشت شده به مدت پنج روز در گرم‌خانه در دمای 26 درجه سلسیوس قرار داده شدند. از بین کلنی‌های تشکیل شده، یک کلونی شاخص شیری رنگ و لزج انتخاب و پس از بازکشت، به محیط کشت شیب‌دار YMA حاوی سه درصد کربنات کلسیم منتقل و در دمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند.

بررسی توان گره‌زایی و تعیین کارایی همزیستی

باکتری‌های سینوریزوبیوم

یک آزمون گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل 20 باکتری سینوریزوبیوم و یک تیمار شاهد منفی (بدون باکتری سینوریزوبیوم) و یک تیمار شاهد مثبت (بدون باکتری همراه با کود نیتروژنی به میزان 50 میلی‌گرم نیتروژن بر کیلوگرم از منبع نترات آمونیوم) در 4 تکرار انجام گرفت. به منظور تهیه‌ی مایه تلقیح، محیط کشت YMB (محیط کشت YMA بدون آگار) به مقدار کافی و با توجه به تعداد تکرار و تیمار تهیه و درون ارلن‌ها توزیع و اتوکلاو گردید. تمام جدایه‌های سینوریزوبیوم خالص‌سازی شده به محیط کشت YMB درون ارلن‌ها تلقیح و به مدت 72 ساعت در دمای 26 درجه سلسیوس در 150 دور در دقیقه تکان داده شدند. به‌منظور آماده‌سازی بذرها جهت کشت، ابتدا بذره‌های هم اندازه‌ی گیاه شنبلیله انتخاب و پس از استریل سطحی با محلول هیپوکلرور سدیم 5 درصد و شستشوی مکرر، روی پلیت‌های حاوی آب - آگار² در دمای 20 درجه سلسیوس جوانه‌دار شدند. تعداد 12 بذر جوانه‌دار در هر گلدان 500 گرمی حاوی شن شسته شده با اسید و استریل کشت داده شدند. هر بذر با 300 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح و گلدان‌ها به مدت دو ماه در

1. YeastManitol Agar

2. Water Agar

نتایج و بحث

بررسی کارایی همزیستی جدایه‌های سینوریزوبیوم نتایج تجزیه واریانس نشان داد که جدایه‌های سینوریزوبیوم بر وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و تثبیت نیتروژن تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد داشتند (جدول 2). همان‌طور که نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان می‌دهد (شکل 1)، جدایه‌های SR4، SR5، SR12، SR16، SR18، SR19 و SR20 در تولید وزن خشک گیاه از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد مثبت نداشتند. بنابراین این جدایه‌ها می‌توانند در تولید کودهای بیولوژیک به‌عنوان جایگزین مصرف کودهای نیتروژنه به کار روند. همچنین تمام جدایه‌ها به استثنای SR1 سبب افزایش معنی‌داری در وزن خشک اندام هوایی نسبت به شاهد منفی گردیدند. بیشترین وزن خشک اندام هوایی توسط جدایه‌ی SR4 حاصل شد.

طوقه جدا و به منظور خارج کردن ریشه‌ها، گلدان‌ها در تشت آب قرار داده و با آب کاملاً شسته شدند. سپس گره‌ها شمارش گردیدند. بخش هوایی گیاهان و ریشه‌ها به‌طور جداگانه به مدت 48 ساعت در دمای 65 درجه سلسیوس در آون خشک شدند. نمونه‌های خشک شده بخش هوایی گیاه آسیاب و عصاره‌گیری انجام گردید. غلظت عناصر مختلف از جمله نیتروژن به وسیله دستگاه کجلدال، فسفر به روش رنگ‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، کلسیم، منیزیم، آهن، روی، مس و منگنز به‌وسیله‌ی دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (کوئینی، 1980). تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام گردید.

جدول 1- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه

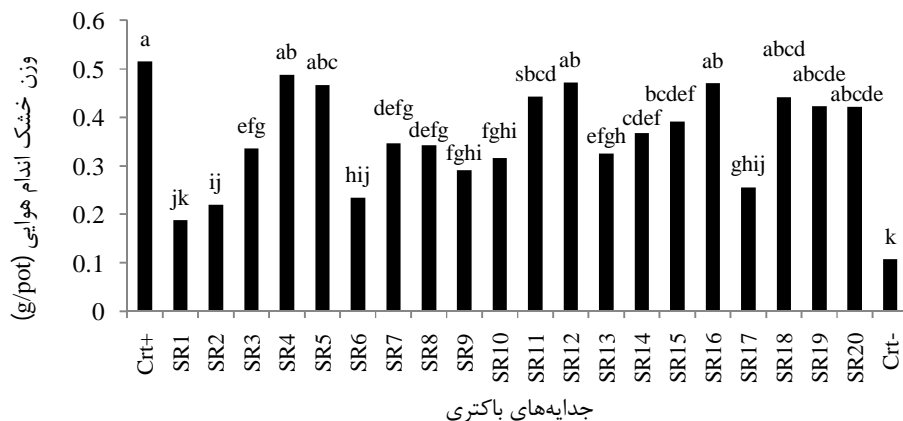
پارامتر	خصوصیت
بافت	لوم شنی
نیتروژن کل (درصد)	0/02
فسفر (میلی‌گرم در کیلوگرم)	6/4
پتاسیم (میلی‌گرم در کیلوگرم)	155
pH گِل اشباع	7/6
قابلیت هدایت الکتریکی (dS/m)	3/2
ماده آلی (درصد)	0/4
آهک (درصد)	9/3

جدول 2- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های سینوریزوبیوم بر وزن خشک اندام هوایی، ریشه و جذب نیتروژن در شنبليله

منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه	میانگین مربعات	جذب نیتروژن
جدایه	21	0/0472**	0/0040**		52/66**
خطا	66	0/0038	0/0004		3/18
ضریب تغییرات ¹	-	17/4636	20/6044		19/27

** معنی‌دار در سطح 1 درصد

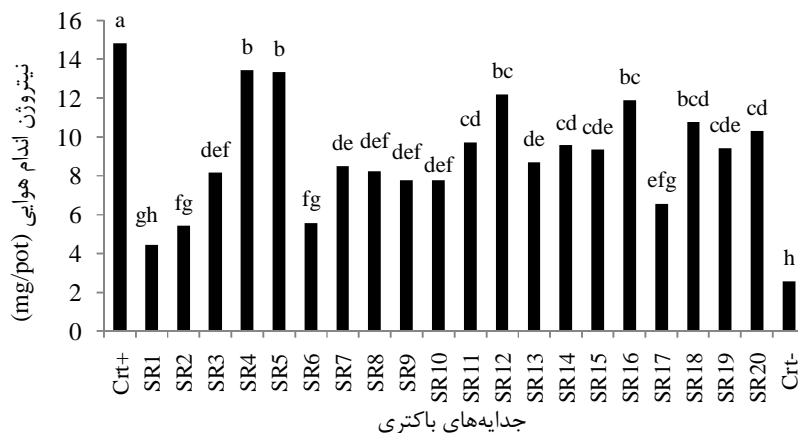
¹ Coefficient of variation



شکل 1- مقایسه میانگین اثر باکتری‌های سینوریزوبیوم بر وزن خشک اندام هوایی شنبلیله

که همزیستی جدایه‌های سینوریزوبیوم بومی و خارجی با یونجه یکساله، وزن خشک ساقه و ریشه را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. آنها همچنین نشان دادند اثر جدایه‌های سینوریزوبیوم بر تعداد گره در ارقام مختلف یونجه یکساله معنی‌دار بود.

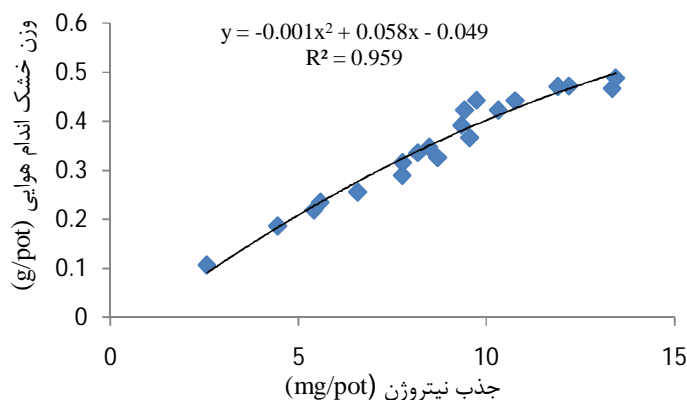
در بررسی‌های انجام شده توسط آتار و جانسون (1996) مشاهده شد که در یونجه‌های تلقیح شده با جدایه‌های سینوریزوبیوم، تشکیل گره، رشد و تثبیت نیتروژن افزایش معنی‌داری داشت. نتایج آزمایشگاهی عبدلگانی و همکاران (1999) نشان داد که تلقیح بذور شنبلیله با باکتری‌های سینوریزوبیوم سازگار و مؤثر می‌تواند منجر به بهبود عملکرد گردد. در آزمایشی که نی‌زاده و همکاران (1375) انجام دادند مشخص گردید



شکل 2- مقایسه میانگین جذب نیتروژن اندام هوایی شنبلیله تلقیح شده با باکتری سینوریزوبیوم

نظر میزان نیتروژن اندام هوایی در اثر کاربرد جدایه‌های مختلف باکتری وجود داشت و حداکثر و حداقل نیتروژن اندام هوایی به ترتیب از تیمارهای تلقیح‌شده با جدایه‌ی ریزوبیوم و شاهد بدست آمد.

نتایج مقایسه میانگین تأثیر تلقیح جدایه‌های سینوریزوبیوم بر تثبیت و جذب نیتروژن نشان داد که به استثنای جدایه SR1 تمامی جدایه‌ها سبب افزایش معنی‌دار جذب نیتروژن نسبت به شاهد منفی به میزان 111 تا 424 درصد گردیدند (شکل 2). یادگاری و همکاران (1384) نیز نشان دادند که اختلاف قابل ملاحظه‌ای ($P \leq 0/05$) از



شکل 3- رابطه رگرسیونی بین جذب نیتروژن و وزن خشک اندام هوایی شنبليله

از شهرستان جرجافک با کارایی همزیستی 3/9 درصد غیرموثرترین جدایه در همزیستی با گیاه شنبليله شناخته شد. این نتایج مشابه با نتایج زنگ و همکاران (2007) بر روی گیاه یونجه بود. آزمایش اوهارا و همکاران (2002) نشان داد که برای افزایش کارایی تلقیح و بهبود تولید بقولات باید جدایه‌هایی با توانایی بالا در تثبیت نیتروژن، قابلیت بقا در شرایط مزرعه‌ای و توان رقابتی بیشتر انتخاب شوند. زنگ و همکاران (2007) در تحقیق خود به منظور تعیین فاکتور مؤثر بودن همزیستی، وزن خشک اندام هوایی را معیار قرار داده و جدایه‌ای را که دارای بیشترین وزن خشک اندام هوایی بود را به عنوان جدایه‌ی با کارایی همزیستی بالا معرفی کردند. استفاده از آزمون فاکتور مؤثر بودن همزیستی به منظور تعیین جدایه‌های مؤثر در تثبیت نیتروژن روشی است که در اکثر کشورهای دنیا رایج می‌باشد (بارون و همکاران، 1999). رابطه همزیستی ریزوبیوم - لگوم تحت تأثیر عواملی قرار دارد که از مهم‌ترین آنها وجود نژاد مؤثر باکتری جهت ایجاد رابطه همزیستی است.

تلقیح گیاهان با سویه‌ی ریزوبیومی مناسب می‌تواند سبب افزایش زیست توده گیاه لگوم شود (زهران و اسپرنت، 1986). اگرچه وارگاس و همکاران (2000) ادعان داشتند وجود جمعیت بومی معادل 6×10^2 در خاک سبب عدم پاسخ به تلقیح شد. لیکن روبرت و اشمیت (1983) نشان دادند که سویه‌های کارآمدی که به عنوان مایه تلقیح استفاده شدند، حتی در حضور جمعیت بالای بومی خاک قدرت ایجاد غده‌ها را داشتند. مارابت و همکاران (2005) در بررسی خود در رابطه با کارایی همزیستی *Rhizobium gallicum* با لویا بیان داشتند که سویه‌های بومی با کارایی همزیستی بالا نسبت به سویه‌های تجاری سازگاری بالایی با شرایط محیطی

بین جذب نیتروژن و وزن خشک اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های سینوریزوبیوم همبستگی بالا و معنی داری ($R^2=0/96^*$) وجود داشت (شکل 3). همچنین بر مبنای نتایج مقایسه میانگین جذب نیتروژن اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های سینوریزوبیوم، بالاترین غلظت نیتروژن در تیمارهای تلقیح با جدایه‌های SR_{16} ، SR_4 ، SR_{12} ، SR_5 که بیشترین وزن خشک را داشتند بدست آمد. جدایه SR_1 نیز با کمترین میزان وزن خشک اندام هوایی و ریشه، کمترین میزان غلظت نیتروژن را به خود اختصاص داد. نتایج حاصل از تحقیق محمد و قمر (1998) بر روی رقم 37 از گیاهان دارویی یکساله در استرالیا نیز نشان داد که وزن خشک گیاه به طور معنی داری وابسته به غلظت نیتروژن بود ($r = 0/887$) و نتایج آزمایشات عیوضی و همکاران (1390) ($P < 0/001$) در گیاه شبدر و نخود نیز نشان داد که همبستگی معنی داری بین وزن خشک اندام هوایی و میزان نیتروژن تثبیت شده وجود داشت.

فاکتور مؤثر بودن همزیستی

فاکتور مؤثر بودن همزیستی یکی از معیارهای مهم در انتخاب جدایه‌های ریزوبیومی به منظور تهیه‌ی مایه تلقیح بوده و بیان‌گر توانایی تثبیت نیتروژن یک گیاه گره‌دار شده می‌باشد (یک و همکاران، 1993). با ارزیابی نتایج حاصل از فاکتور مؤثر بودن همزیستی جدایه‌های سینوریزوبیوم مورد آزمون مشخص شد که 25 درصد از جدایه‌ها مؤثر، 30 درصد نسبتاً مؤثر و 45 درصد غیرمؤثر بودند (جدول 3). جدایه‌های SR_4 ، SR_{12} ، SR_{16} ، SR_5 و SR_{18} با افزایش وزن خشک اندام هوایی شنبليله به ترتیب به میزان 87/2، 86/8، 85/9 و 78/3 درصد، بیشترین کارایی همزیستی را داشتند. در ضمن جدایه‌های SR_7 ، SR_{11} ، SR_{14} ، SR_{15} ، SR_{19} و SR_{20} به عنوان جدایه‌های نسبتاً مؤثر شناخته شدند. همچنین جدایه SR_1

داشته و عملکرد گیاه را هم در گلخانه و هم در مزرعه برابر یا حتی بیشتر از کاربرد کود نیتروژن افزایش دادند.

جدول 3- مؤثر بودن همزیستی جدایه‌های سینوریزوبیوم

تیمار	محل نمونه برداری	S.E (%)	کارایی همزیستی
SR ₁	جرجافک	3/9	غیر مؤثر
SR ₂	سرتخت	9/4	غیر مؤثر
SR ₃	دره جوز	47/4	غیر مؤثر
SR ₄	بافت	91/8	مؤثر
SR ₅	سرجاس	85/9	مؤثر
SR ₆	گز آباد 1	17/8	غیر مؤثر
SR ₇	گز آباد 2	50/5	نسبتاً مؤثر
SR ₈	داوران	49/3	غیر مؤثر
SR ₉	کنار پیر	34/1	غیر مؤثر
SR ₁₀	آخوندان 1	41/7	غیر مؤثر
SR ₁₁	آخوندان 2	71/4	نسبتاً مؤثر
SR ₁₂	جاده باغات	87/2	مؤثر
SR ₁₃	اول شوشتر	4/4	غیر مؤثر
SR ₁₄	اندیمشک	56/6	نسبتاً مؤثر
SR ₁₅	گمبوعه	56/4	نسبتاً مؤثر
SR ₁₆	کیمه / رامهرمز	86/8	مؤثر
SR ₁₇	کلالک / شوشتر	24	غیر مؤثر
SR ₁₈	اهواز / آخر آسفالت	78/3	مؤثر
SR ₁₉	گمبوعه 2	73	نسبتاً مؤثر
SR ₂₀	گمبوعه 3	72/8	نسبتاً مؤثر

بالایی از خود نشان دادند) شامل SR₅، SR₁₂، SR₁₆ و SR₄ در کشت درون خاک نشان داد که این باکتری‌ها تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک اندام هوایی، تعداد گره و وزن خشک ریشه گیاه شبلیله داشتند (جدول 4).

تأثیر کاربرد باکتری‌های سینوریزوبیوم منتخب بر برخی صفات رشدی و تولید گره در شبلیله نتایج تجزیه واریانس کاربرد باکتری‌های منتخب (باکتری‌هایی که در آزمون مؤثر بودن همزیستی کارایی

جدول 4- تجزیه واریانس تأثیر باکتری‌های سینوریزوبیوم منتخب بر برخی صفات رشدی و تولید گره

میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی	تعداد کل گره	وزن خشک ریشه
جدایه	4	0/059**	25073*	0/029*
خطا	10	0/001	2688/46	0/004
ضریب تغییرات	-	7/080	38/96	21/070

***، *، به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح یک و پنج درصد می‌باشند

داد (p < 0/01). در حالی که جدایه‌های SR₁₂، SR₄ و SR₅ با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (p > 0/01). بیشترین میانگین وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار SR₁₆

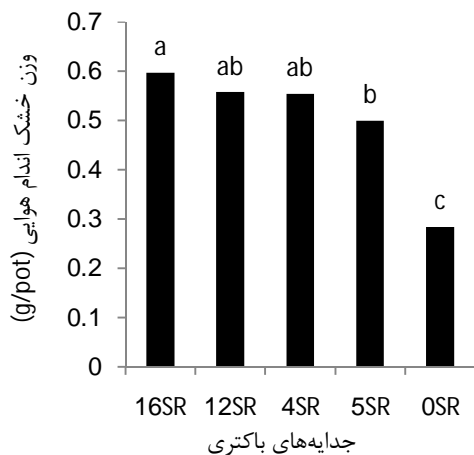
همان‌طور که در شکل پنج مشاهده می‌گردد، کاربرد جدایه‌های مورد مطالعه، وزن خشک اندام هوایی گیاه شبلیله را نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش

گره‌ها معیار مناسبی برای ارزیابی کارایی سویه‌ها نبوده و از این پارامتر فقط می‌توان برای تعیین توان گره‌زایی استفاده کرد. در مقابل، وزن اندام هوایی معیار مناسب‌تری برای ارزیابی میزان تثبیت نیتروژن به شمار می‌رود. اگر چه در اکثر مواقع تعداد زیاد گره برای گیاهان لگوم سودمند (فیزون و اسپرنت، 1982) و نشانه‌ی گره‌بندی موفق است و برای تثبیت نیتروژن کافی در طول دوره‌ی رشد گیاه ضروری می‌باشد (شیهی و همکاران، 1988). پرنیرا و همکاران (1993) بیان کردند که احتمالاً تعداد بیشتر گره‌ها از توانایی بیشتر در گره‌بندی نتیجه می‌شوند که یک عامل ژنتیکی در هم‌زیستی ریزوبیوم- لگوم می‌باشد. تعداد گره بیشتر، گیاه را قادر می‌سازد تا نیتروژن اتمسفری بیشتری را تثبیت کند.

تأثیر کاربرد باکتری‌های سینوریزوبیوم دارای کارایی

هم‌زیستی بالا بر جذب عناصر غذایی

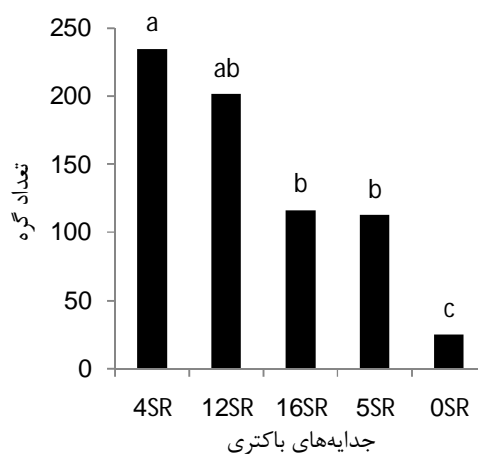
تجزیه واریانس کاربرد باکتری‌های منتخب بر جذب عناصر غذایی توسط گیاهان شبلیله نشان داد که این جدایه‌ها تأثیر معنی‌داری در سطح یک درصد بر جذب عناصر پر مصرف و کم مصرف داشتند (جدول 5 و 6).



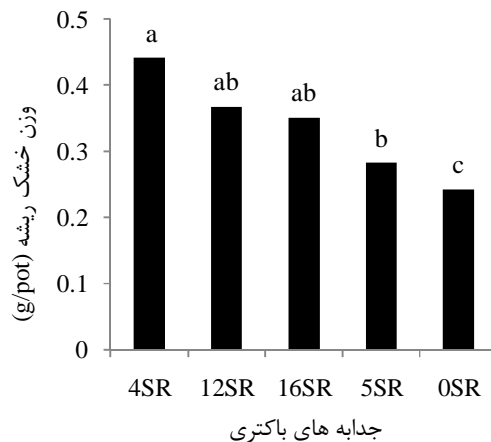
شکل 5 - تأثیر کاربرد باکتری‌های منتخب بر وزن خشک اندام هوایی در شبلیله

بود. افزایش در وزن خشک گیاه ممکن است ناشی از تأثیر باکتری‌ها در فراهم کردن نیتروژن بیشتر برای گیاه و همچنین آزادسازی برخی ترکیبات توسط این باکتری‌ها باشد (داکورا، 2003). همچنین جدایه‌ی SR₄ با وجود داشتن بیشترین تعداد گره و وزن خشک ریشه، وزن خشک بخش هوایی کمتری نسبت به جدایه‌های SR₁₂ و SR₁₆ داشت که علت آن می‌تواند تفاوت در تخصیص مواد فتوسنتزی باشد (خزاعی و همکاران، 1387). به طوری که گیاهانی که با جدایه‌ی SR₄ تیمار شدند، به امید دستیابی به نیتروژن زیستی بیشتر، بخش بیشتری از مواد فتوسنتزی خود را صرف تولید گره‌ها کردند. به همین دلیل وزن خشک بخش هوایی آنها کاهش اما وزن ریشه‌ی آنها افزایش پیدا کرد.

بنابراین تولید بیشتر گره و وزن بیشتر ریشه برای گیاهان تلقیح شده با این جدایه، منجر به صرف بیشتر مواد فتوسنتزی شده و وزن خشک اندام هوایی کاهش یافته است. هریچ و دانسو (1995) عنوان کردند که برخی از سویه‌های ریزوبیومی تثبیت کننده نیتروژن با وجود تولید گره‌های بیشتر و وزن گره زیاده‌تر، از میزان تثبیت نیتروژن پایینی برخوردارند و این موضوع را به کارایی نسبی پایین گره‌ها نسبت دادند. بنابراین به نظر می‌رسد تعداد و وزن



شکل 4- تأثیر کاربرد باکتری‌های منتخب بر تعداد گره در ریشه شبلیله



شکل 6- تأثیر کاربرد باکتری‌های منتخب بر وزن خشک ریشه در شنبليله

جدول 5- تجزیه واریانس تأثیر باکتری‌های سینوریزوبیوم منتخب بر جذب عناصر پرمصرف توسط گیاه شنبليله

میانگین مربعات					منابع تغییر
فسفر	منیزیم	کلسیم	نیترژن	درجه آزادی	
0/018**	0/32**	40/48**	36/47**	4	جدایه
0/003	0/033	6/23	2/50	10	خطا
15/780	13/210	12/87	12/23	-	ضریب تغییرات

*، * نشان دهنده معنی دار بودن در سطح یک درصد می‌باشند

جدول 6- تجزیه واریانس تأثیر باکتری‌های سینوریزوبیوم منتخب بر جذب عناصر کم

میانگین مربعات					منابع تغییر
آهن	مس	روی	منگنز	درجه آزادی	
0/00046**	0/0000137**	0/000451**	0/000853**	4	جدایه
0/00006	0/000006	0/000066	0/000047	10	خطا
19/37418	13/6574027	31/471042	11/484520	-	ضریب تغییرات

*، * نشان دهنده معنی دار بودن در سطح یک درصد می‌باشند

شد. این افزایش برای کلسیم، فسفر و منیزیم در سطح یک درصد معنی دار شد. در جذب کلسیم تنها جدایه‌های SR₁₂ و SR₁₆ و در جذب منیزیم جدایه‌ی SR₁₂ تفاوت معنی داری را با شاهد نشان دادند که از این میان، بیشترین جذب کلسیم (164/28 درصد) و منیزیم (42/58 درصد) مربوط به جدایه‌ی SR₁₂ بود. تمامی جدایه‌ها توانستند جذب فسفر اندام هوایی را نسبت به تیمار شاهد افزایش دهند. به طوری که جدایه‌های SR₁₂ و SR₁₆ به ترتیب 141/6 و 97/6 درصد، جذب فسفر را نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند. چاندر (2000) گزارش کرد کاربرد باکتری سینوریزوبیوم باعث افزایش غلظت نیترژن و فسفر در بخش هوایی و بذر شنبليله شد که این احتمالاً مربوط به افزایش میزان تثبیت نیترژن توسط این باکتری‌ها و دسترسی بیشتر به عناصر غذایی بوده است.

تأثیر کاربرد هر یک از جدایه‌های سینوریزوبیوم بر جذب نیترژن اندام هوایی گیاه شنبليله نشان داد که این جدایه‌ها توانستند جذب نیترژن بخش هوایی گیاه را نسبت به تیمار شاهد افزایش دهند و از نظر آماری اختلاف معنی داری را در سطح یک درصد ایجاد نمایند (جدول 7). از میان جدایه‌های به کار رفته، جدایه‌ی SR₁₆ با بیشترین مقدار (122/48 درصد) جذب نیترژن را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. بعد از آن جدایه‌ی SR₁₂ منجر به افزایش جذب نیترژن به میزان 109 درصد شد. به نظر می‌رسد این جدایه‌ها از طریق افزایش در تولید گره و افزایش کارایی همزیستی باعث افزایش جذب نیترژن در گیاه شنبليله شده باشند. همچنین با توجه به نتایج درج شده در جدول چهار، کاربرد این جدایه‌ها باعث افزایش معنی داری در جذب کلسیم، منیزیم و فسفر اندام هوایی

جدول 7- مقایسه میانگین کاربرد باکتری‌های مؤثر بر جذب عناصر غذایی پرمصرف

تیمار	نیتروژن	فسفر	منیزیم	کلسیم
SR ₄	14/130a	0/3653a	1/0173c	3/861b
SR ₅	14/540a	0/3866a	1/272bc	3/959b
SR ₁₂	14/548a	0/5050a	1/922a	9/538a
SR ₁₆	15/467a	0/4130a	1/413b	8/629a
SR ₀	6/952b	0/2090b	1/348bc	3/609b

جدول 8- مقایسه میانگین کاربرد باکتری‌های مؤثر بر جذب عناصر غذایی کم‌مصرف

تیمار	آهن	منگنز	مس	روی
SR ₄	0/04a	0/062ab	0/006ab	0/028a
SR ₅	0/046a	0/059b	0/005b	0/03a
SR ₁₂	0/049a	0/073a	0/007ab	0/031a
SR ₁₆	0/05a	0/074a	0/007a	0/034a
SR ₀	0/02b	0/032c	0/002c	0/004b

پارامترهای رشد و عملکرد نخود در اثر تلقیح با باکتری‌های ریزوبیومی را به اثرات تجمعی شامل افزایش ذخیره‌ی مواد غذایی مانند نیتروژن و فسفر در گیاه و تولید مواد محرک رشد به‌وسیله‌ی این میکروارگانیسم‌ها نسبت دادند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی می‌توان گفت که استفاده از باکتری‌های سینوریزوبیوم بر روی اغلب صفات تأثیر معنی‌داری داشته و باعث افزایش عملکرد گیاه شبلیله شده است. از میان باکتری‌های مورد مطالعه، انتخاب جدایه‌های مؤثر SR₄، SR₁₂، SR₁₆ و SR₅ در مرحله‌ی تعیین کارایی همزیستی در مقایسه با تیمار شاهد، حاکی از برتری این جدایه‌ها در تولید ماده خشک گیاهی بوده است. همچنین نتایج حاصل از ارزیابی تأثیر جدایه‌های منتخب بر شاخص‌های رشد، تثبیت نیتروژن و جذب عناصر، تفاوت معنی‌داری را با تیمار شاهد نشان داد. در تولید ماده خشک اندام هوایی جدایه SR₁₆ و در جذب عناصر جدایه‌های SR₁₆ و SR₁₂ کارآمدترین جدایه‌ها شناخته شدند.

بر اساس نتایج مقایسه میانگین (جدول 8) جدایه‌های سینوریزوبیوم جذب آهن، منگنز، روی و مس را نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند و این افزایش برای تمامی جدایه‌ها در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. در جذب آهن، جدایه SR₁₆ بیشترین میزان جذب (150 درصد) را نسبت به تیمار شاهد دارا بود. در جذب منگنز، مس و روی نیز جدایه SR₁₆ به ترتیب با افزایش 131، 250 و 750 درصد نسبت به تیمار شاهد بیشترین جذب را در بخش هوایی گیاه ایجاد کرد؛ به طوری که این افزایش در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. تحقیقات نشان داده است که تلقیح گیاهان لگوم با باکتری‌های ریزوبیومی و فرآیند تثبیت نیتروژن می‌تواند اثرات مثبتی بر رشد گیاه و در نهایت قابلیت دسترسی به عناصر غذایی و در نتیجه بهبود کیفیت تغذیه‌ای اجزای مختلف گیاه داشته باشد (رودلاس و همکاران، 1999). در مطالعه‌ای که توسط داکیدمی و همکاران (2011) بر روی گیاه لوبیا صورت گرفت مشاهده شد که تلقیح با ریزوبیوم به‌طور معنی‌داری جذب منیزیم، آهن، روی و مس را نسبت به تیمار بدون تلقیح در مزرعه و گلخانه افزایش داد. همچنین تلقیح با باکتری‌های ریزوبیومی جذب تمامی عناصر مذکور را در ریشه افزایش داد. زایدی و همکاران (2003) نیز افزایش در

فهرست منابع:

1. خزاعی، ح.، پارسا، م.، حسین پناهی، ف. 1387. اثرات تلقیح نژادهای بومی ریزوبیوم بر گره‌زایی ژنوتیپ‌های دسی و کابلی نخود تحت رژیم‌های مختلف رطوبتی در مرحله رشد رویشی (*Cicer arietinum L.*). مجله پژوهش‌های زراعی ایران، جلد 6، شماره 1: صفحه 89-97.

2. عیوضی، ع. ر.، فجری، ا.، رضازاد، م.، سلیمان‌پور، م. و رضایی، م. 1390. ارزیابی توانایی تثبیت زیستی نیتروژن در سویه‌های ریزوبیوم همزیست با بقولات در استان آذربایجان غربی. فصلنامه علوم زراعی ایران، جلد 13 (شماره 4)، 627-641.
3. نبی‌زاده، ا.، خدا بنده، ن.، حیدری شریف آبادی، ح. و حبیبی، د.ع. 1375. بررسی تثبیت ازت در یونجه‌های یکساله گونه (Rigidula). دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج. دانشکده کشاورزی. پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد.
4. یادگاری، م.، قاسمی پیربلوطی، ع.، اله دادی، ا.، اکبری، غ. 1384. بررسی توان تثبیت نیتروژن توسط ایزوله‌های مختلف باکتری ریزوبیوم فازنولی در لوبیا چیتی و قرمز در منطقه شهرکرد. مشهد مقالات اولین همایش حبوبات. 381-383.
5. Abdelgani, M.E., Elsheikh, E.A.E. and Mukhtar, N.O. 1999. The effect of Rhizobium inoculation and chemical fertilization on seed quality of fenugreek. Food Chemistry. 64(3):289-293.
6. Athar, M. and Johnson, D.A. 1996. Influence of drought on competition between selected Rhizobium meliloti strains and naturalized soil rhizobia in alfalfa. Plant and Soil 184 (2):231-241.
7. Barron, J.E., Pasini, R.J., Davis, D.W., Stuthman, D.D. and Graham, P.H. 1999. Response to selection for seed yield and nitrogen (N₂) fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Field Crops Research 62(2-3):119-128.
8. Beck, D.P., Materon, L.A. and Afandi, F. 1993. Practical rhizobium-legume technology manual. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas.
9. Bhunia, S.R., Chauhan, R.P.S., Yadav, B.S. and Bhati, A.S. 2006. Effect of phosphorus, irrigation and Rhizobium on productivity, water use and nutrient uptake in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.). Indian Journal of Agronomy 51(3): 239-241.
10. Cottenie, A. 1980. Methods of Plant Analysis. In: Soil and Plant Testing. FAO Soils Bulletin 38:64-100.
11. Chandra, K., Divakara Sastry, E.V. and Singh, D. 2000. Genetic variation and character association of seed yield and its component characters in Fenugreek. Agriculture Science Digest 20(2):93-95.
12. Dakora, F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. New Phytologist 158(1):39-49.
13. Dakidemi, P.A., Bambara, S. and Makoi, J.H.J.R. 2011. Micronutrient uptake in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by Rhizobium inoculation, and the supply of molybdenum and lime. Faculty of Applied Science 4(1):40-52.
14. Dilworth, M.J. and Parker, C.A. 1969. Development of the nitrogen fixing system in legumes. Journal of Theoretical Biology 25(2):208-218.
15. Elsheikh, E.A.E. 2001. Effect of inoculation with Rhizobium on the seed chemical and physical properties of legumes. Aspects of Applied Biology 63:151-163.
16. Fyson, A. and Sprent, J.I. 1982. The development of primary root nodules on *Vicia faba* L. growth and two temperatures. Annals of Botany 50(5):681-692.
17. Graham, P.H. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. A review. Field Crop Research 4(1):93-112.
18. Herridge, D.F. and Danso, S.K.A. 1995. Enhancing crop legume N₂-fixation through selection and breeding. Plant and Soil 174(1-2):51-82.
19. Hoagland, D.R. and Arnon, D.I. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. College of Agriculture, University of California, Berkeley, California.
20. Khiriya, K.D. and Singh, B.P. 2003. Effect of phosphorus and farmyard manure on yield, yield attributes and nitrogen, phosphorus and potassium uptake of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Indian Journal of Agronomy 48(1):62-65.

21. Marabet, M., Mhamdi, R., Tajini, F., Tiwari, R., Trabelsi, M. and Aouani, M.E. 2005. Competitiveness and symbiotic effectiveness of a *R. gallicum* strain isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *European Journal of Agronomy* 22(2):209-216.
22. Mohammad, N. and Qamar, I.A. 1988. Dry matter yield, Root nodulation and nitrogen fixation in 37 varieties of Australian annual medic. *Journal of agricultural research* 9(3):390-395.
23. O'Hara, G., Yates, R. and Howieson, J. 2002. Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculants performance and increase legume productivity in stressful environments. *ACIAR Proceedings* 109:75-80.
24. Pereira, P.A.A., Miranda, B.D., Attewell, J.R., Kmiecik, K.A. and Bliss, F.A. 1993. Selection for increased nodule number in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* 148(2):203-209.
25. Petropoulos, G.A. 2002. *Fenugreek, The genus Trigonella*, Taylor and Francis, New York.
26. Robert, F.M. and Schmidt, E.L. 1983. Population changes and persistence of *Rhizobium Phaseoli* in soil and rhizospheres. *Applied and Environmental Microbiology* 45(2):550-556.
27. Rodelas, B., González-López, J., Martínez-Toledo, M.V., Pozo, C. and Salmerón, V. 1999. Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biology and Fertility of Soils* 29(2):165-169.
28. Sadeghzadeh-Ahari, D., Hassandokht, M.R., Kashi, A.K., Amri, A. and Alizadeh, K.H. 2010. Genetic variability of some agronomic traits in the Iranian Fenugreek landraces under drought stress and non-stress conditions. *African Journal of Plant Science* 4(2): 12–20.
29. Sheehy, J.E., Holloway, T., Woodward, F.I. and Gosse, G. 1988. Nitrogen fixation, nodule numbers per unit ground area and Bioenergetics. *Annals of Botany* 62(5):531-536.
30. Sheikh, S., Ali, A., Shaukat, H., Oamar, I.A. and Khan, B.R. 2000. Breeding Food and forage Legumes for enhancement of nitrogen fixation: A review. *Science Vision* 6(1):49-57.
31. Spanik, H.P. and R.W. Carlson. 1996. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Critical Reviews in Plant Sciences* 15(5-6):559-582.
32. Vargas, M.A.T., Mendes, C.L. and Hungria, M. 2000. Respons of field-grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Rhizobium* inoculation and nitrogen fertilization in two Cerrados soil. *Biological Fertilization of Soils* 32(3): 228-233.
33. Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium-legume* symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(4):968-989.
34. Zahran, H.H. and Sprent, J.I. 1986. Effect of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167:303-309.
35. Zaidi, A., Khan, M.S. and Amlı, M. 2003. Interactive effect of rhizotrophic microorganism on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European Journal of Agronomy* 19(1):15-21.
36. Zeng, Z.H., Chen, W.X., Hu, Y.G., Sul, X.H. and Chen, D.M. 2007. Screening for highly effective *Sinorhizobium meliloti* strains for Vector Alfalfa and testing of its competitive nodulation ability in the field. *Pedosphere* 17(2):219-228.