

## اثر سوش‌های مختلف سینوریزوبیوم ملیوتی بر تثبیت نیتروژن و خصوصیات رشدی یونجه‌های یک ساله

سعیده ملکی فراهانی<sup>۱</sup>، رضا توکل افشاری<sup>۲</sup>، حسین حیدری شریف‌آباد<sup>۳</sup>، محمدرضا چایی‌چی<sup>۲</sup>

### چکیده

به منظور مطالعه تثبیت بیولوژیک نیتروژن یونجه‌های یک‌ساله در واکنش به سوش‌های مختلف باکتری سینوریزوبیوم، چهارگونه یونجه یک‌ساله شامل (*M. truncatula* و *M. rigidula*، *M. polymorpha*، *Medicago littoralis*) و پنج سطح تلقیح شامل چهار سوش مختلف *Sinorhizobium meliloti* (محلی، هومند، R<sub>۹۵</sub> و S<sub>۱۳</sub>) و شاهد (۲/۵ میلی-مولار نیترات) در یک آزمایش گلدانی به صورت طرح فاکتوریل و در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در ۴ تکرار در اتاقک رشد موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رویش گیاهچه‌های یونجه در مرحله کوتیلدون، هر گلدان با سوسپانسیون مورد نظر از سوش باکتری، تلقیح و با محلول غذایی بدون نیترات آبیاری شدند. در این بررسی اثر معنی‌داری در درصد نیتروژن اندام هوایی در تیمارهای به کار رفته دیده نشد. اثر متقابل سوش‌های سینوریزوبیوم و وارپته یونجه بر وزن خشک اندام هوایی، ارتفاع بوته، تعداد ساقه و تعداد گره، معنی‌دار بود. گونه‌های *M. truncatula* و *M. littoralis* توان بالقوه بسیار خوبی برای همزیستی با باکتری‌های مختلف نشان دادند. لذا می‌توان پیشنهاد نمود که از این گونه‌ها می‌توان در تمام مناطق قابل کشت مساعد یونجه کشور استفاده شود. از آنجایی که *M. polymorpha* همزیستی ضعیفی با سوش‌های استخراج شده داشت، اما در تیمار شاهد بالاترین کارایی استفاده از نیترات را داشت به نظر می‌رسد که این گونه به سوش‌های اختصاصی نیاز دارد.

واژه‌های کلیدی: یونجه یک ساله، تثبیت نیتروژن، *Sinorhizobium meliloti*، همزیستی

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی دکتری زراعت و دانشیاران دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳. دانشیار موسسه تحقیقات ثبت و گواهی نهال و بذر، کرج

## مقدمه

در بوم نظام‌های زراعی، در حدود ۸۰٪ از نیتروژن که به طریق بیولوژیک تثبیت می‌شود از همزیستی باکتری‌ها و گیاهان لگوم به دست می‌آید. باکتری‌های دخیل در این همزیستی عمدتاً شامل ریزوبیوم، برادی ریزوبیوم، سینوریزوبیوم، آوزوریزوبیوم، مزوریزوبیوم و آلوریزوبیوم می‌باشند (وانس، ۱۹۹۸) که در تقسیم‌بندی جدید باکتری‌ها، سینوریزوبیوم، باکتری تلقیح کننده یونجه می‌باشد (لوپر، ۲۰۰۰). ریزوبیوم‌ها به‌طور وسیعی در خاک‌های کره زمین پراکنده‌اند. با وجود این هنگامی که لگوم برای نخستین بار زیر کشت می‌روند در هنگام کشت بذر گونه‌های مناسب، باکتری‌های خاص آن‌ها نیز باید موجود باشد. برای این منظور از ریزوبیوم‌هایی که به صورت تجارتي در دسترس می‌باشند می‌توان برای تلقیح بذرهای مورد نظر استفاده نمود.

پراکنش انواع یونجه‌های یک‌ساله در سطح جهانی، به ویژه در مناطق خشک و نیمه‌خشک، نشان دهنده بردباری آن‌ها در برابر شرایط کم‌آبی است و می‌توان از آن‌ها به عنوان گیاهانی بسیار موفق جهت جلوگیری از بیابان‌زایی و گسترش کویرها و اصلاح حاصل‌خیزی خاک‌های کم‌بازده و مراتع فقیر استفاده نمود. برای آن‌که این گیاه بتواند در زمین استقرار یابد و به‌طور کارآمد تثبیت بیولوژیک انجام دهد لازم است که موثرترین باکتری در خاک به میزان کافی وجود داشته باشد و اگر این باکتری در خاک وجود نداشت آن را از طریق تلقیح با بذر یونجه وارد خاک نمود.

همبستگی قابل توجهی بین تجمع ریزوبیوم‌ها در اطراف ریشه، میزان گره‌زایی و نیز بین pH خاک و جمعیت *Sinorhizobium meliloti* در خاک وجود دارد. در این ارتباط همبستگی مثبتی بین pH خاک و گره‌زایی در *M. truncatula* ملاحظه گردید در حالی که در گونه *M. polymorpha* چنین رابطه‌ای وجود نداشت که بیانگر مقاومت این دو گونه در شرایط اسیدی خاک است (یانگ و براکول، ۱۹۹۲؛ واگنر و همکاران ۱۹۷۸؛ بارکلی و همکاران ۱۹۹۴؛ هاویسون و همکاران، ۱۹۹۱ و ۱۹۹۲).

ماترون و ریان (۱۹۹۵) و واگنر و همکاران (۱۹۷۸) نشان دادند که رشد و گره‌بندی گونه‌های *M. orbicularis*، *M. polymorpha*، *M. rigidula* و *M. rotata* با افزایش فسفر در خاک‌های اسیدی به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد.

براکول و همکاران (۱۹۸۸) در بررسی همزیستی لاین‌های مختلف *M. rigidula* دریافتند که این گونه با بعضی سوش‌ها همزیستی بسیار خوبی دارد و به این نتیجه رسیدند که *M. rigidula* برای همزیستی موثر به سوش‌های اختصاصی نیاز دارد. همچنین هاویسون و همکاران (۲۰۰۰) سوش WSM 826 را به عنوان یک سوش تجارتي برای *M. sativa*، *M. littoralis* و *M. tornata* (هیبرید بین *M. truncatula* و *M. littoralis*) معرفی کردند. دشتی (۱۳۷۵) برای گونه‌های مورد بررسی یونجه‌های یک ساله سوش WSM 540 را نسبت به سوش همدانی موثرتر نشان داد.

با وجود کثرت پژوهش‌ها بر روی تاثیر سوش‌های مختلف *Sinorhizobium meliloti* بر یونجه‌های چندساله و کمبود پژوهش‌های لازم در ایران بر روی یونجه‌های یک‌ساله جای دارد که با توجه به اهمیت یونجه‌های یک‌ساله در اراضی دیم مناطق مدیترانه‌ای پژوهش‌های گسترده‌ای روی این گیاه صورت گیرد. لذا این پژوهش با هدف بررسی سازگاری ۴ گونه یونجه یک‌ساله با سینوریزوبیوم‌های موجود در خاک برخی مناطق یونجه‌کاری کشور صورت گرفت.

## مواد و روش‌ها

آزمایش در اتاقک رشد آزمایشگاه فیزیولوژی مجتمع آزمایشگاهی علوم گیاهی جابرابن‌حیان در موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع واقع در کیلومتر ۱۵ اتوبان تهران- کرج انجام گرفت. دمای اتاقک رشد قفسه‌ای (مدل GRR SET 10000G ساخت شرکت طراحی مهندسی گروک) ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد و طول روز و شب ۱۲ ساعت و تشعشع ۱۰۰۰ میکرومول در مترمربع در ثانیه (سیلسبوری، ۱۹۸۱) بود. آزمایش به صورت فاکتوریل دو عاملی در قالب بلوک‌های کامل

شاهد با محلول هوگلند ۲/۵ میلی مولار نیترات آبیاری شدند (حیدری شریف‌آباد، ۱۹۹۴). پس از گذشت ۹۰ روز از زمان کاشت زمانی که گیاهان به مرحله حداکثر رشد زیست توده رسیدند نسبت به برداشت گیاهان اقدام شد. پس از شستشو و جداکردن کامل کوارتورها از سطح ریشه نسبت به اندازه‌گیری صفات مورد نظر اقدام شد. در پایان دوره رشد، ارتفاع بوته‌ها، تعداد برگ‌های سه برگچه‌ای، تعداد ساقه، طول ریشه، تعداد گره‌های فعال و غیرفعال (گره‌های فعال گره‌هایی هستند که داخل گره به رنگ قرمز یا صورتی می‌باشد و گره‌های غیرفعال خاکستری یا سبز می‌باشند) (حیدری شریف‌آباد و دری، ۱۳۸۰)، وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام هوایی هر ۱۰ بوته در هر گلدان اندازه‌گیری شدند. جهت تعیین میزان نیتروژن کل از روش کجلدال (۱۹۷۵، AOAC<sup>۲</sup>) استفاده شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از برنامه‌های نرم افزار MSTATC، SPSS و Minitab استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD (در سطح ۵ درصد) صورت گرفت و برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده گردید.

## نتایج و بحث

### درصد نیتروژن اندام هوایی

اثر گونه، تیمار تلقیحی و اثر متقابل آن‌ها بر روی درصد نیتروژن اندام هوایی معنی‌دار نبود (جدول ۱). با وجود اینکه از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد اما تیمار شاهد (۲/۵ میلی مولار نیترات) در همه گونه‌ها به جز *M. littoralis* نیتروژن بیشتری داشت. *M. littoralis* بیش‌ترین درصد نیتروژن را با مقدار ۰/۸۸۳۶ در تلقیح با سوش S<sub>۱۳</sub> داشت (۰/۱۲ گرم در بوته). گونه *M. polymorpha* کم‌ترین مقدار نیتروژن را در میان تیمارهای تلقیحی داشت در صورتی که این گونه بیش‌ترین مقدار نیتروژن را در تیمار شاهد داشت. *M. rigidula* بیش‌ترین مقدار را در تیمار شاهد و سپس با سوش R<sub>۹۵</sub> داشت (جدول ۲).

بالا نبودن میزان نیتروژن در گونه *M. polymorpha* در تیمارهای تلقیحی نشان می‌دهد

تصادفی با ۴ تکرار پیاده گردید. عامل اول تیمارهای مختلف تلقیحی در ۵ سطح بودند و شامل: افزودن ۲/۵ میلی مولار نیترات و بدون تلقیح باکتری (شاهد) و چهار سوش مختلف *Sinorhizobium meliloti* (سوش محلی، سوش هومند، سوش R<sub>۹۵</sub> و سوش S<sub>۱۳</sub>) بودند. واریته‌های یونجه یک‌ساله شامل *Medicago truncatula*، *M. littoralis*، *M. polymorpha* و *M. rigidula* نیز به عنوان عامل دوم در نظر گرفته شدند. جهت اجرای طرح از ۴ منطقه یونجه‌کاری نمونه‌برداری به صورت تصادفی صورت گرفت. این مناطق عبارت بودند از: باغ موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع جهت دستیابی به سوش محلی، دیمزارهای یونجه منطقه هومند آبسرد واقع در جاده فیروزکوه برای دستیابی به سوش هومند، یونجه‌زارهای همدان برای دستیابی به سوش R<sub>۹۵</sub> و یونجه‌زارهای زنجان برای یافتن سوش S<sub>۱۳</sub>. پس از شستشوی ریشه با آب، گره‌های موجود بر روی ریشه‌های یونجه جدا شدند و با الکل اتیلیک ۹۵٪ ضدعفونی و سپس شستشو شدند. برای کشت و تکثیر ریزوبیوم‌ها از محیط کشت مخمر-مانیتول-آگار<sup>۱</sup> مطابق روش وینسنت (۱۹۷۰) استفاده شد. جهت کاشت بذرها از گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۵ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر استفاده شد. گلدان‌ها با کوارتز استریل به ابعاد ۲×۲ میلی‌متر پر شدند و از زمان کاشت با آب مقطر استریل آبیاری شدند تا بذرها جوانه زده و به مرحله ظهور برگ‌های لپه‌ای رسیدند. پس از رسیدن به این مرحله تعداد گیاهان به ۱۰ بوته در هر گلدان تنک شدند. برای انجام تلقیح، ۱۰ میلی‌لیتر محلول سوسپانسیون باکتری به داخل گلدان‌ها ریخته شد. برای اطمینان از کافی بودن مقدار ریزوبیوم‌ها برای تلقیح طول موج سوسپانسیون ریزوبیوم توسط دستگاه اسپکتروفتومتری CECIL (مدل ۱۰۲۱ CE ساخت انگلیس) تعیین گردید. طول موج به‌دست آمده ۱/۱۷۰ نانومتر بود که با توجه به اینکه طول موج ۰/۸-۰/۷ نانومتر حدود ۱۰<sup>۹</sup> باکتری دارد این مقدار برای تلقیح مناسب به نظر می‌رسید. بعد از تلقیح تیمارهای تلقیحی تا زمان برداشت با محلول هوگلند بدون نیترات و تیمار

### ارتفاع بوته

تیمار شاهد بیش‌ترین (۲۰/۲۵۶ سانتی‌متر) و تیمار هومند کم‌ترین (۱۱/۴۳۹ سانتی‌متر) ارتفاع بوته را در مقایسه با سایر تیمارهای تلقیحی داشتند. در بین گونه‌های یونجه *M. truncatula* بیش‌ترین (۱۸/۹۳۱ سانتی‌متر) و *M. rigidula* کم‌ترین (۸/۸۶۹ سانتی‌متر) ارتفاع بوته را داشتند. *M. truncatula* بعد از *M. polymorpha* بیش‌ترین ارتفاع را در تیمار شاهد داشت و این خاصیت را در تیمار تلقیحی  $S_{13}$  نیز حفظ کرد و میانگین ارتفاع آن در دو تیمار شاهد و  $S_{13}$  در یک گروه قرار گرفت. هم‌چنین در *M. littoralis* و *M. rigidula* نیز چنین روندی مشاهده شد. اما چنین روندی در *M. polymorpha* مشاهده نگردید به طوری که در این گونه میانگین ارتفاع در تیمارهای تلقیحی با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند اما با شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند. که این پدیده باعث معنی‌دار شدن اثرات متقابل تیمارهای تلقیحی و گونه شده است. همان‌طور که بیش‌ترین میزان نیتروژن تثبیت شده در تیمارهای تلقیحی  $S_{13}$  و  $R_{95}$  به‌دست آمد بیش‌ترین ارتفاع نیز پس از تیمار شاهد در تیمارهای  $S_{13}$  و  $R_{95}$  به‌دست آمد که این پدیده مبین آن است که هرچه میزان نیتروژن بیش‌تر شده ارتفاع گیاه نیز به علت رشد بیش‌تر میان-گره‌ها افزایش می‌یابد. نتایج تجزیه رگرسیون (جدول ۳) نیز نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین درصد نیتروژن گیاه و ارتفاع بوته وجود دارد ( $R^2 = 0/477$ ).

باقری (۱۳۸۰) مشاهده کرد که در میان گونه‌های *M. polymorpha*، *M. scutellata*، *M. littoralis* و *M. minima* بیش‌ترین ارتفاع را دارد. بالا بودن ارتفاع بوته در *M. polymorpha* در تیمار شاهد (تیمار کودی) نشان دهنده آن است که این گونه از پتانسیل بالایی برای افزایش ارتفاع در تیمار کودی برخوردار است اما در پاسخ به سوش‌های مختلف ریزوبیوم این گونه بسیار ضعیف عمل کرد.

که این وارسته هم‌زیستی موثری با هیچ یک از سوش‌ها نداشته و به سوش‌های دیگری برای ایجاد یک هم‌زیستی موثر نیاز دارد. بالارد و چارمن (۲۰۰۰) نیز در پژوهش خود مشاهده کردند که *M. polymorpha* درجه هم‌زیستی پایینی دارد.

### وزن خشک اندام هوایی

اثر وارسته، تیمار تلقیحی و اثر متقابل وارسته و تیمارهای تلقیحی بر روی وزن خشک اندام هوایی در سطح ۵٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). گونه‌های مختلف یونجه پاسخ یک‌سان و مشابهی را در تیمارهای تلقیحی با سوش‌های سینوریزوبیوم نشان ندادند. *M. polymorpha* بیش‌ترین وزن خشک اندام هوایی را در بین سایر وارسته‌ها در تیمار شاهد داشت، در حالی که در سایر تیمارهای تلقیحی کم‌ترین وزن خشک اندام هوایی را نشان داد. *M. rigidula* نیز هم‌زیستی خوبی با سوش‌های به کار رفته نشان نداد و وزن خشک آن در تیمار شاهد بیش‌تر از تیمارهای تلقیحی بود. در تیمارهای تلقیحی بیش‌ترین وزن خشک متعلق به وارسته *M. littoralis* بود (جدول ۲). میرنژاد در سال ۱۳۷۶ بیان می‌کند که بین دو گونه *M. truncatula* و *M. polymorpha* از نظر عملکرد علوفه خشک اختلاف معنی‌داری وجود دارد و گونه *M. truncatula* از متوسط عملکرد بالاتری برخوردار می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده مشخص شد که *M. littoralis* بیش‌ترین درصد نیتروژن را دارد به همان ترتیب بیش‌ترین وزن خشک اندام هوایی را دارد و در تیمارهای شاهد که *M. polymorpha* بیش‌ترین مقدار نیتروژن را داشت به همان صورت نیز بیش‌ترین میزان وزن خشک را داشت. از این نتایج چنین بر می‌آید که همبستگی مستقیمی بین میزان نیتروژن در اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی وجود دارد. نتایج تجزیه رگرسیون (جدول ۳) نیز نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین درصد نیتروژن گیاه و وزن خشک اندام هوایی وجود دارد ( $R^2 = 0/709$ ).

## تعداد ساقه در گیاه

۳۰) برگ) و *M. polymorpha* کمترین (۱۳ برگ) تعداد برگ در بوته را در بین گونه‌های یونجه یک ساله داشتند.

چنین به نظر می‌رسد که صفت تعداد ساقه در بوته و تعداد برگ در بوته روند تقریباً یکسانی را در تمام تیمارها دارند و در تیمارهایی که حداکثر تعداد ساقه در بوته به دست آمد در همان تیمارها نیز نسبتاً بیشترین تعداد برگ در بوته به دست آمد (جدول ۲) که با توجه به نتایج حاصله می‌توان گفت که *M. littoralis* از لحاظ کیفیت علوفه نسبت به سایر گونه‌ها برتری دارد زیرا هر چه گیاه شاخ و برگ بیشتری داشته باشد و در واقع نسبت برگ به ساقه بیشتر باشد کیفیت علوفه مرغوب‌تر است.

## طول ریشه

اثر تیمارهای تلقیحی و اثر گونه بر طول ریشه در سطح ۵٪ معنی‌دار بود ولی اثر متقابل بین این دو عامل معنی‌دار نبود (جدول ۱). ارقام تلقیح شده یونجه با سوش محلی بیشترین طول ریشه را داشتند و تیمار شاهد و سوش S<sub>۱۳</sub> و R<sub>۹۵</sub> در یک گروه قرار گرفتند و کمترین طول ریشه را داشتند (شکل ۱).

*M. rigidula* بیشترین طول ریشه و *M. truncatula* کمترین طول ریشه را داشت (شکل ۲). طول ریشه بیشتر برای جذب مواد غذایی پراکنده در خاک صفت بسیار مناسبی است. هم‌چنین در یونجه‌های یک‌ساله طویل‌تر بودن طول ریشه نسبت به یونجه‌های چندساله آن‌ها را مناسب مناطق خشک و دیم‌زار می‌نماید.

در میان تیمارهای تلقیحی تیمار محلی بیشترین و تیمار R<sub>۹۵</sub> کمترین تعداد ساقه را داشتند *M. littoralis* بیشترین و *M. polymorpha* کمترین تعداد ساقه را در بین گونه‌های یونجه داشتند. گونه‌های مختلف یونجه در تیمارهای تلقیحی با سوش‌های ریزوبیوم پاسخ مشابهی نشان ندادند. *M. littoralis* و *M. truncatula* *M. rigidula* بیشترین تعداد ساقه را در سوش محلی داشتند و کمترین میزان تعداد ساقه در تمامی ارقام به جز *M. polymorpha* مربوط به سوش‌های S<sub>۱۳</sub> و R<sub>۹۵</sub> بود (جدول ۲).

باقری (۱۳۸۰) در یک پژوهش بر روی گونه‌های یونجه گزارش کرد که بیشترین تعداد ساقه در گونه *M. truncatula* به دست آمده در حالی که در این پژوهش کمترین تعداد ساقه در تیمار شاهد مربوط به این گونه است. با توجه به نتایج حاصله می‌توان چنین استنباط کرد که تیمارهایی که ارتفاع کوتاه‌تری داشته‌اند تعداد ساقه‌های بیشتری داشته‌اند. نتایج تجزیه رگرسیون نیز نشان داده است که همبستگی منفی بین ارتفاع بوته و تعداد ساقه در بوته وجود دارد (جدول ۳). گونه *M. rigidula* که در بیش‌تر تیمارها ارتفاع کمی داشت اما نسبتاً تعداد ساقه زیادی در هر بوته داشت که این حالت مرتبط با خصوصیات مرفولوژیک این گیاه است. در بین تمام گونه‌های یونجه‌های یک ساله این گونه کمترین ارتفاع را دارد و شاخه‌دهی زیادی دارد که این ویژگی باعث سازگاری این گونه با مناطق سرد سیر شده است. شاخه‌دهی به نسبت زیاد واریته‌های *M. littoralis* و *M. truncatula* نیز باعث می‌شود که بتوان از این گیاهان به عنوان گیاهان پوششی و خفه‌کننده در سطح مزارع و باغات استفاده کرد (بائوچان، ۱۹۹۹).

## تعداد برگ در بوته

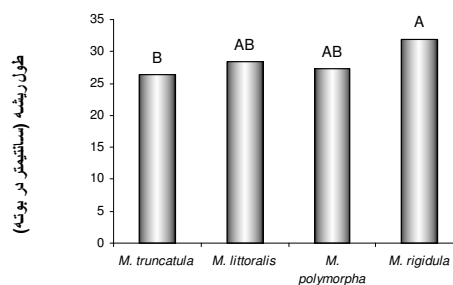
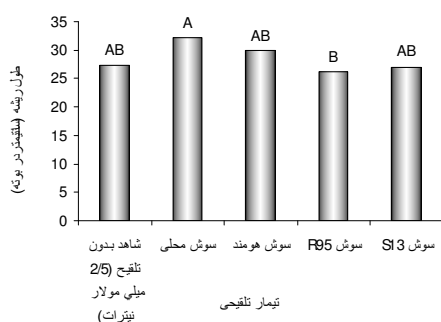
در میان تیمارهای تلقیحی، تیمار شاهد بیشترین (۲۶ برگ) و R<sub>۹۵</sub> کمترین (۱۸ برگ) تعداد برگ در بوته داشتند. *M. littoralis* بیشترین





جدول ۳: ضرایب همبستگی بین صفات مختلف

درصد نیتروژن	۱													
وزن خشک	۰/۷۰۹**	۱												
ارتفاع	۰/۴۷۷*	۰/۶۲۷**	۱											
تعداد ساقه	۰/۳۱۰	۰/۵۱۱*	-۰/۲۲۷-	۱										
تعداد برگ	۰/۵۱۹*	۰/۵۹۲**	-۰/۱۴۱	۰/۸۹۵**	۱									
طول ریشه	-۰/۱۹۳	-۰/۱۴۱	-۰/۶۹۹**	۰/۴۸۵*	۰/۳۳۹	۱								
وزن ریشه	-۰/۳۰۱	۰/۱۶۵	-۰/۱۵۵	۰/۳۸۶	۰/۲۲۵	۰/۵۱۶*	۱							
تعداد کل گره	۰/۰۹۳	۰/۱۷۴	-۰/۳۳۵	۰/۶۵۹**	۰/۶۳۵**	۰/۳۷۴	۰/۱۰۴	۱						
تعداد گره های فعال	۰/۰۰۵	۰/۰۲۷	۰/۴۴۱	۰/۵۵۹*	۰/۵۳۱*	۰/۴۳۰	۰/۰۷۵	۰/۹۳۰**	۱					
تعداد گره های غیر فعال	۰/۲۵۰	۰/۳۹۸	۰/۱۲۲	۰/۴۶۴*	۰/۴۶۸*	۰/۰۰۶	۰/۱۰۱	۰/۵۲۹*	۰/۱۷۶	۱				
صفات	درصد نیتروژن	وزن خشک	ارتفاع	تعداد ساقه	تعداد برگ	طول ریشه	وزن ریشه	تعداد کل گره	تعداد گره های فعال	تعداد گره های غیر فعال				



گونه های یونجه یکساله

شکل ۲: طول ریشه در گونه‌های یونجه یک ساله

شکل ۱: اثر تیمار تلقیحی بر طول ریشه گونه‌های یونجه یک ساله

گیاهان صرف نظر از عوامل محیطی به طور ژنتیکی طول ریشه بلندتری نسبت به سایر گونه‌ها دارند.

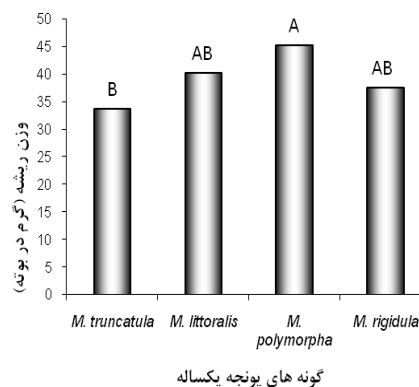
### وزن خشک ریشه

بیشترین وزن خشک ریشه در تیمار محلی و کمترین در تیمار S<sub>13</sub> و R<sub>95</sub> مشاهده شد (شکل ۳). *M. polymorpha* بیشترین وزن خشک ریشه و *M. truncatula* کمترین وزن خشک ریشه را داشتند (شکل ۴). رابرت و همکاران (۱۹۹۸) در آزمایشی روی گندم و چاودار بیان داشتند که در حالت کمبود نیتروژن حدود ۶۰٪ کل ماده خشک به ریشه‌ها اختصاص می‌یابد در حالی که در محدود نبودن نیتروژن،

پایین بودن طول ریشه در تیمار شاهد S<sub>13</sub> و R<sub>95</sub> می‌تواند مبین آن باشد که در این تیمارها به دلیل کافی بودن نیتروژن گیاه طول ریشه افزایش نیافته اما در تیمار سوش محلی و هومند به دلیل پایین بودن قدرت همزیستی نسبت به تیمارهای S<sub>13</sub> و R<sub>95</sub> گیاهان با احساس کمبود نیتروژن طول ریشه را افزایش داده‌اند. اسکیل و همکاران (۱۹۹۷)، ژنگ و فورد (۲۰۰۰) و لینکور و همکاران (۲۰۰۲) نیز دریافتند که همبستگی معنی‌دار معکوسی بین نیترات اندام هوایی و رشد نهایی ریشه وجود دارد که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش هماهنگی دارد. بالا بودن طول ریشه به ترتیب در *M. littoralis* و *M. rigidula* نشان می‌دهد که این



زیستی و در نتیجه کم‌تر بودن نیتروژن نسبت به سایر تیمارها وزن خشک ریشه افزایش یافته است و در گونه *M. polymorpha* به‌علت ضعیف بودن هم‌زیستی و کاهش نیتروژن در گیاه بیش‌تر وزن خشک گیاه به ریشه‌ها اختصاص یافته است.



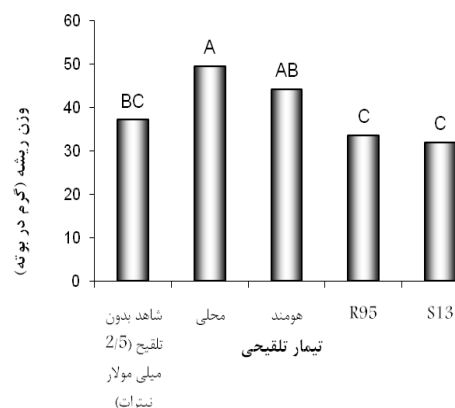
شکل ۴: اثر وارپته بر روی وزن ریشه گونه‌های یونجه یک ساله

غلظت ۲/۵ میلی‌مولار نیترات تاثیر منفی بر روی پدیده گره‌زایی نداشته است. گروسجین و هوگت (۱۹۹۶) بیان کردند که این پدیده فقط در یونجه‌های تتراپلوئید یافت شده است.

### گره‌های فعال

در میان تیمارهای تلقیحی بیش‌ترین گره فعال مربوط به سوش محلی و کم‌ترین مربوط به تیمار شاهد بود. *M. littoralis* بیش‌ترین و *M. polymorpha* کم‌ترین گره‌های فعال را در میان گونه‌های مختلف یونجه یک‌ساله داشتند. گونه‌های مختلف یونجه پاسخ یکسان و مشابهی را در تیمارهای تلقیحی با سوش‌های ریزوبیوم نشان ندادند. گره‌های تشکیل شده در تیمار شاهد هیچ گره فعال نبودند. بیش‌ترین گره فعال مربوط به سوش S<sub>۱۳</sub> بود. تعداد گره‌های فعال نمی‌تواند معیار خیلی دقیقی در تعیین کارایی هم‌زیستی باشد چون اندازه گره‌ها یکسان نیست.

۲۵٪ به ریشه اختصاص می‌یابد. لامبرز و پورتر (۱۹۹۲) نیز بیان داشته‌اند که افزایش اختصاص ماده خشک به ریشه‌ها با کاهش عرضه نیتروژن پدیده شناخته شده‌ای است. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده می‌شود که در تیمار سوش محلی به دلیل پایین بودن درجه هم-



شکل ۳: اثر تیمار تلقیحی بر روی وزن ریشه گونه‌های یونجه یک ساله

### تعداد کل گره‌ها

در میان تیمارهای تلقیحی، در سوش محلی بیش‌ترین و در شاهد کم‌ترین تعداد کل گره مشاهده شد. *M. littoralis* بیش‌ترین و *M. polymorpha* کم‌ترین تعداد کل گره را در بین گونه‌های یونجه یک ساله داشتند.

گونه‌های مختلف یونجه پاسخ یکسان و مشابهی را در تیمارهای تلقیحی با سوش‌های ریزوبیوم نشان ندادند. بیش‌ترین گره‌ها در سوش‌های هومند و محلی تشکیل شده و این در حالی است که وزن خشک اندام هوایی در این تیمار تقریباً در تمام گیاهان پایین‌تر بود که احتمالاً گیاه مقداری از کربوهیدرات‌های خود را صرف تشکیل گره کرده است. قابل توجه‌ترین پدیده در جدول ۲ مشاهده تشکیل گره در تیمار شاهد (بدون تلقیح) در دو گونه یونجه *M. littoralis* و *M. truncatula* می‌باشد که این امر نشانگر وجود پدیده گره خودبخودی<sup>۱</sup> در یونجه‌های یک ساله می‌باشد. این پدیده در غلظت کم نیترات رخ می‌دهد و ظاهراً

## گره‌های غیرفعال

در میان تیمارهای تلقیحی بیش‌ترین تعداد گره-های غیرفعال مربوط به تیمار شاهد و کم‌ترین مربوط به تیمار  $R_{95}$  بود. *M. littoralis* بیش‌ترین و *M. polymorpha* کم‌ترین گره‌های غیرفعال را در میان گونه‌های مختلف یونجه یک‌ساله داشتند. گونه‌های مختلف یونجه پاسخ یکسان و مشابهی را در تیمارهای تلقیحی با سوش‌های سینوریزوبیوم نشان ندادند. گره‌های تشکیل شده در تیمار شاهد جز گره‌های غیرفعال بودند. متابولیت‌هایی که از سطح ریشه ترشح می‌شود تولید ترکیب‌های ویژه‌ای در ریزوبیوم می‌کنند که به عوامل گره‌بندی معروفند که به‌عنوان یک سیگنال برای تغییر شکل ریشه و در نهایت تشکیل گره عمل می‌کند. یکی از این عوامل، پروتیین کینازها هستند که مسئول سیگنال‌های ویژه بازداری یا راه‌اندازی تشکیل گره می‌باشند. عمل این سیگنال‌ها به این صورت است که امکان دارد با وجود باکتری مناسب در خاک، گره‌بندی موثری در ریشه اتفاق نیفتد. اندر و همکاران (۲۰۰۲) و نیشی مورا و هایشی (۲۰۰۲) نیز با استفاده از موتانت *M. truncatula* به این نتیجه رسیدند که با وجود تلقیح گیاه با سوش مناسب به علت فعال نشدن عامل گره‌بندی، ژن تثبیت نیتروژن هم نتوانست عمل کند.

در *M. polymorpha* همانند سایر گونه‌ها تشکیل گره به معنی عام انجام نشد اما در روی ریشه-های این گیاه نقاط برجسته‌ای مشاهده شد که شاید مبین آن باشد که این گیاه همانند سایر گونه‌ها گره‌های خوشه‌ای روی ریشه تشکیل نمی‌دهد و احتمال دارد که مقدار کم نیتروژن تثبیت شده، مربوط به تثبیت گره-های درون ریشه‌ای باشد. ابراهیمی‌فر (۱۳۷۹) نیز در مطالعه گره‌بندی گونه‌های مختلف یونجه یک ساله مشاهده کرد که *M. polymorpha* کم‌ترین تولید گره را داشت و بیان کرد که ممکن است این امر به علت عدم یا کاهش تماس لکتین ریشه با پلی‌ساکارید باکتری باشد. هم‌چنین حاجبی (۱۳۸۱) بیان داشته است که نسبت کربن به نیتروژن عامل تعیین‌کننده‌ای در تشکیل گره تثبیت‌کننده نیتروژن می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

گونه‌های *M. littoralis* و *M. truncatula* توان بالقوه بسیار خوبی برای هم‌زیستی با باکتری‌های مختلف دارند. لذا می‌توان پیشنهاد نمود که از این گونه‌ها تقریباً در تمام مناطق قابل کشت مساعد یونجه کشور استفاده شود و انتظار داشت که عملکرد خوبی از این گونه‌ها به-دست آید. با توجه به پتانسیل بالای تولید شاخ و برگ در این دو گونه به خصوص *M. littoralis* می‌توان توصیه نمود در مناطقی که به علت کشت متوالی غلات، خاک دچار کمبود نیتروژن شده است از آن‌ها استفاده کرد و علاوه بر این، در فصل آیش پوشش مناسبی روی خاک برای جلوگیری از فرسایش ایجاد نمود. با توجه به این که سوش‌های  $S_{13}$  و  $R_{95}$  به ترتیب از زنجار و همدان استحصال شده‌اند و از آن‌جا که تمام گونه‌ها در تلقیح با این سوش‌ها عملکرد بسیار خوبی داشتند می‌توان چنین نتیجه گرفت که خاک‌های این مناطق ریزوبیوم‌های مناسبی برای تشکیل گره‌های تثبیت نیتروژن دارند و در صورت کشت یونجه‌های یک ساله در این مناطق، بدون نیاز به تلقیح با باکتری عملکرد خوبی می‌توان انتظار داشت از آن‌جایی که *M. polymorpha* هم‌زیستی ضعیفی با سوش‌های استخراج شده داشت اما در تیمار شاهد بالاترین کارایی استفاده از نیترات را داشت به نظر می‌رسد که این گونه به سوش‌های اختصاصی نیاز دارد و چنان‌که در مطالعات پیشین مشخص شد، این گونه در خاک‌های اسیدی با ریزوبیوم‌های مقاوم به شرایط اسیدی هم‌زیستی خوبی دارد لذا با توجه به قلیایی بودن خاک‌های مناطق نمونه-برداری شده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این خاک‌ها حاوی ریزوبیوم‌های مناسب این گونه نبوده‌اند و برای کشت موفق، لازم است که این گونه با یک سوش اختصاصی خودش تلقیح شود.

## سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران که بخشی از هزینه پژوهشی این پژوهش را در قالب طرح نوع ششم به شماره پرونده ۷۱۰۱/ک/۰۰۲ فراهم نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

- ابراهیمی فر، ح. ۱۳۷۹. بررسی اثرات نیترات بر افزایش عملکرد و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در گیاه یونجه یک ساله. پایان-نامه کارشناسی ارشد رشته مرتع‌داری مرکز آموزش عالی امام خمینی. ۱۰۱ صفحه
- باقری، م. ۱۳۸۰. اثر تراکم کاشت بر عملکرد بذر پنج گونه یونجه یک ساله. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زراعت. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. ۱۳۰ صفحه.
- حاجبی، ع. ۱۳۸۱. بررسی تاثیر خشکی بر روی رشد و گره‌زایی ریشه شبدر و یونجه. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد جیرفت. ۱۴۳ صفحه
- حیدری شریف آباد، ح و دری، م. ۱۳۸۰. نباتات علوفه‌ای (نیامداران). جلد اول. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع. ۳۱۱ صفحه.
- رنجبر، ا. ۱۳۷۹. ارزیابی اثرات تراکم کاشت بر عملکرد علوفه و پارامترهای رشد هفت رقم یونجه یک ساله. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زراعت دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان. ۱۲۲ صفحه.
- میرنژاد، م. ۱۳۷۶. اثر تراکم کاشت بر عملکرد بذر دو گونه یونجه یک ساله. پایان‌نامه کارشناسی ارشد زراعت. دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. ۷۵ صفحه.
- AOAC. 1975. Official Methods for the AOAC. 12<sup>th</sup> ed. AOAC, Washington, DC.
- Ballard, R. A., and Charman, N. 2000. Nodulation and growth of pasture legumes with naturalized soil rhizobia. 1. Annual *Medicago* spp. Australian Journal of Experimental Agriculture 40: 939-948.
- Barclay, R. M., Hebb, D. M. and Brockwell, J. 1994. Differential Rhizobial colonization of the roots of sown and volunteer annual species of medicago in an acid soil. Australian Journal of Experimental Agriculture 34(6): 745-752.
- Bauchan, G. R. 1999. Use of annual medics in sustainable agriculture systems. Lucerne and medics for the XXI century. Proceedings XIII EUCARPIA *Medicago* spp. Group Meeting, Perugia, Italy, 13-16 September 1999. Perugia: Universita di Perugia, 2000 146-153.
- Brockwell, J., Holliday, R. A., Daoud, D. M and Materon, L. A. 1988. Symbiotic characteristics of a Rhizobium-specific *annual medic*, *Medicago rigidula* (L.) All .Soil Biology & Biochemistry 20 (5): 593-600.
- Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S. kalo, P. and Kiss, G. B. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. Nature 417: 962.
- Grosjean, C. and Huguet, T. 1996. The spontaneous nodulation of alfalfa. CIHEAM- IAMZ. 189p.
- Heidari Sharifabad, H. 1994. Variation in sensivity of nodulation and nitrogen fixation to nitrate in annual *medicago* species. Department of plant science, Waite Agricultural Research Institute, Glen Osmond, South Australia. A thesis submitted to University of Adelaide for degree of Doctor of Philosophy (Ph.D).
- Howieson, J. G., Ewing, M. A., Thorn, C. W. and Revell, C. K. 1991. Increased yield in annual species of medicago grown in acidic soil in response to inoculation with acid tolerant *Rhizobium meliloti*. Plant- soil Interactions at low pH. Beckly-West Virginia. 586-595. Netherland.
- Howieson, J. G., Robson, A. D. and Abbotte, L. K. 1992. Acid tolerant species of medicago produce exudates at low pH wich induce the experision of genes in *Rhizobium meliloti*. Australian Journal of Physiology 287-296.

- Howieson, J. G., Nutt, B. and Evans, P. 2000. Estimation of host-strain compatibility for symbiotic N-fixation between *Rhizobium meliloti*, several annual species of *Medicago* and *Medicago sativa*. *Plant Soil* 219 (1/2): 49-55.
- Kinzig, A. P. and Socolow, R. H. 1994. Is nitrogen fertilizer use nearing a balance- reply. *Physiology. Today* 47: 24-35.
- Lambers, H. and Poorter, H. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advanced Economical Research* 23: 187-261.
- Levier. 2000. Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science* 287: 24- 29.
- Linkohr, B.I., Williamson, L.C., Fitter, A.H., Leyser, O. 2002. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 29:751-760.
- Materon, L. A. and Ryan, J. 1995. Rhizobial inoculation and phosphorus and zinc nutrition for annual medics adapted to Mediterranean environments. *Agronomy Journal* 87 (4): 692-698.
- Nishimura, R. and Hayashi, M. 2002. HAR1 mediates systemic regulation of symbiotic organ development. *Nature* 420:426.
- Robert, M. E., Robertson, M. J., Poulton, P. L., Carberry, P. S., Weston, E. J. and Lehane, K.J. 1998. Modelling lucerne growth using APSIM. *Proceedings of the 9th Australian Agronomy Conference, Wagga wagga*, 247-250.
- Robson, A. D. 1990. The role of self-regeneration pasture in rotation with cereals in Mediterranean areas. In: Osman, A. E. *et al.* eds. *The role of Legumes in the Farming Systems of the Mediterranean Areas*, ICARDA, Netherlands, 217-236.
- Scheible, W.-R., Laurerer, M., Schulze, E.-D., Caboche, M. and Stitt, M. 1997. Accumulation of nitrate in the shoot acts as signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* 11:671-691.
- Silbury, J. H. 1981. CO<sub>2</sub> exchange and dinitrogen fixation of subterranean clover in response to light level. *Plant. Physiology* 67: 599-602.
- Van Kammen, A. 1997. Biological nitrogen fixation for sustainable agriculture. In: Legocki, A., Bothe, H. and Puhler, A. eds. *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. Springer, Berlin. 177-178.
- Vance, C. P. 1997. Enhanced agricultural sustainability through biological nitrogen fixation. In: Legocki, A., Bothe, H. and Puhler, A. eds. *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. Springer, Berlin. 179-186.
- Vance, C. P. 1998. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: Spaink, H. P. *et al.* (Eds.). *The Rhizobiaceae*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 509-530.
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for the practical study of the root-nodule Bacteria*. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Wagner, G. H., Kassim, G. M. and Martyniuk, S. 1978. Nodulation of annual medicago by strains of *R. meliloti* in a commercial inoculant as influenced by soil phosphorus and pH. *Plant Soil* 50 (1): 81-89.
- Young, R. R. and Brockwel, J. 1992. Influence of soil pH on the development of symbiosis in field-grown acid-sensitive and acid tolerant annual medics. *Aust. J. Exper. Agric.* 32(2): 167-173.
- Zhang H, Forde, B.G. 2000. Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *Journal of Experimental Botany* 51: 51-59.

## Effect of *Sinorhizobium meliloti* Strains on Nitrogen Fixation and Growth of Annual Medics

Maleki Farahani<sup>1</sup>, S., Tavakkol Afshari R<sup>2</sup>, Heidari Sharifabad H<sup>3</sup> and Chaichi<sup>2</sup>, M.

### Abstract

To evaluate the nitrogen fixation of annual medics in response to *Sinorhizobium meliloti* strains four species of annual medics (*Medicago truncatula*, *M. littoralis*, *M. polymorpha*, *M. rigidula*) were grown in all combinations with four various strains of *Sinorhizobium meliloti* (Native, Hoomand, R<sub>95</sub> and S<sub>13</sub>). There was also uninoculated check for each species. Control treatment (uninoculated) included mineral nitrogen (2.5 mMol nitrate). Pot experiment was conducted using a factorial completely block design with four replications in grow chamber at Forest and Rangeland Research Institute. Inoculation with suspensions of different strains was carried out when cotyledons were appeared. Nitrogen fixation in shoot was not significantly different among medics. There was a significant effect of sinorhizobium by medic species for shoot dry weight, height, nodule number, and shoot number. There was a good potential symbiosis with bacteria in *M. truncatula* and *M. littoralis*. There fore, it can be suggested that these species are suitable for all regions that medics can be grown. *M. polymorpha* has weak effective symbiosis with any of the strains though had highest nitrate use efficiency. It seems that this plant requires specific strain.

**Keywords:** Medicago, Nitrogen fixation, *Sinorhizobium meliloti*, Symbiosis

---

1. Ph.D. student, Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

2. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Campus of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran

3. Associate Professor, Seed and Plant Certificate Research institute

-----

