



ارزیابی تیمارهای ریزوبیوم بومی، کود حیوانی و اوره بر رشد گیاه یونجه در استان فارس

محمد جواد نوروزنژاد^{۱*}، دکتر محمد کارگر^۲، مهدی کارگر^۳، دکتر کاووس ایاز پور^۴، ساره رییس زاده^۵

^۱مری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی،
^۲کارشناس، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، گروه میکروبیولوژی^۴ مری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه کشاورزی،
^۳کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های ریزوبیوم مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های موجود در خاک هستند که نسبت به سایر میکروبیوتایگان خاک نقش بیشتری را در تثبیت ازت دارند. هدف از این پژوهش، استفاده از ریزوبیوم بومی استان فارس و نقش کود اوره در بهره‌وری گیاه یونجه بود. مواد و روش‌ها: ابتدا ریزوبیوم بومی از گرهک‌های یونجه با استفاده از محیط YMA حاوی قرمز کنگو، جداسازی و با استفاده از رنگ‌آمیزی و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت گردیدند. این پژوهش به صورت تصادفی و در نظر گرفتن فاکتور اول شامل: نوع کود، بدون اوره، ۱۰۰ میلی گرم در کیلو گرم کود اوره، ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم کود اوره، ۱ درصد کود حیوانی، ۳ درصد کود حیوانی و فاکتور دوم شامل: بدون باکتری، ریزوبیوم محلی، ریزوبیوم سوش استاندارد در شش تکرار در هوای آزاد طراحی گردید. یافته‌ها: بیشترین رشد در گلدان‌هایی که با ریزوبیوم بومی تیمار شده مشاهده گردید. در مقایسه با کود اوره و کود حیوانی بهترین رشد در تیمار کود حیوانی ۳ درصد و بیشترین ارتفاع گیاه در گلدان‌هایی با تیمار ریزوبیوم بومی دیده شد. همچنین بهترین تیمار استفاده از ریزوبیوم سوش محلی و کود حیوانی ۳ درصد برای محصول دهی بیشتر بود. بیشترین گرهک‌های فعال در تثبیت ازت نیز در گیاهانی با تیمار ریزوبیوم بومی مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: در مقایسه بین ریزوبیوم بومی و سوش استاندارد و با توجه به آهکی بودن خاک‌های استان و آب و هوای گرم و خشک منطقه استفاده از ریزوبیوم بومی و کود حیوانی می‌تواند باعث بهره‌وری بیشتر و تثبیت ازت توسط گرهک‌های تولید شده بر روی ریشه گیاه گردد. هم‌چنین می‌توان در تولید کودهای بیولوژیک از ریزوبیوم‌های جداسازی شده از مناطق مختلف با هدف محصول دهی بیشتر استفاده نمود. استفاده از کود حیوانی به دلیل تجزیه طولانی مدت و فعال کردن دیگر باکتری‌های آزادی تثبیت کننده ازت می‌تواند به رشد گیاه کمک شایانی نماید.

واژگان کلیدی: ریزوبیوم، کود حیوانی، کود اوره، یونجه، تثبیت ازت

دریافت مقاله: آذر ۸۸ پذیرش برای چاپ: بهمن ۸۸

مقدمه

نیترژن اصلی‌ترین عامل محدودکننده تولید محصولات زراعی است. این عنصر نقش کلیدی در ساختمان بسیاری از

(* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی،
تلفن: ۰۹۱۷۷۹۱۳۳۸۹

دارند. به طوری که هیچ نوع گرهرکی بر روی ریشه گیاه مشاهده نکردند. و تنها یک گونه از یونجه‌ها دارای افزایش وزن خشک اندام هوایی بود و بعضی از گونه‌های یونجه نیاز به سوش‌های اختصاصی ریزوبیوم میلیوتی برای تثبیت ازت بودند (۲).

در این پژوهش اثر ریزوبیوم بومی استان در مقایسه با ریزوبیوم سوش استاندارد در محصول دهی گیاه، تولید گرهرک‌های فعال در تثبیت ازت و اثر کود حیوانی و کود اوره در گرهرک‌زایی ریشه توسط ریزوبیوم را مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

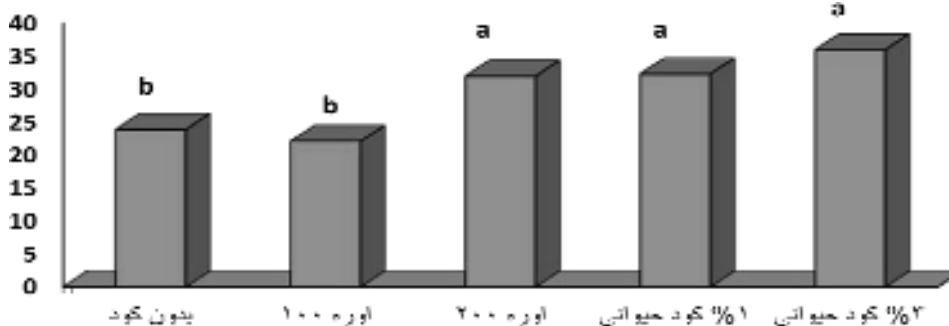
گیاه یونجه چند ماهه (میانگین ۴ ماهه) از مزارع استان فارس همراه با گرهرک‌های ریشه آن برداشت گردید. گرهرک‌های جداسازی شده توسط $HgCl_2$ (۱ درصد) اسیدی و H_2O_2 (۵ درصد) شستشو داده شد تا باکتری‌های روی گرهرک‌ها از بین بروند. با پنس استریل گرهرک‌ها در سرم فیزیولوژی استریل له گردید و به محیط YMA (Yeast Extract Manitol Agar) مانیتول ۱۰ گرم، دی‌پتاسیم فسفات ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، کلرید سدیم ۱ گرم، کربنات کلسیم ۳ گرم، عصاره مخمر ۰/۱ گرم، آگار ۱۵ گرم، در یک لیتر آب مقطر منتقل گردید (۶). با دمای گرمخانه گذاری ۲۸ درجه سانتی‌گراد، پس از ۳ الی ۷ روز باکتری‌های از گرهرک‌ها خارج گردیده و تشکیل کلنی‌های موکوتیدی و عسل مانند دادند. به منظور خالص‌سازی، در شرایط استریل به یک محیط کشت YMA دیگری منتقل گردیدند و پس از گرماگذاری مجدد به مدت ۴ روز باکتری‌ها شناسایی شدند. شکل‌شناسی باکتری‌های ریزوبیوم جداسازی شده، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم و کپسول مورد بررسی قرار گرفت (۶). سپس باکتری‌های جدا شده با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی بر اساس کتاب باکتری‌شناسی برگری تعیین هویت گردیدند (۷).

ابتدا گلدان‌ها توسط ۰/۵ کیلوگرم سنگ‌ریزه استریل پر گردیدند. سپس ۴/۵ کیلوگرم خاک آهکی در هر گلدان ریخته و بذر یونجه رقم یزدی توسط باکتری تلقیح شد و گلدان‌ها با کود اوره و آب مقطر استریل آبیاری شدند. کود حیوانی نیز قبل از کاشت به گلدان‌ها اضافه و به خوبی مخلوط گردید. پس از آن گلدان‌ها در

ترکیبات موجود در سلول‌های گیاهی دارد و امروزه تاثیر مهم آن در تولید غذا شناخته شده است. ۷۸ درصد جو را نیتروژن تشکیل می‌دهد اما گیاهان به طور مستقیم قادر به مصرف این منبع سرشار نیستند. برخی از باکتری‌ها، اکتینومیست‌ها و سیانو باکتری می‌توانند نیتروژن گازی را به شکل‌های قابل جذب برای گیاه در آورند. در بین باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت باکتری‌های هم‌زیست با حبوبات نقش مهمی در تثبیت ازت دارند. باکتری‌های ریزوبیوم دارای گونه‌ها و سویه‌های متفاوتی هستند و برای حبوبات مختلف به شکل اختصاصی عمل می‌کنند و اثرات مفیدی بر رشد گیاه دارند (۱).

به طور کلی باکتری‌های ریزوبیوم از موهبت‌های الهی هستند که بجز روابط مفید و پرثمر با گیاهان تاکنون هیچ نوع گزارشی مبنی بر بروز بیماری یا آلودگی میکروبی ناشی از این باکتری‌ها در انسان یا سایر موجودات ارائه نشده است (۲).

Albez و همکاران با به کار بردن باکتری ریزوبیوم در کشت گیاه یونجه دریافته‌اند که با کاهش سطح اتیلن در گیاه باعث افزایش گره‌زایی شده و جذب مواد را در گیاه افزایش می‌دهد و نشان دادند که حداقل یکی از سویه‌های ریزوبیوم بکار برده شده، ریزوتیوکسین تولید می‌کند که یک ممانعت‌کننده از تولید اتیلن است (۳). Vessey و همکاران و Antoun و همکاران ACC- دآمیناز (aminocyclopropane-1-carboxylate) فعال که تشدید کننده رشد گیاه یونجه می‌باشد را در تعدادی از سویه‌های ریزوبیوم جداسازی شده از مزارع یونجه تشخیص دادند. این آنزیم تبدیل ACC به آلفا کتوبوتیرات و آمونیاک را کاتالیز می‌کند و مشخص گردید که اثر ممانعت‌کنندگی اتیلن روی رشد طولی ریشه می‌تواند با فعالیت آنزیم ACC- دآمیناز کاهش یابد (۳ و ۴). ملکوتی و همکاران نیز بر روی مدیریت کود اوره در شالیزارهای شمال کشور تحقیقاتی انجام دادند و دریافته‌اند که مصرف یک باره ازت باعث افزایش معنی‌داری در شالیزار و محصول نمی‌شود. اما اگر به مرور و در طی ۳ الی ۴ نوبت کود اوره به شالیزار اضافه شود عملکرد بهتری در محصول خواهد داشت (۵). ملکی و همکاران نیز با اثر سوش‌های مختلف ریزوبیوم بر روی رشد و تثبیت نیتروژن در یونجه‌های یک ساله دریافته‌اند که برخی از سویه‌های ریزوبیوم با بعضی از نژادهای یونجه یک ساله هم‌زیستی ضعیفی



نمودار ۱: مقایسه سطوح فاکتور کودی در رابطه با وزن، حروف مشترک نشان دهنده بی معنی بودن ارتباط است.

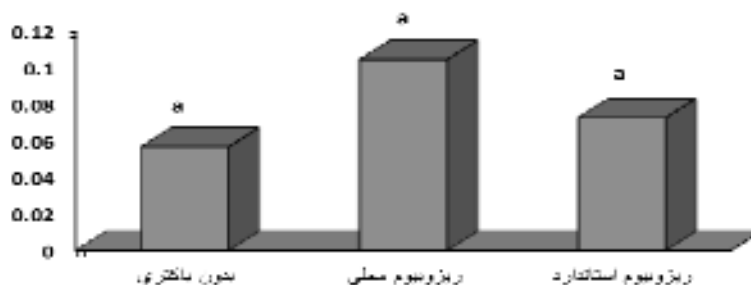
ارتفاع گیاه یونجه با تیمار کود و باکتری در مقایسه با هر یک به تنهایی، نشان می دهد که استفاده از ریزوبیوم بومی و کود حیوانی باعث افزایش محصول و رشد بهتر گیاه $p \leq 0.01$ می گردد. هم چنین استفاده از کود اوره در مقدارهای اندک باعث رشد بهتر گیاه و کمک به گرهک زایی در ریشه گیاه می شود. نتایج نشان داد که بیشترین گرهک های فعال در تولید ازت مربوط به گیاهانی است دیده شده که با ریزوبیوم بومی مزارع استان فارس و کود حیوانی تیمار شده شده اند (جدول ۱).

بیشترین مقدار وزن خشک گیاه نیز در گلدان هایی با کود حیوانی ۳ درصد مشاهده گردید. اختلاف معنی داری بین وزن خشک گیاه با تیمارهای ریزوبیوم بومی و کود حیوانی ۳ درصد دیده شد ($p \leq 0.01$). همچنین بین ارتفاع گیاه در مدت یک ماه با کود اوره نیز اختلاف معنی داری وجود داشت (جدول ۱ و نمودار ۱). در مقایسه با ریزوبیوم سوش استاندارد، بیشترین تثبیت ازت در گلدان های تیمار شده با ریزوبیوم بومی مشاهده شد، اما اختلاف شان معنی دار نبود (نمودار ۲).

هوای آزاد قرار داده شد و به طور مکرر توسط آب مقطر استریل آبیاری گردید و به مدت پنج ماه و هر ماه یکبار ارتفاع گیاهان یادداشت شد. بعد از برداشت و خشک شدن گیاه وزن خشک گیاه اندازه گیری شد. این پژوهش به صورت فاکتوریل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی (CRD) با دو فاکتور در هوای آزاد در گلدان های ۵ کیلوگرمی و با ۶ تکرار انجام گرفت.

فاکتور اول: نوع باکتری در سه سطح، بدون باکتری، ریزوبیوم بومی جداسازی شده از مزارع یونجه استان فارس، ریزوبوم ملیوتی سوش استاندارد تهیه شده از مرکز تحقیقات آب و خاک ایران. فاکتور دوم: نوع کود در پنج سطح بدون کود، ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم کود اوره، ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم کود اوره، ۱ درصد کود حیوانی، ۳ درصد کود حیوانی. سپس نتایج حاصل با نرم افزار *sas* مورد آنالیز آماری قرار گرفت و مقایسه معدل ها با آزمون چند دامنه ای دانکن مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها



نمودار ۲: مقایسه نوع باکتری در رابطه با درصد ازت.

جدول ۱: آنالیز واریانس مربوط به ارتفاع.

ارزش F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجات آزادی	منابع تغییر
۲۴/۵ ^{***}	۳۲۰/۲۲۲	۱۲۸۰/۸۸۹	۴	کود
۱۴/۴ ^{***}	۱۸۷/۶۳۳	۳۷۵/۲۶۷	۲	باکتری
۲/۰۳ ^{ns}	۲۶/۴۸۱	۲۱۱/۸۴۴	۸	کود × باکتری
-	۱۳/۰۶۷	۹۸۰/۰۰۰	۷۵	خطا
-	-	۲۸۴۸/۰۰۰	۸۹	کل

ns بی معنی، ** معنی دار در سطح ۱٪

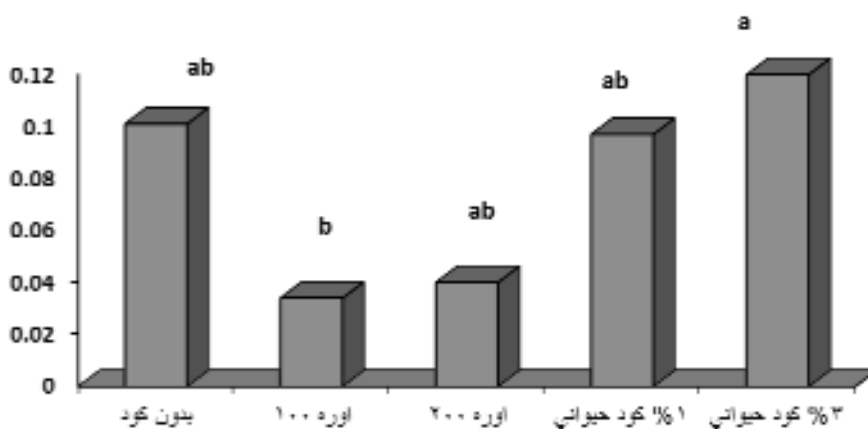
بحث

یونجه دارد و باعث تولید گرهک های فعال در تثبیت ازت می شود. Chaeman، Ballard در یافتند که کارایی ضعیف در این نوع همزیستی، به دلیل توانایی پایین گیاه در همزیستی با ریزوبیوم می باشد و به شرایط آب و هوایی نیز بستگی دارد (۸). Cocks و Ehrman همزیستی ریزوبیوم ها در نواحی سرد و محصول دهی گیاه را مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که ریزوبیوم های جداسازی شده از مناطق سرد سیر باعث همزیستی بهتر و گرهک زایی بر روی ریشه گیاه می شود (۹).

استفاده از تیمار کود حیوانی در گلدان ها نشان داد که می تواند باعث محصول دهی بیشتر گردد. از این رو امکان دارد که استفاده از کود حیوانی باعث رشد بهتر باکتری های آزادی تثبیت کننده ازت و در نتیجه رشد بهتر گیاه گردد. هم چنین به دلیل آزاد شدن تدریجی ازت موجود در کود حیوانی، اثر ممانعت کنندگی تثبیت ازت توسط باکتری های آزادی و همزیست ریشه گیاه نمی شود.

بررسی نتایج تاثیر ارتفاع گیاه پس از استفاده از تیمار ریزوبیوم بومی و سوش استاندارد نشان داد که بهترین رشد مربوط به تیمار با ریزوبیوم بومی می باشد. ملکی فراهانی و همکاران در سال ۱۳۸۶ نیز نتایج مشابهی را با تاثیر ریزوبیوم ها بر رشد گیاه یونجه یک ساله بدست آوردند و نشان دادند که که بهترین رشد و همزیستی با سوش های محلی و R95 به وجود می آید. محققین یاد شده نشان دادند که سوش های ریزوبیوم نیز سبب رشد و همزیستی می گردند اما بهترین گرهک زایی را به وسیله ی فعالیت سوش بومی و R95 و سپس S13 ایجاد می شود (۲).

در رابطه با وزن خشک گیاه و نوع باکتری همزیست استفاده شده نیز بیشترین محصول در گلدان هایی که با ریزوبیوم بومی تیمار شده بود ملاحظه گردید. از این رو می توان دریافت که ریزوبیوم بومی نسبت به سوش استاندارد هم زیستی بهتری با گیاه



نمودار ۳: مقایسه سطوح فاکتور کودی در رابطه با درصد ازت.

و کودهای بیولوژیک هر منطقه در اختیار کشاورزان قرار گیرد تا باعث بهبود محصول دهی گیاه یونجه در سراسر کشور گردد. همچنین در مزارع یونجه استفاده از کود حیوانی پیشنهاد می شود، زیرا مقدار ازت پایین موجود در کود حیوانی به تدریج توسط باکتری های خاک آزاد شده و در اختیار گیاه قرار می گیرد که به این ترتیب باعث محصول دهی بیشتری می شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از جناب آقای مهندس عبدالکریم اجرایی و دکتر بهروز بهروزنام اساتید گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی جهرم به دلیل راهنمایی های ارزنده علمی کمال سپاسگزاری را دارند.

Vessey و همکاران دریافتند که باکتری های *Bacillus sp.* در خاک به ویژه *Bacillus cereus* باعث رشد بخش هوایی و افزایش رشد ریشه و محصول دهی بیشتر می گردد که این موضوع به فصل و محل استفاده از ریزوبیوم بستگی دارد. استفاده از کود حیوانی نیز باعث افزایش گرهک زایی در باکتری های همزیست می گردد. به این ترتیب به صورت غیرمستقیم تحریک رشد ریشه انجام می گیرد (۴ و ۱۰).

نتیجه گیری

به منظور محصول دهی بهتر گیاه یونجه با توجه به خاک، آب، هوای منطقه، رقم و گونه یونجه، بهتر است که از ریزوبیوم های بومی همان منطقه استفاده شود. برای بهبود این وضعیت پیشنهاد می گردد تا بانک میکروبی از ریزوبیوم های بومی مختلف تهیه شود

References

1. Ramezani A. 2006. Introduction of rhizobial bacteria as growth promoting factor. Agrology M.Sc Thesis. Islamic Azad University, Karaj, Iran.
2. Maleki Farahani S. 2007. Effect of different rhizobial strains on growth and nitrogen fixation in one-year-old alfalfa plants. Cultivation M.Sc Thesis. Department of Agriculture, Tehran University, Tehran, Iran.
3. Antoun H, Klopper J, Plant growth - promoting rhizobacteria (PGPB). 2002.
4. Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil. 2003; 255: 571-586.
5. Malakooti MJ. 2000. Sustainable Agriculture and Yield Increment by Optimum Fertilizer Utilization in Iran. 2nd edition. Agricultural Extension Publications, Iran.
6. Boozari M, Emteyazi G, Moghadam pour M. 2008. Phage typing in 30 rhizobial strains isolated from 5 symbiotic legumes in Gilan and Esfahan provinces. Microbiology M.Sc Thesis. Islamic Azad University, Esfahan, Iran.
7. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. Bergie's manual systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Springer; 2005: Part C.
8. Ballard, F.A. and Charman J., Nodulation and growth of pasture legumes with naturalized soil rhizobia. Aust J Exp Agr. 2000; 40: 939-948.
9. Ligerio, F, Lluch C, Olivares J. Evolution of ethylene from roots of medicage sativa plant inoculated with *Rhizobium meliloti*. Plant Physiol. 1986; 125: 361-365.
10. Vessey JK, Buss TJ. *Bacillus cereus* UW85 inoculation effects on growth, Nodulation and N accumulation in grain legumes. Controlled-environment studies. Can J Plant Sci. 2002; 82: 282-290.



Evaluation the effect of native rhizobial treatment, animal manure and urea fertilizer on the growth of alfalfa plants in Fars province

Mohammad Javad Nowrooz Nejad¹, Mohammad Kargar², Mehdi kargar³,
Kavoos Ayaz Pour⁴, Sareh Raeiszadeh Jahromi⁵

¹MSc, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

²BSc, Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

³BSc, Department of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

⁴PhD, Assistant Professor, Department of Agriculture, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

⁵MSc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

Abstract

Background and Objective: Rhizobacteria are the most important microorganisms in the soil that have major role in fixing nitrogen than other soil microorganisms. The aim of this study is using native rhizobium of Fars province calcareous soil and determination the role of urea fertilizer in giving high yield and efficiency of alfalfa.

Materials and Methods: First, native rhizobium is separated from alfalfa root nodules using YAM environment containing Congo red, and then it is identified with staining, and biochemical tests. This research is performed as a randomized plan and under different nutritional conditions, including fertilizer without urea, 100mg/kg urea fertilizer, 200mg/kg urea fertilizer, 1% animal manure, 3% animal manure and also under different microbial inoculations, including without bacteria, native rhizobium and standard rhizobial strain in six repeats in open air.

Results: The best growth is observed in the pots treated with local rhizobium. In comparing to urea fertilizer, the pots fertilized with 3% animal manure treatments showed a better growth. The most height plants were seen in the pots fertilized with local rhizobium treatments. The best treatment to give high yield was achieved with local rhizobial strain and 3% animal manure. The most active root nodules in nitrogen fixation were seen in the plants treated with local rhizobium.

Conclusion: By comparing the native and standard rhizobial strains and according to calcareous soil of Fars province and hot and dry weather of this region, it is suggested that fertilization with local rhizobial strain and animal manure can result in high yields and nitrogen fixation in the root nodules of the plant.

Keywords: *Rhizobium*, animal manure, urea fertilizer, alfalfa, nitrogen fixation

Correspondence to: Mohammad Javad Nowrooz Nejad

Tel : (+98) 9177913389

Email: MJNOW271@yahoo.com

Journal of Microbial World 2010, 2(4)- 270-275