بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان
دانشکده‌ی کشاورزی
گروه علوم خاک

پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی

مهندسی کشاورزی- علوم خاک

تأثیر تلقیح تلفیقی جدایه‌های *سینوریزوبیوم* و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه برگره‌زایی و رشد یونجه تحت تنش خشکی

استاد راهنما
دکتر عبدالرضا اخگر

استادان مشاور
دکتر احمد تاج‌آبادی‌پور
دکتر وحید مظفری

نگارنده
مهدیه ابراهیمی

اسفند ۱۳۹۰

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه علوم خاک

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد

مهندسی کشاورزی – رشته ی علوم خاک

تأثیر تلقیح تلفیقی جدایه‌های سینوریزوبیوم و باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر گره‌زایی و رشد یونجه تحت تنش خشکی

مهدیه ابراهیمی

در تاریخ ۹۰/۱۲/۲۴ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه ..عالی.. به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر عبدالرضا اخگر	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۲- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر احمد تاج آبادی پور	با مرتبه‌ی علمی دانشیار
۲- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر وحید مظفری	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۳- استاد داور داخل گروه	دکتر محمد حشمتی	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۴- استاد داور خارج از گروه	دکتر مهدی سرچشمه پور	با مرتبه‌ی علمی استادیار
۵ – نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد اناری عباسی نژاد	با مرتبه‌ی علمی استادیار

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

امضاء

تمامی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های

حاصل از پژوهش موضوع این پایان‌نامه، متعلق به دانشگاه

ولی‌عصر (عج) رفسنجان است.

تقدیر و تشکر

سپاس بیکران خدای مهربان را که نور شناختش را به قلب ما تابانید و دروازه‌ی بی‌پایان دانش را بر ما گشود. پروردگار بزرگ را شاکرم که مرا یاری نمود تا قدم در راه علم و اندیشه برای متعالی ساختن زندگی خود و دیگران بردارم.

به مصداق «من لم یشکر المخلوق لم یشکر الخالق » بسی شایسته است از استاد فرهیخته و بزرگوارم جناب آقای دکتر اخگرکه با کرامتی چون خورشید ، سرزمین دل را روشنی بخشیدند و گلشن سرای علم و دانش را با راهنمایی‌های کار ساز و سازنده بارور ساختند تقدیر و تشکر نمایم.

از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر تاج‌آبادی پور و دکتر مظفری که با نکته‌های دلاویز و گفته‌های بلند مشوق اینجانب در گام نهادن در وادی پژوهش بودند و جناب آقای دکتر حشمتی و دکتر سرچشمه‌پور که زحمت داوری این پایان‌نامه را تقبل نمودند سپاسگزارم.

همچنین از مسئولین محترم آزمایشگاه، آقایان مهندس سلیمانی و مهندس باقری که در طول مراحل انجام پایان‌نامه از هیچ‌گونه لطف و همکاری دریغ نداشتند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

از تمامی اساتید بزرگواری که در طی مراحل تحصیل افتخار شاگردیشان را داشتم و از محضرشان کسب فیض نمودم قدرردانی می‌کنم.

از پدر و مادر عزیز و مهربانم که پیوسته جرعه‌نوش جام تعلیم و تربیت، فضیلت و انسانیت آنها بوده‌ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی‌ها و مشکلات بوده است تشکر می‌کنم.

از همسرم وخواهر و برادران عزیزم که در طول مراحل انجام پایان‌نامه نهایت لطف و محبت را به من ابراز داشتند صمیمانه تشکر می‌کنم.

تقدیم به

ساحت مقدس حضرت ولی‌عصر(عج ا...)

روح بزرگوار پدر عزیزم که نمی‌دانم از بزرگی‌اش بگویم یا مردانگی، سخاوت، سکوت، مهربانی و ..... بسیار سخت است.

مادر دلسوز و مهربانم که سجده ایثارش گل محبت را در وجودم پروراند و دامان گهربارش لحظه‌های مهربانی را به من آموخت.

چکیده

نیتروژن یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی در گیاهان است که کمبود آن در خاک از عوامل اصلی محدود کننده رشد گیاهان می‌باشد. این در حالیست که در حدود ۷۸ درصد از گاز موجود در اتمسفر، گاز مولکولی نیتروژن بوده که به صورت مستقیم برای گیاهان قابل جذب نمی‌باشد. یکی از مهم‌ترین راه‌های تثبیت نیتروژن موجود در اتمسفر، برقراری همزیستی بین گیاهان لگوم و باکتری‌های *ریزوبیوم* می‌باشد. کودپاشی مراتع به‌خصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک که همواره با عامل محدود کننده رطوبت مواجه است، موجب می‌گردد تا مقدار کمی از این کودها مورد استفاده قرار گیرد و از طرفی ضمن تحمیل هزینه‌های سنگین موجب آلودگی محیط زیست شوند. در تحقیق حاضر، به منظور بررسی کارایی جدایه‌های سینوریزوبیوم در همزیستی با گیاه یونجه در یک آزمون گلخانه‌ای تأثیر ۳۲ جدایه *سینوریزوبیوم* همراه با دو تیمار شاهد یکی مثبت (بدون تلقیح با کود نیتراتی) و دیگری منفی (بدون تلقیح و بدون کود نیتراتی) بر وزن تر و خشک اندام هوایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد جدایه‌های SR8، SR14، SR15، SR26، SR42، SR51، SR52 و SR75 همزیستی خیلی مؤثری با گیاه یونجه ایجاد کردند. بر اساس نتایج مربوط به ارزیابی فاکتور مؤثر بودن همزیستی، ۲ جدایه (SR15 و SR42) از بین ۳۲ جدایه *سینوریزوبیوم* انتخاب و در یک آزمون گلخانه‌ای تأثیر کاربرد تلفیقی این جدایه‌ها با باکتری‌های PGPR (P52 و P9) بر شاخص‌های رشد و جذب عناصر غذایی تحت تأثیر سطوح مختلف خشکی (۵۰،۷۰ و ۳۰ درصد رطوبت ظرفیت زراعی) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های *سینوریزوبیوم* بر وزن خشک اندام هوایی، باکتری‌های PGPR بر وزن خشک اندام هوایی و تعداد گره و هم‌چنین اثر متقابل باکتری‌های PGPR و تنش خشکی بر وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و تعداد گره اثر معنی‌داری نشان دادند. در مورد جذب عناصر غذایی، جدایه‌های *سینوریزوبیوم* تنها بر جذب منیزیم اندام هوایی اثر معنی‌داری داشتند لیکن تأثیر باکتری‌های PGPR بر جذب عناصر نیتروژن، کلسیم، منیزیم و پتاسیم و اثر متقابل جدایه‌های *سینوریزوبیوم* و باکتری‌های PGPR بر جذب آهن اندام هوایی معنی‌دار شد. هم‌چنین اثر متقابل جدایه‌های *سینوریزوبیوم* و تنش خشکی بر جذب آهن و فسفر اندام هوایی و باکتری‌های PGPR و تنش خشکی بر جذب آهن، مس، نیتروژن و منیزیم اندام هوایی معنی‌دار گردید. هم‌چنین نتایج نشان داد که با افزایش تنش خشکی مقادیر شاخص‌های رشد و جذب عناصر غذایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت.

واژگان کلیدی : *سینوریزوبیوم*، باکتری‌های محرک رشد گیاه، یونجه

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه

مقدمه ۱

فصل دوم : پیشینه‌ی پژوهش

۲-۱- نیتروژن ۵

۲-۲- تثبیت زیستی نیتروژن ۶

۲-۲-۱- عوامل مؤثر بر تثبیت زیستی نیتروژن ۶

۲- ۳- باکتری‌های ریزوبیوم ۷

۲- ۴- *سینوریزوبیوم* ۸

۲- ۵- عوامل مؤثر بر پراکنش و پایداری باکتری‌های ریزوبیومی در طبیعت ۸

۲- ۶- گیاهان لگوم ۹

۲- ۷- تأثیر تلقیح باکتری‌های ریزوبیومی روی رشد گیاهان میزبان ۱۰

۲- ۸- باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) ۱۴

۲- ۹- مکانیسم‌های باکتری‌های محرک رشد گیاه ۱۵

۲-۱۰- تأثیر تلقیح تلفیقی باکتری‌های ریزوبیومی با باکتری‌های محرک رشد گیاه
بر رشد گیاهان میزبان ۱۵

۲- ۱۱- تأثیر تنش خشکی بر جدایه‌های ریزوبیومی ۱۹

فصل سوم : مواد و روش‌ها

۳-۱- نمونه‌برداری و کشت مقدماتی ۲۲

۳-۲- جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های *سینوریزوبیوم* از گره‌ها ۲۴

۳- ۳- آزمون‌های گلخانه‌ای ۲۴

۳-۳-۱- تعیین کارایی همزیستی جدایه‌های سینوریزوبیوم در گلخانه (آزمون گلخانه‌ای شماره ۱) ۲۴

۳- ۳-۱- ۱- تهیه‌ی مایه تلقیح جدایه *سینوریزوبیوم* ۲۴

۳- ۳-۱- ۲-آماده سازی بذرها جهت کشت ۲۵

۳- ۳-۱- ۳ کشت در گلدان‌ها ۲۵
۳-۳-۲- بررسی تأثیر تلقیح تلفیقی باکتری‌های ریزوبیومی با باکتری‌های محرک رشد گیاه
بر رشد گیاهان میزبان تحت تنش خشکی (آزمون گلخانه‌ای شماره ۲) ۲۶
۳- ۳-۲- ۱- تهیه‌ی مایه تلقیح باکتریایی ۲۶
۳- ۳-۲-۲- کشت در گلدان‌ها ۲۶
۳- ۳-۲-۳ برداشت و تجزیه شیمیایی ۲۷
۳-۴- تجزیه‌های آماری ۲۸

فصل چهارم : نتایج و بحث

۴- ۱- بررسی کارایی جدایه‌های سینوریزوبیوم در همزیستی با گیاه یونجه
(تعیین فاکتور مؤثر بودن (S.E)) ۲۹
۴- ۱-۱- تأثیر جدایه‌های مورد آزمایش بر رشد یونجه ۲۹
۴- ۱-۲- فاکتور مؤثر بودن همزیستی ۳۴
۴-۲- مقایسه اثر جدایه‌های منتخب سینوریزوبیوم و باکتری‌های PGPR و تنش خشکی
بر شاخص‌های رشد و تولید گره در گیاه یونجه ۳۶
۴-۲-۱- مقایسه تأثیر جدایه‌های منتخب *سینوریزوبیوم* بر شاخص‌های رشد و تولید گره ۳۷
۴-۲-۲- تأثیر کاربرد باکتری‌های PGPR بر تولید گره ۴۰
۴-۲-۳- تأثیر تنش خشکی بر شاخص‌های رشد و تولید گره ۴۱
۴- ۲-۴- بررسی اثرات متقابل جدایه‌های منتخب سینوریزوبیوم، باکتری‌های PGPR
و تنش خشکی بر شاخص‌های رشد و تعداد گره ۴۴
۴- ۳- مقایسه اثر جدایه‌های منتخب *سینوریزوبیوم*، باکتری‌های PGPR و تنش خشکی
بر جذب عناصر غذایی توسط گیاه یونجه ۴۸
۴-۳-۱- عناصر پرمصرف ۴۸
۴-۳-۱-۱- مقایسه تأثیر جدایه‌های *سینوریزوبیوم* بر جذب عناصر غذایی پرمصرف ۴۹
۴-۳-۱- ۲- تأثیر کاربرد باکتری‌های PGPR بر جذب عناصر غذایی پرمصرف ۵۰
۴-۳-۱-۳ تأثیر تنش خشکی بر جذب عناصر غذایی پر مصرف ۵۴
۴-۳-۱- ۴- بررسی اثرات متقابل جدایه‌های منتخب سینوریزوبیوم، باکتری‌های PGPR
و تنش خشکی بر جذب عناصر غذایی پر مصرف ۵۷
۴-۳-۲- عناصر کم‌مصرف ۶۰
۴-۳-۲-۱- تأثیرکاربرد تنش خشکی بر جذب عناصر غذایی کم‌مصرف ۶۱
۴-۳-۲- ۲- بررسی اثرات متقابل جدایه‌های منتخب سینوریزوبیوم، باکتری‌های PGPR
و تنش خشکی بر جذب عناصر غذایی کم‌مصرف ۶۳

فصل پنجم : نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتیجه‌گیری ۶۸
پیشنهادها ۶۹

منابع

منابع ۷۰

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل۴-۱- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر وزن تر اندام هوایی یونجه ۳۲
شکل ۴-۲- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر وزن خشک اندام هوایی یونجه ۳۳
شکل ۴-۳- مقایسه میانگین تیمارهای باکتری بر وزن خشک اندام هوایی یونجه ۳۸
شکل ۴-۴- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر تعداد گره در ریشه یونجه ۳۹
شکل ۴- ۵- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر تعداد گره در ریشه یونجه ۴۰
شکل ۴-۶- تأثیر کاربرد سطوح خشکی بر وزن خشک اندام هوایی یونجه ۴۱
شکل۴-۷- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر وزن خشک ریشه یونجه ۴۲
شکل ۴-۸- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر تعداد گره ریشه یونجه ۴۲
شکل ۴-۹- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر وزن خشک اندام هوایی تحت تنش خشکی ۴۵
شکل ۴-۱۰- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر وزن خشک ریشه تحت تنش خشکی ۴۵
شکل ۴-۱۱- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر تعداد گره تحت تنش خشکی ۴۷
شکل ۴-۱۲- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب منیزیم اندام هوایی یونجه ۴۹
شکل ۴- ۱۳- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب نیتروژن اندام هوایی یونجه ۵۱
شکل ۴-۱۴- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب پتاسیم اندام هوایی یونجه ۵۲
شکل ۴-۱۵- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب منیزیم اندام هوایی یونجه ۵۲
شکل۴- ۱۶- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب کلسیم اندام هوایی یونجه ۵۳
شکل ۴-۱۷- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب نیتروژن اندام هوایی یونجه ۵۴
شکل ۴-۱۸- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب فسفر اندام هوایی یونجه ۵۵
شکل ۴-۱۹- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب پتاسیم اندام هوایی یونجه ۵۵
شکل ۴- ۲۰- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب کلسیم اندام هوایی یونجه ۵۶
شکل ۴-۲۱- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب منیزیم اندام هوایی یونجه ۵۶
شکل ۴-۲۲- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب نیتروژن اندام هوایی تحت تنش خشکی ۵۷
شکل ۴-۲۳- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب منیزیم اندام هوایی تحت تنش خشکی..... ۵۸

شکل ۴-۲۴- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب فسفر اندام هوایی تحت تنش خشکی..... ۵۹
شکل ۴- ۲۵- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب آهن اندام هوایی یونجه ۶۱
شکل ۴-۲۶- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب منگنز اندام هوایی یونجه..... ۶۲
شکل ۴-۲۷- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب روی اندام هوایی یونجه ۶۲
شکل ۴-۲۸- تأثیر کاربرد سطوح مختلف خشکی بر جذب مس اندام هوایی یونجه ۶۳
شکل ۴- ۲۹- تأثیر کاربرد متقابل باکتری‌ها بر جذب آهن اندام هوایی یونجه..... ۶۴
شکل ۴-۳۰- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب آهن اندام هوایی تحت تنش خشکی ۶۵
شکل ۴-۳۱- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب آهن اندام هوایی تحت تنش خشکی ۶۷
شکل ۴- ۳۲- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر جذب مس اندام هوایی تحت تنش خشکی ۶۷

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۳-۱- نام مناطق نمونه‌برداری شده ۲۳
جدول۳-۲- مقایسه سویه‌ها از نظر خصوصیات PGPR ۲۶
جدول۴-۱- نتایج تجزیه واریانس اثر جدایه‌های مورد آزمایش بر وزن تر و خشک اندام هوایی یونجه ۳۰
جدول ۴-۲- نتایج موثر بودن همزیستی جدایه‌های سینوریزوبیوم ۳۵
جدول۴ - ۳- نتایج تجزیه واریانس اثرات جدایه‌های سینوریزوبیوم، PGPR، خشکی و
اثرات متقابل آن‌ها بر جذب عناصر غذایی پرمصرف ۳۶
جدول ۴- ۴- نتایج تجزیه واریانس اثرات جدایه‌های سینوریزوبیوم، PGPR، خشکی
و اثرات متقابل آن‌ها بر جذب عناصر غذایی پرمصرف..... ۴۸
جدول ۴- ۵- نتایج تجزیه واریانس اثرات جدایه‌های سینوریزوبیوم، PGPR، خشکی
و اثرات متقابل آن‌ها بر جذب عناصر غذایی کم‌مصرف ۶۰

فصل اول

مقدمه

کشت متوالی گیاهان در اراضی باعث کاهش حاصلخیزی خاک و ایجاد کمبود عناصر غذایی برای گیاه خواهد شد. در این میان کمبود نیتروژن که یکی از عناصر پرمصرف برای گیاهان به ویژه گیاهان زراعی می‌باشد، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. کمبود نیتروژن بر رشد و نمو گیاه اثر منفی گذاشته و در نهایت به کاهش عملکرد منتهی می‌شود (رحمانی، ۱۳۷۹). استفاده از کودهای شیمیایی نظیر کودهای نیتروژنه، فسفره، پتاسه و عناصر کم مصرف ممکن است در کوتاه مدت اثر مثبتی بر افزایش محصول داشته باشند، اما به مرور زمان بر روی ساختمان خاک اثر منفی گذاشته و مازاد آن با آب باران و یا آبیاری شسته شده و موجب آلودگی آب‌های زیرزمینی خواهد شد. ادامه این روند مشکلات بسیاری را برای محیط زیست، انسان و حیوانات به ویژه دام‌های اهلی ایجاد نموده و هزینه‌های گزافی را به بار خواهد آورد. یکی از روش‌های سودمند برای پیش‌گیری از ضرر و زیان ناشی از به کارگیری کودهای شیمیایی، استفاده از باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن می‌باشد (Peoples *et al*., 1995). در این شرایط علاوه بر تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاه، حاصلخیزی خاک افزایش و اصلاح خاک نیز بهبود خواهد یافت. در این راستا با کشت گیاهان تیره نخود به ویژه یونجه، نیتروژن هوا به واسطه همزیستی

گیاه لگوم با سویه‌های *ریزوبیوم* در گره‌های ریشه تثبیت شده و در اختیار گیاه قرار خواهد گرفت. مازاد آن نیز در پایان فصل رویشی با جدا شدن گره‌ها از ریشه به خاک اضافه شده و حاصلخیزی خاک را افزایش خواهد داد. در شروع فصل رویش بعد نیز، باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن دوباره فعال شده و به تثبیت نیتروژن ادامه خواهند داد. در این زمینه از محققان زیادی گزارش شده است که عوامل متعددی مانند نوع گیاه، قدرت تثبیت‌کنندگی باکتری، مقدار نیتروژن معدنی، میزان فسفر، پتاسیم، اسیدیته، وجود عناصر غذایی قابل استفاده در خاک و شرایط آب و هوایی فصلی در تثبیت نیتروژن اثر زیادی دارند (Brockwell *et al*., 1995; Thies *et al*., 1995).

نیتروژن به عنوان یکی از عناصر اصلی مورد نیاز گیاه جهت رشد و نمو شناخته شده و کمبود آن به همراه آب می تواند یکی از عوامل محدودکننده اصلی در تولیدات گیاهی باشد. در بحث حاصلخیزی خاک، نیتروژن جایگاه ویژه‌ای دارد. نیتروژن از روش‌های مختلفی به خاک اضافه می‌گردد از جمله می‌توان به افزایش آن از طریق کودهای شیمیایی نیترات‌آمونیوم، اوره و غیره اشاره نمود. تثبیت نیتروژن هوا که در طبیعت به وقوع می‌پیوندد شامل تثبیت بیولوژیک و غیربیولوژیک می‌باشد. برگشت نیتروژن از طریق تثبیت بیولوژیک باکتری‌های همزیست *ریزوبیوم* از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. مدیریت نیتروژن در محیط‌های طبیعی به ویژه مراتع، مناطق خشک و نیمه‌خشک ایجاب می‌کند که به کمک عوامل موجود در همان محیط، نیتروژن مورد نیاز گیاه تأمین شود (شفیع‌زاده و همکاران، ۱۳۸۶).

نیتروژن مولکولی به سه روش به اشکال یونی تبدیل و قابل جذب می‌گردد. یکی از این روش‌ها تثبیت بیولوژیکی است که به وسیله موجودات زنده از جمله باکتری‌ها انجام می‌گیرد (محمودی، ۱۳۷۴). نیاز گیاهان به نیتروژن بیش از سایر عناصر است و از آن به عنوان عنصر حاصلخیز خاک نام برده می‌شود (زرین‌کفش، ۱۳۶۸).

برآورد رقمی حدود ۱۷۵ میلیون تن نیتروژن در سال برای مقدار کل تثبیت بیولوژیک در سطح جهانی نشانگر برتری فعالیت تثبیت‌کننده‌های نیتروژن در مقایسه با توان تولیدی کارخانه‌های کودهای شیمیایی است (خاوازی و همکاران، ۱۳۸۰). امروزه در برنامه‌ریزی برای سیستم‌های کشاورزی پایدار، استفاده از همزیستی ریزوبیوم_لگومینوز ضرورتی اساسی تلقی می‌شود. تمام فواید این همزیستی و شرط اصلی برای این‌که بتوان از آن به عنوان جایگزین مناسب برای کودهای شیمیایی استفاده کرد این است که گیاه از ابتدای رویش در خاک، تعداد کافی از سویه‌های فعال و کاملاً مؤثر *ریزوبیوم* را در اختیار داشته باشد به‌طوری که سیستم همزیستی بتواند با حداکثر توان ظرفیت خود تثبیت نیتروژن را انجام دهد. برای تأمین این هدف، تلقیح باکتری‌های ریزوبیومی به بذر ضروری است. البته عوامل

محیطی، وجود باکتری‌های بومی و کاربرد نیتروژن بیش از حد، در این مسئله تأثیر بسزایی دارند (Vargas *et al*., 2000).

در کشاورزی نیتروژن تثبیت شده به روش بیولوژیک عمدتاً توسط باکتری‌های ریزوبیومی و در همزیستی با لگوم‌ها تولید می‌شود. اهمیت این فرآیند در این است که در مصرف کودهای شیمیایی صرفه‌جویی می‌شود، مقدار نیتروژن با توجه به نیاز گیاه در اختیار آن قرار می‌گیرد و در نتیجه عملکرد گیاه بسیار مطلوب‌تر خواهد بود. هم‌چنین مصرف بیش از حد کودهای زیستی بر خلاف کودهای شیمیایی مشکلی برای محصول و اکوسیستم ایجاد نمی‌کند. از طرف دیگر به دنبال کاشت گیاهان همزیست با باکتری‌ها، خاک از نظر نیتروژن قابل جذب غنی شده و برای کاشت گیاهان دیگر نیز مفید خواهد بود (Herridge *et al*., 2001).

حاصلخیزی بسیار کم خاک‌های مناطق گرم و خشک به عنوان محدودکننده‌ترین عامل در بهره‌وری خاک‌های این مناطق مطرح است. در واقع خشکی و شوری باعث کمبود ماده آلی، کاهش معدنی شدن ترکیب‌های آلی نیتروژن‌دار، کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن، کاهش جذب نیترات در اثر عرضه زیاد آنیون کلر و در نتیجه موجب کاهش نیتروژن در گیاه می‌شوند. بدین جهت به منظور تأمین نیتروژن مورد نیاز گیاهان همه ساله مقادیر زیادی کود نیتروژنه مصرف می‌شود که نه تنها هزینه‌های زیادی را به زارعین تحمیل می‌کند، بلکه مشکلات زیست محیطی و افزایش شوری خاک را نیز به دنبال خواهد داشت. لذا استفاده از گیاهان مقاوم به شوری و خشکی که قادر به میزبانی میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن می‌باشند به عنوان یکی از راه‌حل‌های این مشکل مطرح می‌باشد. یونجه یکی از گیاهان علوفه‌ای مقاوم است که در تنش‌های محیطی مختلف از جمله شوری، خشکی و دماهای نامناسب می‌تواند رشد کند (Alikhani and Saleh Rasttin, 2002). از طرفی تثبیت زیستی نیتروژن در اثر همزیستی باکتری‌های *سینوریزوبیوم* و گیاهان لگومینوز به عنوان یکی از روش‌های کم‌هزینه و بدون آلودگی برای تأمین نیاز نیتروژن گیاهان علوفه‌ای تیره بقولات می‌باشد که از نظر تولید مواد غذایی و توسعه مراتع اهمیت دارند (Herridge *et al*., 2001). تلقیح گیاهان لگومینوز با جدایه‌های بومی مقاوم به شوری و خشکی در شرایط نامساعد محیطی، تأثیر مثبتی در رابطه همزیستی لگوم_ریزوبیوم داشته و در نتیجه افزایش تثبیت نیتروژن و عملکرد گیاه را به دنبال دارد (Jebara, 2000).

در سال‌های اخیر به تلقیح تلفیقی ریزوبیوم‌ها با باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)[1] به منظور افزایش پتانسیل گره‌زایی و نهایتاً رشد گیاه توجه بیشتری شده است (Parmar and Dadarwal,

[1] Plant growth promoting rhizobacteria

1999). در بیشتر کشورها، باکتری مخصوص تلقیح در همه خاک‌ها وجود نداشته یا تعداد اندکی از آن در خاک وجود دارد. جایی که قبلاً بقولات کشت نشده است یا محدودیت خاکی یا اقلیمی وجود دارد نیاز به مایه تلقیح ضرورت دارد. حضور باکتری‌های تنظیم‌کننده رشد در محیط ریشه گیاه، مزایایی برای رشد گیاه در پی دارند که در نتیجه آن جذب مواد غذایی بیشتر می‌شود (Gray and Smith, 2005). این باکتری‌ها با ساخت انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه باعث افزایش رشد و کیفیت محصول شده و از طریق مکانیسم‌های مختلف باعث ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان می‌شوند. این مقاومت باعث می‌شود گیاه تنش‌های محیطی مانند عدم تهویه، آلودگی به عناصر سنگین، شوری، تنش خشکی، آفات و بیماری‌ها را تحمل نماید. امروزه استفاده از جنس‌های مناسب باکتری‌های محرک رشد به منظور بهبود رشد گیاه، کاهش آلودگی ناشی از مصرف کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها در بسیاری از نقاط دنیا مرسوم می‌باشد که به عنوان مایه تلقیح محرک رشد و یا آفت‌کش‌های زیستی به فروش می‌رسند (Glick, 1995).

باکتری‌های محرک رشد گیاه باکتری‌هایی هستند که می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلف شامل تثبیت نیتروژن، حل کردن فسفات‌های نامحلول، تأمین آهن از طریق تولید سیدروفورها، تولید فیتوهورمون‌هایی چون اکسین، سیتوکینین، جیبرلین و کم کردن اتیلن باعث بهبود افزایش رشد و عملکرد گیاه شوند (Kloepper *et al*., 1989).

تا به حال تحقیقات کمتری راجع به تأثیر متقابل باکتری‌های همزیست و باکتری‌های محرک رشد گیاه تحت شرایط تنش خشکی انجام شده است. بنابراین هدف این تحقیق، بررسی تلقیح هم‌زمان باکتری‌های PGPR با باکتری‌های ریزوبیومی به‌منظور افزایش کارآمدی باکتری‌های *سینوریزوبیوم* درافزایش رشد گیاه یونجه رقم بمی و تأثیر تنش خشکی بر آن‌ها می‌باشد.

فصل دوم

پیشینه‌ی پژوهش

۲-۱- نیتروژن

نیتروژن مهم‌ترین عنصر در بیوسفر است و نیاز گیاهان به این عنصر از سایر عناصر غذایی بیشتر می‌باشد. به همین دلیل، این عنصر در رأس عناصر پر مصرف قرار دارد و حدود ۰/۵ تا ۵ درصد از وزن خشک گیاهان را تشکیل می‌دهد. نیتروژن یک عنصر کلیدی در ساختمان بسیاری از ترکیب‌های موجود در سلول‌های گیاهی است که مهم‌ترین کاربرد آن در ساختمان اسیدهای آمینه (Dixon and Wheeler, 1986). کلروفیل (Subba Rao, 1988)، مولکول ATP، هورمون‌ها و آنزیم‌ها (سالاردینی، ۱۳۷۴) می‌باشد. نیتروژن هم‌چنین در رشد گیاه، توسعه ریشه و جذب سایر عناصر غذایی به ویژه فسفر نقش مثبتی دارد (سالاردینی، ۱۳۷۴؛ Wani *et al*., 1995). حدود ۷۸ درصد اتمسفر از نیتروژن تشکیل شده، اما این عنصر به شکل مولکولی (N_2) غیر قابل استفاده برای گیاهان عالی است. برخی از میکروارگانیسم‌ها به صورت آزاد یا همزیست می‌توانند نیتروژن مولکولی هوا را در فرایند تثبیت زیستی نیتروژن به فرم قابل استفاده برای گیاه تغییر دهند (Graham and Vance, 1999). نیتروژن مهم‌ترین

عنصری است که مورد نیاز گیاه بوده و تغذیه بهینه نیتروژنی اثر مشهودی بر رشد و عملکرد گیاه خواهد داشت. از ویژگی‌های مهم گیاهان لگوم از جمله لوبیا، داشتن رابطه همزیستی تثبیت‌کننده نیتروژن با باکتری‌های خاکزی از جنس *ریزوبیوم* می باشد (Giller, 2001). در شرایطی که عوامل محیطی بهینه باشند، گیاهانی که با باکتری‌های ریزوبیومی گره‌دار شده باشند، می‌توانند مقادیر قابل توجهی نیتروژن تثبیت کنند (Bliss, 1993).

۲-۲- تثبیت زیستی نیتروژن

تثبیت زیستی نیتروژن به وسیله گروهی از موجودات پروکاریوت که به آنها دی‌آزوتروف گفته می‌شود صورت می‌گیرد. تمامی این موجودات دارای سیستم آنزیمی نیتروژناز بوده و به کمک این آنزیم قادر به احیاء نیتروژن مولکولی و تبدیل آن به شکل آمونیاک هستند (رحمانی، ۱۳۷۹). تثبیت زیستی نیتروژن به وسیله سه گروه از میکروارگانیسم‌ها صورت می‌گیرد. گروهی به صورت غیرهمزیست و آزادزی زندگی می کنند. این گروه را می‌توان در سه دسته طبقه‌بندی کرد:

۱- باکتری‌های هوازی (بیشتر از نوع ازتوباکتر[1])

۲- باکتری‌های بی‌هوازی (بویژه باکتری‌های جنس *کلستریدیوم*[2])

۳- جلبک‌های سبز _ آبی یا سیانوباکتری‌ها[3]

دسته دوم که به صورت همزیست با سایر گیاهان زندگی می‌کنند، انواع زیادی از گیاهان تیره بقولات که به عنوان گیاهان زراعی کشت می‌شوند میزبان میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن هستند و همین امر اهمیت این فرآیند را در کشاورزی نشان می‌دهد. دسته سوم باکتری‌های همیار تثبیت‌کننده نیتروژن که از طریق تماس فیزیکی با گیاهان و بدون تشکیل اندام ساختمانی خاصی نیتروژن را تثبیت می‌کنند (Randhawa *et al.,* 2003).

۲-۲-۱- عوامل مؤثر بر تثبیت زیستی نیتروژن

عوامل مؤثر بر تثبیت زیستی نیتروژن به شرح زیر می‌باشد (Wahab and Heazi, 1998; Lopez *et al*., 1988).

۱- عوامل زیستی شامل نوع گیاه میزبان و میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده

[1] Azotobacter
[2] *Clostridium*
[3] *Syanobacteria*

۲- عوامل محیطی شامل دما، نور، اکسیژن، نیتروژن معدنی، خاک، عوامل بیماری‌زا، خشکی و شوری
۳- عوامل تغذیه‌ای

در عوامل زیستی، شرایط ژنتیکی گیاه میزبان و میکروارگانیسم همزیست در برقراری رابطه زیستی بین دو ارگانیسم و انجام فرایند تثبیت زیستی نیتروژن تأثیرگذار هستند. عوامل محیطی و تغذیه‌ای نیز از طریق تأثیرگذاری بر مواد ساخته شده طی فرایند فتوسنتز، تثبیت زیستی نیتروژن را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Stone *et al*., 1985). بنابراین همه عواملی که بر بقاء باکتری‌های *ریزوبیوم* و فتوسنتز گیاه تأثیر دارند، تثبیت زیستی نیتروژن را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند.

۲-۳- باکتری‌های ریزوبیوم

باکتری‌های ریزوبیومی از خانواده‌ی ریزوبیاسه، گرم‌منفی، هوازی‌اجباری و شیمیوارگانوتروف[1] یا شیمیولیتوتروف[2] هستند. در جدیدترین طبقه‌بندی برگی، ریزوبیوم‌ها بر پایه ویژگی‌های فیلوژنیک در شاخه‌ی پروتئوباکتری‌ها، زیرشاخه آلفا، راسته ریزوبیال، خانواده ریزوبیاسه و در جنس‌های مختلف قرار می‌گیرند (Malek and Sanjnaga, 2000). بر اساس این طبقه‌بندی در خانواده‌ی ریزوبیاسه پنج جنس تشخیص داده شده است که جنس‌های *ریزوبیوم*، *سینوریزوبیوم*، *برادی‌ریزوبیوم*، *مزوریزوبیوم* و *آزوریزوبیوم*[3] قادرند با تشکیل گره روی ریشه یا ساقه‌ی گیاهان لگوم میزبان، نیتروژن اتمسفر را تثبیت کرده و به فرم قابل استفاده برای گیاه تبدیل کنند (Gage, 1994). بین جنس‌های مختلف ممکن است از نظر نوع میزبان، ترشح متابولیت‌ها، متابولیسم کربوهیدرات‌ها، استفاده از منابع کربن، احتیاج به عناصر غذایی، نیاز به مواد محرک رشد از قبیل ویتامین‌ها و رشد در شرایط محیطی مختلف تفاوت وجود داشته باشد (Rhom and Werner, 1985). جمعیت جدایه‌های ریزوبیومی در مناطق مختلف متفاوت است و به عواملی مانند شرایط محیطی، سایر میکروارگانیسم‌های خاک، رقابت بین آن‌ها و ترشحات ریشه گیاه بستگی دارد (Werner, 1992). فاکتورهایی که مقدار نیتروژن تثبیت‌شده را کنترل می‌کنند، عبارتند از: نیتروژن قابل دسترس خاک، سازگاری دو طرف همزیست و عوامل محیطی مثل رطوبت و دما (Zahran, 1999).

[1] Chemoorganotroph
[2] Chemolitotroph
[3] *Azorhizobium*

۲-۴- *سینوریزوبیوم*

باکتری‌های جنس *سینوریزوبیوم* گرم‌منفی، متحرک و هوازی بوده و دارای نوعی متابولیسم تنفسی هستند که اکسیژن به عنوان گیرنده‌ی نهایی الکترون می‌باشد. این باکتری‌ها غالباً در مقادیر کمتر از یک کیلو پاسکال اکسیژن نیز قادر به رشد می‌باشند. دمای مناسب برای این باکتری‌ها بین ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس و pH مناسب برای فعالیت آن‌ها ۶ تا ۷ می‌باشد. این باکتری‌ها در شرایط نامساعد، رشد پلی‌مورفیک دارند (Werner, 1992). یکی از گونه‌های مهم *سینوریزوبیوم*، *سینوریزوبیوم ملیلوتی*[1] است که در ارتباط همزیستی با گیاه یونجه، تثبیت نیتروژن را انجام می‌دهد. تشکیل گره در این باکتری‌ها توسط ۲۶ ژن که روی مگاپلاسمید قرار دارند کنترل و هدایت می‌شود (Thrucet *et al*., 1985). جنس *سینوریزوبیوم* شامل پنج گونه *S. fredii*، *S. terangae*، S. *medicae*، *S. meliloti* و *S. Sheli* است که در بین آن‌ها *S. meliloti* و *S. medicae* که در جنس‌های گیاهی *Medicago*، *Melilotus* و *Trigonella* تولید گره می‌کنند قرابت بیشتری با هم دارند (Guo *et al*., 2007). گونه *S. medica* اغلب در یونجه‌های یک‌ساله و گونه *S. meliloti* در یونجه‌های چندساله گره‌زایی و تثبیت نیتروژن را انجام می‌دهند (Biondi *et al*., 2003).

۲-۵- عوامل مؤثر بر پراکنش و پایداری باکتری‌های ریزوبیومی در طبیعت

وجود گره بر روی ریشه گیاهان خانواده لگوم در یک منطقه دلیل بر وجود سویه *ریزوبیوم* است. ریزوبیوم‌های موجود در یک منطقه مربوط به میزبان‌های مشخصی است که در آن منطقه وجود دارند. از جمله عواملی که سبب توسعه *ریزوبیوم* می‌گردد، میزبان مناسب آن سویه *ریزوبیوم* می باشد. با توجه به این‌که هر سویه اختصاص به میزبان خاصی دارد، ممکن است سویه روی میزبان غیر اصلی نیز ایجاد گره کند ولی نیتروژن تثبیت نگردد. درجه حرارت (Gibson, 1980)، نور (Feigfnbaum and Mengle, 1979)، مقدار نیتروژن خاک (Eaglesham *et al*, 1983)، اسیدیته خاک (Quispel, 1974)، ویتامین‌ها (Subba Rao, 1971)، آب (Sprent, 1972)، اکسیژن (Criswell *et al*., 1977) عناصرغذایی مثل کلسیم، مولیبدن، کبالت، پتاسیم، آهن، بور و اسیدیته خاک از جمله عوامل اصلی تعیین کننده حضور یک سویه در یک منطقه، تشکیل غده و تثبیت نیتروژن است. از جمله موارد دیگر می‌توان به سموم دفع آفات نباتی بخصوص قارچ‌کش‌های جیوه‌ای که جهت جلوگیری از پوسیدگی بذرها استفاده

[1] *Sinorhizobium meliloti*