

## ارزیابی توانایی تثبیت زیستی نیتروژن در سوبه‌های ریزوبیوم همزیست با بقولات در استان آذربایجان غربی Evaluation of potential of biological nitrogen fixation of Rhizobium strains in legume crops in West Azerbaijan province

علیرضا عیوضی<sup>۱</sup>، ابوالحسن فجری<sup>۲</sup>، محمود رضازاد<sup>۳</sup>، مقصود سلیمانپور<sup>۴</sup> و محمد رضایی<sup>۵</sup>

### چکیده

عیوضی، ع. ر.، ا. فجری، م. رضا زاد، م. سلیمانپور و م. رضایی. ۱۳۹۰. ارزیابی توانایی تثبیت زیستی نیتروژن در سوبه‌های ریزوبیوم همزیست با بقولات در استان آذربایجان غربی. مجله علوم زراعی ایران. ۱۳(۴): ۶۴۱-۶۲۷.

در این آزمایش توانایی تثبیت نیتروژن سوبه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از ۱۰ شهرستان استان آذربایجان غربی شامل ارومیه، خوی، ماکو، سلماس، مهاباد، میاندوآب، تکاب، سردشت، شاهیندژ و پیرانشهر در همزیستی با گیاهان یونجه، نخود، شبدر و لوبیا، در اتاقک رشد مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری‌های همزیست همراه با گیاهچه‌های شاهد (تلقیح نشده) در گلدان‌های حاوی پرلیت ضدعفونی شده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت شدند. نتایج نشان داد که گیاه شبدر در تیمار تلقیح از بیشترین تعداد گره و حداقل وزن گره برخوردار بود. گیاه لوبیا حداقل تعداد و بیشترین وزن گره را داشت. همزیستی سوبه ریزوبیوم جدا سازی شده از میاندوآب با یونجه، مهاباد با شبدر و ارومیه با لوبیا، بیشترین مقادیر را برای اکثر صفات گیاهی نشان داد. ضرایب همبستگی صفات نشان داد که میزان نیتروژن تثبیت شده با وزن اندام هوایی همبستگی مثبت و معنی‌داری داشته و این صفت می‌تواند به عنوان معیار غیرمستقیم از میزان تثبیت نیتروژن مورد استفاده قرار گیرد. به نظر می‌رسد که نیتروژن تثبیت شده توسط ریزوبیوم‌های برتر می‌تواند جایگزین مناسبی برای مصرف کود نیتروژن محسوب شود.

واژه‌های کلیدی: تثبیت زیستی نیتروژن، شبدر، لوبیا، نخود، یونجه و همزیستی.

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۲ تاریخ پذیرش: ۹۰/۲/۱۴

۱- استادیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی. عضو انجمن علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران (مکاتبه کننده)

(پست الکترونیک: alirezaeivazi@yahoo.com)

۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۳- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

۴- استادیار دانشکده فنی دانشگاه ارومیه

۵- محقق مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی

## مقدمه

نیتروژن یکی از عناصر پر مصرف در رشد گیاه است. تثبیت این عنصر در فرآیند همزیستی باکتری با گیاهان تیره بقولات در رفع نیاز غذایی گیاه و جایگزینی آن با کود شیمیایی نیتروژن از اهمیت خاصی برخوردار است. این جایگزینی از نظر اقتصادی و زیست محیطی در کشاورزی پایدار مورد توجه می‌باشد. نتایج آزمایش اوهارا و همکاران (Ohara *et al.*, 2002) نشان داده است که جهت افزایش کارایی تلقیح و بهبود قابلیت تولید بقولات، باید سویه‌هایی با توانایی بیشتر تثبیت نیتروژن، قابلیت بقا در شرایط مزرعه‌ای و با توان رقابتی بیشتر انتخاب شوند. پیمراچ و همکاران (Pimratch *et al.*, 2008) در بررسی اثر تنش رطوبتی بر صفات مرتبط با تثبیت نیتروژن در ژنوتیپ‌های بادام‌زمینی گزارش نمودند که تنش رطوبتی شدید نسبت به تنش ملایم، فعالیت نیتروژناز، تعداد گره و وزن خشک گره را تا دو برابر کاهش داده و وزن خشک گره با میزان تثبیت نیتروژن همبستگی مثبت و معنی‌داری داشت. انتخاب برای فعالیت بیشتر نیتروژناز می‌تواند به عنوان یک معیار غیر مستقیم در میزان تثبیت نیتروژن مورد استفاده قرار گیرد. فجری و همکاران (Fajri *et al.*, 2005) با مقایسه میزان تثبیت نیتروژن سویه‌های باکتری شبدر جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان‌های آذربایجان غربی و شرقی به همراه دو سویه باکتری وارداتی، با تلقیح آنها در دو رقم شبدر کرج و وینترپس (Winterpass)، مشاهده کردند که توانایی تثبیت نیتروژن در دو سویه باکتری وارداتی بیشتر از سویه‌های بومی جمع‌آوری شده بود. شایکا و جین (Saikia and Jain, 2007) معتقدند که با درک صحیح فرآیندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیک، تثبیت نیتروژن و انتقال ژن‌های آنها به گونه‌های غیر بقولات زراعی امکان‌پذیر است. محققان مختلف در بررسی اثر تنش خشکی بر رشد و میزان تثبیت نیتروژن سویه‌های مختلف گیاهان شبدر و یونجه و بررسی اثر

تنش شوری بر کارایی تثبیت بیولوژیک نیتروژن سویه‌های یونجه، ریزوبیوم‌های برتر را شناسایی نمودند (Galeshi, Hajebi and Heidari Sharifabad, 2005)؛ (Ebadi *et al.*, 1999; 2001). با توجه به نتایج تحقیقات قبلی، هدف از این آزمایش شناسایی بهترین سویه‌های باکتری ریزوبیوم همزیست با گیاهان یونجه، نخود، شبدر و لوبیا جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی بود.

## مواد و روش‌ها

ریشه و گره‌های حاوی باکتری ریزوبیوم گیاهان یونجه، نخود، لوبیا و شبدر از شهرستان‌های ارومیه، خوی، ماکو، سلماس، مهاباد، میاندوآب، تکاب، سردشت، شاهیندژ و پیرانشهر در بهار ۱۳۸۵ در مرحله گل‌دهی جمع‌آوری و به آزمایشگاه میکروب‌شناسی بخش علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه منتقل شدند. جداسازی سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده با روش اسمیت (Smith, 1989) انجام گرفت. ریشه هر یک از گیاهان با آب شستشو و گره‌ها از ریشه جدا شدند. بعد از ضدعفونی، گره‌ها در لوله آزمایش له شده و سپس در محیط کشت آگار مخمر مانیتول (Yeast Manitol Agar) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد تکثیر شدند. محیط کشت شامل فسفات پتاسیم ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم هفت مولکول آب، ۰/۲ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، د-مانیتول ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۰/۱ گرم و آگار ۱۵ گرم که در یک لیتر آب مقطر حل شدند (Fajri *et al.*, 2005). اسیدیته محلول بدست آمده با استفاده از اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم یک نرمال در حد ۶/۷ تنظیم گردید. لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت پس از ظاهر شدن کلنی‌های باکتری‌ها، به عنوان مایه تلقیح در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگه‌داری شدند. بذر گیاهان نخود رقم جم (*Cicer arietinum* L.)، لوبیا رقم

## نتایج و بحث

**صفات گیاهی یونجه:** تجزیه واریانس اثر تلقیح باکتری ریزوبیوم بر صفات گیاه یونجه نشان داد که اختلاف آماری معنی داری بین صفات اندازه‌گیری شده وجود داشت (جدول ۱). تلقیح باکتری سویه میان‌دوآب و ارومیه به ترتیب از بیشترین و کمترین تعداد و وزن گره، وزن خشک اندام هوایی و ریشه و میزان تثبیت نیتروژن برخوردار بودند (جدول ۲). گروه‌بندی سویه‌های باکتری یونجه مناطق مختلف استان نشان داد که سویه‌های باکتری میان‌دوآب و تکاب در یک گروه و ارومیه به تنهایی در گروه دوم و سایر سویه‌ها در گروه سوم طبقه‌بندی شدند. با این وجود، گروه‌بندی سویه‌های باکتری یونجه استان با روش تجزیه خوشه‌ای در سه گروه، به نظر می‌رسد که سویه‌های هر گروه از لحاظ ساختار میکروبی مشابه و سویه‌های مستقر در گروه‌های مختلف، تفاوت‌هایی داشته‌اند (شکل ۱). با توجه به اینکه سویه باکتری میان‌دوآب دارای بیشترین مقادیر برای کلیه صفات اندازه‌گیری شده بود، به نظر می‌رسد که این شهرستان یکی از مناطق مستعد کشت یونجه بوده و استفاده از باکتری این شهرستان برای کشت یونجه در سایر مناطق استان نیز امکان‌پذیر است.

وجود تنوع در بین سویه‌های باکتری یونجه حاکی از آن است که از این صفت می‌توان در اصلاح و انتخاب بین نمونه‌هایی با تعداد گره بیشتر استفاده نمود (Dilworth, 2001). وجود چنین تنوعی توسط حیدری شریف آباد و ایرانمنش (Heidari Sharifabad and Iranmanesh, 1996) در ارزیابی سه سویه باکتری بر روی شش رقم یونجه نیز گزارش شده است. تثبیت بیشتر نیتروژن در یونجه را می‌توان به افزایش تعداد برگ و اندام فتوسنتز کننده در این گیاه نسبت داد، زیرا دارا بودن سطح برگ مناسب و جذب نور کافی موجب افزایش توان فتوسنتزی گیاه می‌شود. بدین ترتیب انتقال کربوهیدرات به ریشه‌ها و گره‌ها موجب افزایش فعالیت باکتری‌های تثبیت کننده

اختر (*Phaseolus vulgaris* L.)، یونجه همدانی (*Medicago sativa* L.) و شبدر برسیم رقم کرج (*Trifolium alexandrinum* L.) در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی و در ظروف پتری روی کاغذ صافی کشت شدند. ریشه‌های گیاهچه‌های چهار روزه تحت شرایط کنترل شده با سویه‌های ریزوبیوم اختصاصی با غلظت یک میلی‌لیتر (حاوی  $10^8$  باکتری فعال) آغشته شدند (Somasegaran and Hoben, 1994).

گیاهچه‌های تلقیح شده با تراکم ۴ بوته برای نخود و لوبیا و ۱۰ بوته برای یونجه و شبدر در گلدان‌های پلاستیکی به قطر ۱۷ و ارتفاع ۲۰ سانتی‌متر (ضد‌عفونی شده در اسید کلریدریک یک درصد و بخار آب) حاوی پرلیت به ابعاد ۲×۲ میلی‌متر با ظرفیت نگه‌داری آب ۱۵ درصد کشت شدند (Fajri et al., 2005).

گلدان‌های کشت شده در اتاقک رشد کاملاً کنترل شده با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای روزانه و شبانه به ترتیب ۲۲ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰-۶۵ درصد و شدت نور ۱۰۰ لوکس قرار داده شدند و آبیاری آنها با محلول هوگلند فاقد نیتروژن انجام شد. زمان برداشت گیاهان لوبیا و نخود هشت هفته بعد از کاشت و یونجه و شبدر قبل از مرحله گل‌دهی بود. تعداد و وزن خشک گره در ریشه هر بوته، وزن خشک ریشه و اندام هوایی (پس از خشکاندن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت) و همچنین محتوای نیتروژن گیاه با روش میکروکجلدل (Micro-Kjeldahl) اندازه‌گیری شد (Bremner and Mulvaney, 1982). داده‌های آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار تجزیه واریانس شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار آماری MSTATC انجام گرفت. جهت تجزیه خوشه‌ای سویه‌های ریزوبیوم مناطق مختلف استان به روش حداقل واریانس از نرم‌افزار SPSS استفاده شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات گیاهی یونجه تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 1. Analysis of variance for alfalfa characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from West Azerbaijan province

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات (MS)				
			تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight	وزن اندام‌های هوایی Total dry matter	وزن ریشه Root weight	نیترژن تثبیت شده Fixed nitrogen
City	شهرستان	9	262.43**	6.33**	257822.59**	213431.85**	908.96**
Error	خطا	20	37.90	0.53	31053.33	44870.00	154.56
C.V (%)	ضریب تغییرات		10.05	11.25	7.38	9.34	7.10

ns: Not significant

ns: غیر معنی‌دار

\* and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

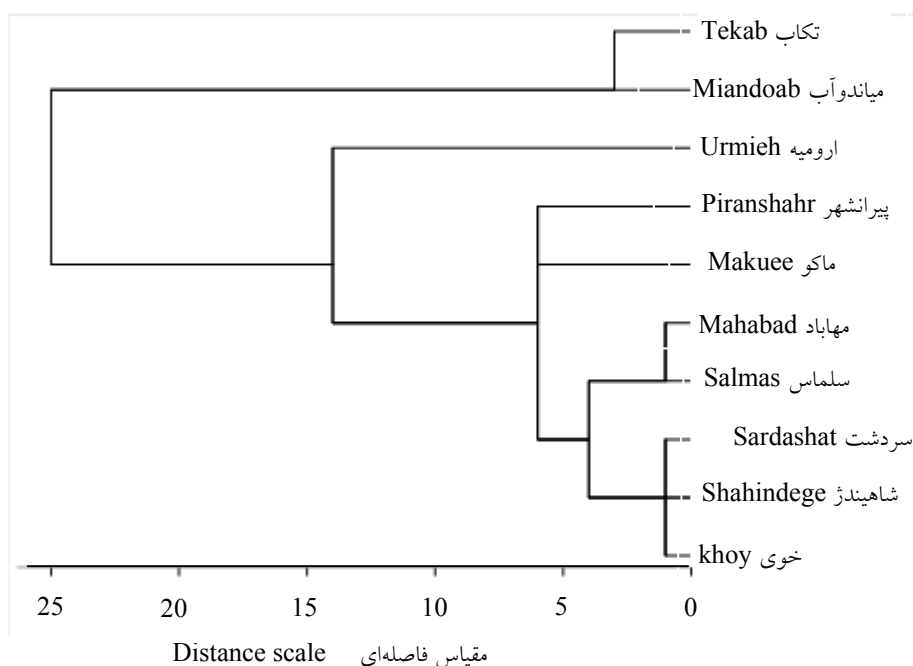
جدول ۲- مقایسه میانگین صفات گیاهی یونجه تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 2. Mean comparison of alfalfa characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from West Azerbaijan province

City	شهرستان	تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight (mg.plant <sup>-1</sup> )	وزن کل اندام هوایی Total dry matter (mg.plant <sup>-1</sup> )	وزن ریشه Root weight (mg.plant <sup>-1</sup> )	نیترژن تثبیت شده Fixed nitrogen (mg.plant <sup>-1</sup> )
Urmieh	ارومیه	48.3e	4.4e	1930e	1787e	141c
Khoy	خوی	53.3de	5.1de	2300cd	2230bcd	164b
Makuee	ماکو	66.3abc	7.6b	2330cd	2527abc	178b
Salmas	سلماس	66.6abc	7.6b	2166de	2170cd	177b
Mahabad	مهاباد	55.6cde	6.1cd	2196de	2300bcd	172b
Miandoab	میاندوآب	75.3a	9.0a	2963a	2700a	212a
Tekab	تکاب	74.3ab	7.3bc	2713ab	2613ab	182b
Sardasht	سردشت	63.3bcd	7.3bc	2386cd	2193cd	174b
Shahindege	شاهیندهژ	52.3de	5.7de	2346cd	2293bcd	172b
Piranshar	پیرانشهر	57.0cde	5.2de	2556bc	2113de	177b

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت آماری معنی‌داری ندارند

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan's Multiple Range Test



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای سویه‌های ریزوبیوم همزیست با یونجه جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Fig. 1. Cluster analysis of *Rhizobium* strain symbiosis with alfalfa collected from West Azerbaijan province

سلماس حداقل وزن گره در بوته را داشتند. سویه‌های مه‌باد و سلماس از وزن خشک اندام هوایی بالا و سردشت از وزن خشک اندام هوایی پایین برخوردار بودند. شبدرهای تلقیح شده با سویه‌های باکتری تکاب از بیشترین وزن خشک ریشه و خوی از کمترین وزن خشک ریشه برخوردار بودند (جدول ۴). شبدرهای تلقیح شده با سویه‌های باکتری سردشت کمترین میزان تثبیت نیتروژن و مه‌باد بیشترین مقدار تثبیت نیتروژن را دارا بودند. بنابراین به نظر می‌رسد که شهرستان مه‌باد با داشتن سویه‌های برتر برای این گیاه، یکی از مناطق مستعد کشت شبدر در استان باشد و برای کشت این گیاه در سایر مناطق، تلقیح با باکتری‌های موجود در خاک‌های این شهرستان مفید خواهد بود. در گروه‌بندی سویه‌های باکتری همزیست با شبدر، سویه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان‌های استان به دو گروه عمده طبقه‌بندی شدند که در گروه اول سویه‌های ماکو، مه‌باد و سلماس و در گروه دوم سویه‌های متعلق به شهرستان‌های خوی، میاندوآب،

نیتروژن می‌شود و با رشد بهتر گره‌ها، وزن آنها نیز افزایش یافته و موجب تثبیت بیشتر نیتروژن می‌شود. علت تنوع در گره‌زایی ریشه‌ها ممکن است در اثر پیام‌های متفاوت ناشی از مواد مترشح‌ه از سوی باکتری‌ها نظیر فلاونوئیدها بوده که موجب تحرک و جذب شیمیایی باکتری‌ها به گیاه میزبان می‌شود (Caetano-anoles *et al.*, 1988). فوجیتا و همکاران (Fujita *et al.*, 1994) اظهار داشتند که با توجه به تثبیت نیتروژن در گره‌ها وابسته به ارسال مواد کربوهیدراتی از بخش‌های هوایی گیاه به ریشه است، بنابراین با افزایش اندام فتوسنتز کننده (برگ) تثبیت نیتروژن نیز بیشتر می‌شود.

**صفات گیاهی شبدر:** بین پنج صفت مطالعه شده در سویه‌های باکتری شبدر در ۱۰ شهرستان اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۳). مقایسه میانگین صفات نشان داد که سویه باکتری مه‌باد دارای بیشترین تعداد گره و ماکو از کمترین تعداد گره برخوردار بود. سویه باکتری میاندوآب از بیشترین وزن گره در بوته و

جدول ۳- تجزیه واریانس صفات گیاهی شبدر تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 3. Analysis of variance for clover characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from West Azerbaijan province

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات (MS)				
			تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight	وزن اندام‌های هوایی Total dry matter	وزن ریشه Root weight	نیترژن تثبیت شده Fixed nitrogen
City	شهرستان	9	17428.72**	1459.39**	896588.51**	10815.18**	1074.18**
Error	خطا	20	1114.96	129.26	81180.0	2840.00	286.96
C.V (%)	ضریب تغییرات		13.67	18.12	13.63	15.13	18.54

ns: Not significant ns

ns: غیر معنی‌دار

\* and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

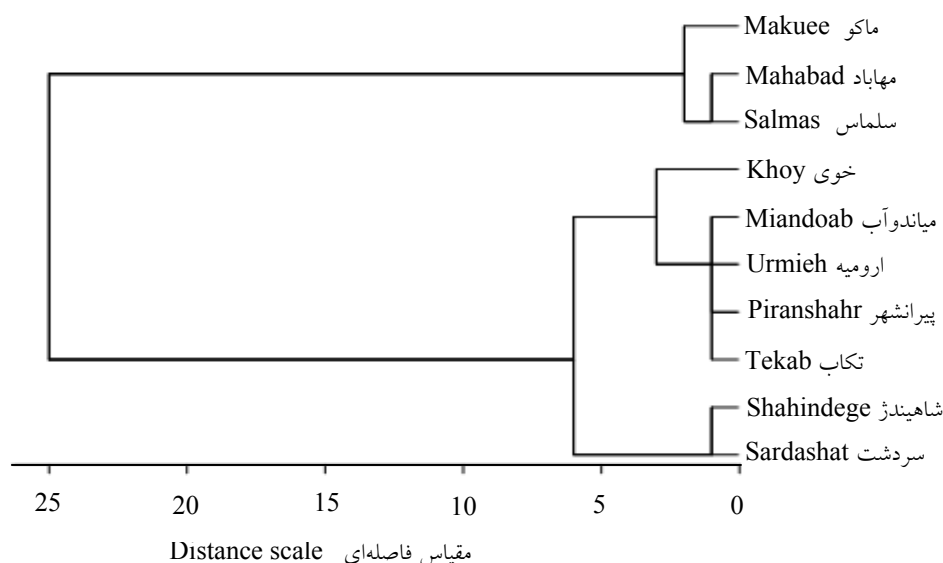
جدول ۴- مقایسه میانگین صفات گیاهی شبدر تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 4. Mean comparison of clover characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from West Azerbaijan province

City	شهرستان	تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight ( $\mu\text{g. plant}^{-1}$ )	وزن کل اندام‌های هوایی Total dry matter ( $\text{mg. plant}^{-1}$ )	وزن ریشه Root weight ( $\text{mg. plant}^{-1}$ )	نیترژن تثبیت شده Fixed nitrogen ( $\text{mg. plant}^{-1}$ )
Urmieh	ارومیه	196d	58.7c	1837bc	307bc	74cd
Khoy	خوی	184d	70.7abc	2123b	217c	85bcd
Makuee	ماکو	182d	56.3c	2683a	350ab	106ab
Salmas	سلماس	282c	18.7d	2927a	383ab	112ab
Mahabad	مهاباد	405a	35.7d	2887a	363ab	122a
Miandoab	میاندوآب	342b	86.3a	1853bc	333ab	100abc
Tekab	تکاب	194d	84.0ab	1853bc	437a	98abc
Sardasht	سردشت	196d	64.0bc	1480c	393ab	67d
Shahindege	شاهیندژ	218d	66.7abc	1507c	346ab	69cd
Piranshar	پیرانشهر	244cd	86.3a	1753bc	393ab	81bcd

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت آماری معنی‌داری ندارند

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan's Multiple Range Test



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای سویه‌های ریزوبیوم همزیست با شبدر جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Fig. 2. Cluster analysis of *Rihizobium* strain symbiosis with clover collected from West Azerbaijan province

سویه‌های ریزوبیوم میاندوآب و تکاب، سایر سویه‌های مناطق مختلف استان از لحاظ صفات مورد ارزیابی از مقادیر مشابهی برخوردار بودند. به نظر می‌رسد که علت پایین بودن صفات مورد ارزیابی در میاندوآب و تکاب ناشی از شور و قلیا بودن خاک‌های این مناطق باشد که باکتری‌های تثبیت کننده این گیاه که سازگار به آن منطقه هستند، به خوبی نتوانستند در چنین شرایطی تکثیر و با گیاه مورد نظر همزیست شوند. تجزیه خوشه‌ای سویه‌های باکتری همزیست با نخود مرتبط به شهرستان‌های استان را در دو گروه طبقه بندی نمود. در گروه اول سویه‌های باکتری ارومیه، خوی، تکاب و سلماس قرار گرفتند که به استثنای سویه باکتری تکاب، بقیه از لحاظ موقعیت جغرافیایی با هم مشابهت دارند، به طوری که سه شهرستان گروه اول از لحاظ موقعیت جغرافیایی مجاور هم می‌باشند. در گروه دوم سویه‌های باکتری مهاباد، شاهیندژ، میاندوآب، ماکو، پیرانشهر و سردشت قرار داشتند و به جز ماکو، سایر شهرستان‌ها از لحاظ جغرافیایی مجاور هم می‌باشند. علت این که ماکو در گروه‌بندی همدیف با شهرستان‌های جنوب

ارومیه، پیرانشهر، تکاب، شاهیندژ و سردشت قرار داشتند (شکل ۲). سویه باکتری شبدر مربوط به مهاباد در گروه اول و سردشت در انتهای گروه دوم قرار گرفته و به ترتیب بیشترین و کمترین تثبیت نیتروژن را دارا بودند. به نظر می‌رسد که اختلافات این نوع گروه‌بندی با موقعیت جغرافیایی شهرستان‌های مختلف ناشی از اثر بافت خاک و شرایط اقلیمی حاکم بر منطقه بوده که باعث سازگاری نوع خاصی از باکتری به شرایط محیطی شده است (شکل ۲).

**صفات گیاهی نخود:** نتایج تجزیه واریانس ساده صفات بین سویه‌های مختلف ریزوبیوم شهرستان‌های استان نشان داد که سویه‌ها از لحاظ صفات تعداد و وزن گره در گیاه نخود اختلاف آماری معنی‌داری داشتند (جدول ۵). گیاهچه‌های نخود تلقیح شده با سویه‌های سردشت بیشترین تعداد گره و تکاب کمترین تعداد گره را داشتند. علاوه بر آن سویه‌های ارومیه نیز بالاترین وزن گره و میاندوآب حداقل وزن گره را در نخود داشتند (جدول ۶). به طور کلی به استثنای

فلاونوئید در ریشه‌ها افزایش یافت که ممکن است به عنوان علامتی برای حساسیت بیشتر آلودگی ریزوبیومی و بهبود قابلیت تولید گیاه به کار رود. ستاری و علیا (Sattari and Olia, 1999) با جمع‌آوری سویه‌های باکتری نخود دیم کشور، شش سویه فعال از نظر ایجاد گره فعال را معرفی نمودند.

**صفات گیاهی لویا:** نتایج تجزیه واریانس اثر تلقیح سویه‌های مناطق مختلف استان بر رشد گیاه لویا اختلاف آماری معنی‌داری بین صفات تعداد و وزن گره، وزن اندام هوایی، وزن ریشه و میزان نیتروژن تثبیت شده را نشان داد (جدول ۷). گیاهچه‌های لویای تلقیح شده با سویه‌های باکتری مهاباد از تعداد گره بیشتر و ماکو حداقل تعداد گره را داشتند. گیاهچه‌های تلقیح شده با سویه‌های باکتری ارومیه بیشترین وزن گره

استان قرار گرفته، شاید به دلیل شرایط بافت خاک و خصوصیات رشد باکتری باشد که مشابه سویه‌های باکتری جنوب استان است (شکل ۳).

دانگاریا و همکاران (Dangaria et al., 1994) در ژنوتیپ‌های نخود از لحاظ تعداد و وزن گره تنوع گسترده‌ای را گزارش نمودند. فسنگو و همکاران (Fesenko et al., 1994) در نخود تجمع نیتروژن را در ساقه‌ها نسبت به وزن خشک ساقه معیار مناسبی برای انتخاب توان رقابتی سویه‌ها دانستند. پارمار و داداروال (Parmar and Dadarwal, 1999) گزارش نمودند که با تلقیح سویه‌های باکتری ریزوبیوم به همراه *Bacillus* و *Pseudomonas* در نخود، موجب افزایش وزن گره، طول ریشه، وزن اندام هوایی و میزان تثبیت نیتروژن گردید. ایشان مشاهده کردند که سطحی از موادی شبیه

جدول ۵- تجزیه واریانس صفات گیاهی نخود تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 5. Analysis of variance for chickpea characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from cities of West Azerbaijan province

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات (MS)				
			تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight	وزن اندام های هوایی Total dry matter	وزن ریشه Root weight	نیتروژن تثبیت شده Fixed nitrogen
City	شهرستان	9	8.64**	41.22**	25222.22 <sup>ns</sup>	75740.74 <sup>ns</sup>	487.94 <sup>ns</sup>
Error	خطا	20	2.13	3.24	25333.33	46000.00	453.40
C.V (%)	ضریب تغییرات		5.24	6.7	5.64	11.19	16.24

ns: Not significant

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

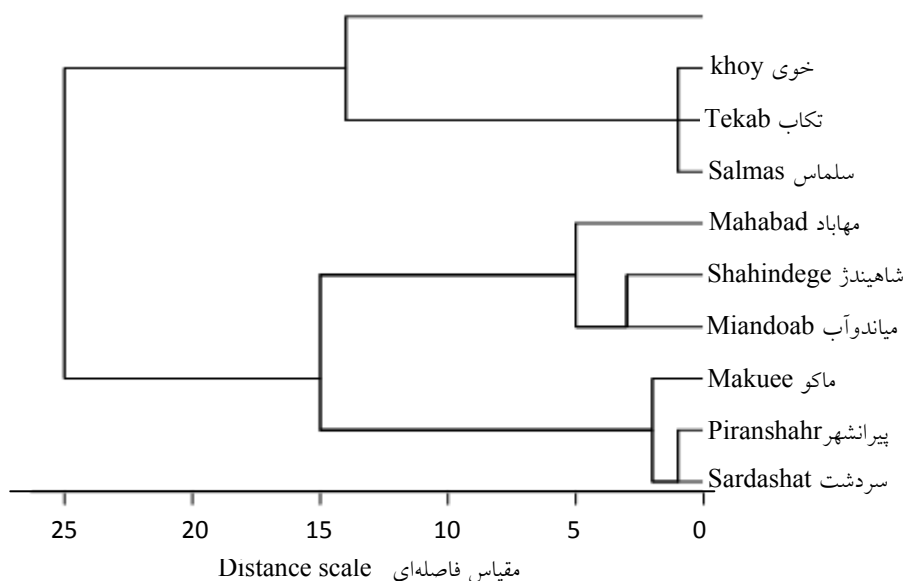
\* and \*\*: significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۶- مقایسه میانگین صفات گیاهی نخود تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 6. Mean comparison of chickpea characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from cities of West Azerbaijan province

City	شهرستان	تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight (mg.plant <sup>-1</sup> )
Urmia	ارومیه	27.5ab	36.1a
Khoy	خوی	27.9ab	28.9b
Makuee	ماکو	26.9abc	24.3cd
Salmas	سلماس	28.6ab	26.9bc
Mahabad	مهاباد	27.9ab	27.8b
Miandoab	میاندوآب	24.4cd	23.2d
Tekab	تکاب	23.8d	24.2cd
Sardasht	سردشت	29.0a	27.3bc
Shahindege	شاهیندژ	27.1abc	30.2b
Piranshar	پیرانشهر	26.1bcd	27.2bc

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت آماری معنی‌داری ندارند. Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan's Multiple Range Test



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای سویه‌های ریزوبیوم همزیست با نخود جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Fig. 3. Cluster analysis of *Rihizobium* strain symbiosis with chickpea collected from West Azerbaijan province

لویبای شهرستان‌های استان را به دو گروه طبقه‌بندی نمود. در گروه اول به استثنای شهرستان‌های تکاب و سردشت، سایر شهرستان‌های این گروه جزء شهرستان‌های شمال استان می‌باشند. در گروه دوم به استثنای شهرستان ماکو، سایر شهرستان‌ها جزو شهرستان‌های جنوب استان بوده و با گروه‌بندی جغرافیایی مطابقت داشت (شکل ۴). مقایسه گروه‌بندی چهار گیاه مربوط به خانواده بقولات نشان داد که گروه‌بندی سویه‌های باکتری نخود با لویبای یا بقولات دانه‌ای با هم مشابه است به طوری که در هر دو گروه‌بندی شهرستان‌های ارومیه، خوی، تکاب و سلماس در گروه‌بندی نخود با یکدیگر در یک گروه و سایر شهرستان‌ها در هر دو گیاه در گروه دوم قرار گرفتند. تاکوریا و همکاران (Thakuria et al., 2004) در طبقه‌بندی باکتری‌های ریزوسفر برنج در پانزده منطقه ایالت آسام هندوستان، سویه‌ها را با استفاده از

و سردشت حداقل وزن گره را داشتند. وزن اندام هوایی و وزن ریشه در لویبای تلقیح شده با سویه ارومیه بیشترین مقدار بود. گیاهچه‌های لویبای تلقیح شده با سویه‌های باکتری پیرانشهر کمترین وزن اندام هوایی و خوی به همراه پیرانشهر، کمترین وزن خشک ریشه را داشتند. از لحاظ میزان تثبیت نیتروژن، سویه‌های باکتری متعلق به ارومیه از بیشترین میزان تثبیت نیتروژن و گیاهان تلقیح شده با سویه‌های باکتری ماکو از کمترین میزان تثبیت نیتروژن برخوردار بودند. بنابراین به نظر می‌رسد که سویه‌های باکتری مربوط به ارومیه در کشت لویبای نسبت به سویه‌های سایر مناطق ترجیح داده می‌شوند (جدول ۸). اسدی رحمانی و همکاران (Asadi Rahmani et al., 2005) در بررسی اثر سویه‌های باکتری بر عملکرد و خصوصیات کیفی لویبای گزارش نمودند که سویه برتر معرفی شده در شرایط مزرعه‌ای باعث افزایش ۸۷ درصد در عملکرد دانه و افزایش درصد پروتئین دانه گردید. تجزیه خوشه‌ای، سویه‌های باکتری

جدول ۷- تجزیه واریانس صفات گیاهی لویبای تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 7. Analysis of variance for bean characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from West Azerbaijan province

S.O.V	منابع تغییر	میانگین مربعات (MS)					
		درجه آزادی d.f	تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight	وزن اندام‌های هوایی Total dry matter	وزن ریشه Root weight	نیتروژن تثبیت شده Fixed nitrogen
City	شهرستان	9	5.26**	53.98**	326429.63**	29144.07**	328.53**
Error	خطا	20	0.64	7.33	76000.0	9276.66	125.63
C.V (%)	ضریب تغییرات		4.61	5.36	13.02	11.51	14.77

ns: Not significant

ns: غیر معنی‌دار

\* and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

\* و \*\*: به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

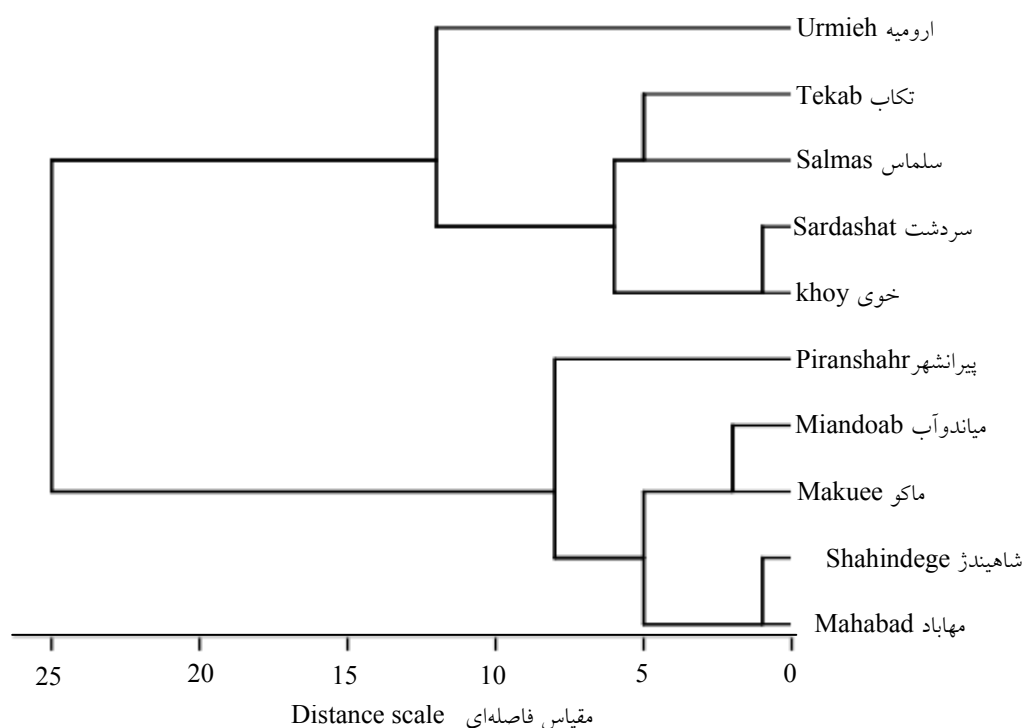
جدول ۸- مقایسه میانگین صفات گیاهی لویبای تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیوم جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی

Table 8. Mean comparison of bean characteristics inoculated with *Rhizobium* strains collected from West Azerbaijan province

City	شهرستان	تعداد گره در بوته No. of nodule	وزن گره Nodule weight (mg.plant <sup>-1</sup> )	وزن کل اندام هوایی Total dry matter (mg.plant <sup>-1</sup> )	وزن ریشه Root weight (mg.plant <sup>-1</sup> )	نیتروژن تثبیت شده Fixed nitrogen (mg.plant <sup>-1</sup> )
Urmia	ارومیه	17.5bc	60.5a	2733a	1007a	89a
Khoy	خوی	16.6cde	51.1bc	2200bc	746c	71abc
Makuee	ماکو	15.5e	47.0cd	2033bcd	810bc	66bc
Salmas	سلماس	18.2b	49.7bcd	2466ab	740c	85ab
Mahabad	مهاباد	20.2a	50.1bcd	1833cd	820bc	78abc
Miandoab	میاندوآب	16.8bcde	52.8b	2000bcd	943ab	73abc
Tekab	تکاب	17.3bcd	51.0bc	2300abc	950ab	90a
Sardasht	سردشت	17.4bc	45.4d	2133bc	777bc	81ab
Shahindege	شاهیندژ	18.2b	51.4bc	1866cd	850abc	66bc
Piranshar	پیرانشهر	15.8de	46.3cd	1600d	727c	59c

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت آماری معنی‌داری ندارند

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level, using Duncan's Multiple Range Test



شکل ۴- تجزیه خوشه‌ای سویه‌های ریزوبیوم همزیست با لوبیا جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی  
 Fig. 4. Cluster analysis of *Rhizobium* strain symbiosis with bean collected from cities of West Azerbaijan province

همبستگی مثبت و معنی‌داری با صفات گره (وزن، قطر و تعداد گره) داشته و این صفات می‌توانند به عنوان یک معیار غیر مستقیم برای میزان تثبیت نیتروژن در نظر گرفته شوند (Pimratch *et al.*, 2008). تعداد و وزن گره‌های ریشه از صفاتی هستند که بسیاری از محققان آنها را دارای قابلیت اعتماد کافی برای ارزیابی کارایی ریزوبیوم‌ها نمی‌دانند. هریچ و دانسو (Herridge and Danso, 1995) عنوان کردند که برخی از سویه‌های باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن با وجود تولید گره‌های بیشتر و با وزن زیادت‌تر، از میزان تثبیت نیتروژن پایینی برخوردارند و این موضوع را به کارایی نسبی پایین گره‌ها نسبت دادند. بنابراین تعداد و وزن گره‌ها معیار مناسبی برای ارزیابی کارایی سویه‌ها نیست و فقط برای تعیین توان گره‌زایی آنها است. در مقابل وزن اندام هوایی معیار مناسب‌تری برای میزان تثبیت نیتروژن به شمار می‌رود.

تجزیه خوشه‌ای به چهار گروه طبقه‌بندی و برای هر گروه سویه برتر را شناسایی نمودند.

**همبستگی بین صفات:** در گیاه لوبیا همبستگی معنی‌داری بین صفات وزن گره با وزن اندام هوایی و وزن خشک ریشه و وزن اندام هوایی با میزان نیتروژن تثبیت شده وجود داشت. در گیاه شبدر وزن گره با وزن اندام هوایی و وزن اندام هوایی با میزان نیتروژن تثبیت شده همبستگی معنی‌داری نشان داد. در نخود میزان نیتروژن تثبیت شده فقط با وزن اندام هوایی همبستگی مثبت و معنی‌دار داشت. در یونجه به استثنای وزن گره با وزن اندام هوایی، کلیه صفات همبستگی مثبت معنی‌داری با هم داشتند. ارزیابی ضرایب همبستگی بین صفات در چهار گیاه تثبیت‌کننده نیتروژن مشخص نمود که میزان نیتروژن تثبیت شده با وزن اندام هوایی همبستگی مثبت و معنی‌داری با یکدیگر داشتند (جدول ۹). در بادام زمینی اثبات شده است که میزان تثبیت نیتروژن

جدول ۹- ضرایب همبستگی ساده بین صفات مرتبط با تثبیت نیتروژن در گیاهان لوبیا، شبدر، نخود و یونجه

Table 9. Simple correlation coefficients for plant characteristics related to nitrogen fixation in bean, clover, chickpea and alfalfa

Plant characteristics	صفات گیاهی	وزن گره Nodule weight (mg.plant <sup>-1</sup> )				وزن اندام هوایی Total dry matter (mg.plant <sup>-1</sup> )				وزن ریشه Root weight (mg.plant <sup>-1</sup> )			
		لوبیا Bean	شبدر Clover	نخود Chickpea	یونجه Alfalfa	لوبیا Bean	شبدر Clover	نخود Chickpea	یونجه Alfalfa	لوبیا Bean	شبدر Clover	نخود Chickpea	یونجه Alfalfa
No. of nodule	تعداد گره در بوته	0.35	-0.32	0.53	0.87**								
Total dry matter	وزن کل اندام هوایی	0.65*	0.76**	0.26	0.55								
Root weight	وزن ریشه	0.76**	0.02	0.55	0.76**	0.45	-0.03	0.15	0.79**				
Fixed nitrogen	نیتروژن تثبیت شده	0.48	0.49	0.08	0.82**	0.81**	0.88**	0.64*	0.88**	0.50	0.16	0.50	0.84**

\* and \*\*: significant at 5% and 1% probability levels, respectively

\* و \*\*: به ترتیب معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

### نتیجه‌گیری

در این آزمایش، صفت میزان تثبیت نیتروژن با وزن اندام هوایی همبستگی مثبت و معنی‌داری داشته و می‌تواند به عنوان یک معیار غیر مستقیم برای میزان تثبیت نیتروژن به کار برده شود. بهره‌برداری از سویه‌های باکتری مناطق مختلف استان برای هر گیاه مستلزم شناسایی آنها بر اساس روش‌های استاندارد میکروبی شناسی است تا سویه‌های برتر برای هر گیاه به درستی شناسایی شده و به دنبال آن نیازهای اکولوژیکی آنها جهت به حداکثر رساندن توانایی تثبیت نیتروژن آنها تعیین شود.

سویه‌های ریزوبیومی برتر هر کدام از گیاهان شبدر، یونجه، نخود و لویا انتخاب شده از شهرستان‌های استان آذربایجان غربی در شرایط کنترل شده افزایش رشد قابل ملاحظه‌ای در گیاهان میزبان داشتند، بنابراین به نظر می‌رسد که سویه‌های مذکور می‌توانند در شرایط مزرعه‌ای نیز جهت افزایش عملکرد این گیاهان مورد استفاده قرار گیرند. افزایش کارایی تثبیت نیتروژن می‌تواند از طریق انتخاب بهترین ژنوتیپ‌های گیاهی میزبان و همچنین انتخاب بهترین ترکیب‌های ژنوتیپ میزبان و باکتری بدست آید. در چهار گیاه مورد مطالعه

### References

### منابع مورد استفاده

- Asadi Rahmani, H., M. Afshari, K. Khavazi, F. Nourgholipour and A. Otad. 2005.** Effects of common bean nodulating *Rhizobia* native to Iranian soils on the yield and quality of bean. *Soil Water Sci.* 19: 215-223. (In Persian with English abstract).
- Bremner, J. M. and R. L. Mulvaney. 1982.** Nitrogen-total, in: *Methods of Soil Analysis* (Ed. Page, A. L.), Part 2, Agronomy Monograph, 9, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, Pp. 595-622.
- Caetano-anoles, C. G., D. K. Crist-Estes and W. D. Bauer. 1988.** Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavor luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* 170: 3164-3169.
- Dangaria, C. J., R. Parameshwarappa, P. M. Salimath and B. S. Annigeri. 1994.** Genetic divergence for nodulating characters in chickpea. *Legume Res.* 17: 32-36.
- Dilworth, M. J., J. G. Howieson, W. G. Reeve, R. T. Tiwari and A. R. Glenn. 2001.** Acid tolerance in legume root nodule bacteria and selecting for it. *Aust. J. Exp. Agric.* 41: 453-446.
- Ebadi, A., H. Heidari Sharif Abad, Z. Tahmasebi and A. Hashemi Dezfuli. 1999.** Influence of water stress on the nitrogen fixation of some lines of *Medicago sativa* L. *Pajouhesh va Sazandegi*, 45: 28-31. (In Persian with English abstract).
- Fajri, A., A. Samadi and U. Gousta. 2005.** Nitrogen fixation potential of imported and native *Rhizobial* strains in symbiosis with clover. *Tropic. Agric.* 82: 129-133.
- Fesenko, A. N., N. A. Provorov, I. F. Orlova, V. P. Orlov and B. V. Simarov. 1995.** Selection of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viceae* strains for inoculation of *Pisum sativum* L. cultivars: analysis of symbiotic efficiency and nodulation competitiveness. *Plant Soil.* 172: 189-198.
- Fujita, K., K. G. Ofosu-Budu and S. Ogata. 1994.** Biological nitrogen fixation in mixed legume-cereal cropping system. *Plant Soil.* 141: 155-175.

- Galeshi, S. 2001.** Effect of salinity stress on nitrogen fixation efficiency in alfalfa. *J. Sci. Tech. Agric.* 15: 3-12. (In Persian with English abstract).
- Hajebi, A. H. and H. Heidari Sharifabad. 2005.** Investigation of effect of drought on growth and nodulation of three species of clover. *Pajouhesh va Sazandegi*, 66: 13-22. (In Persian with English abstract).
- Heidari Sharifabad, H. and A. R. Iranmanesh. 1996.** The effect of three *Rhizobium meliloti* strains on nodulation, dry matter production and nitrogen fixation of six *Medicago sativa* L. cultivars. *Pajouhesh va Sazandegi*, 30: 75-77. (In Persian with English abstract).
- Herridge, D. F. and S. K. A. Danso. 1995.** Enhancing crop legume N<sub>2</sub> fixation through selection and breeding. *Plant Soil*. 174: 51-82.
- Matiru, V. N. and F. D. Dakora. 2004.** Potential use of *Rhizobial* bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. *African J. Biotech.* 3: 1-7.
- O'Hara, G., R. Yates and J. Howieson. 2002.** Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculants performance and increase legume productivity in stressful environments. *ACIAR Proceedings*. 109: 75-80.
- Parmar N. and K. R. Dadarwal. 1999.** Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid like compounds by Rhizobacteria. *J. Appl. Microbiol.* 86: 36-44.
- Pimratch, S., S. Jogloy, N. Vorasoot and B. Toomsan. 2008.** Effect of drought stress on traits related to N<sub>2</sub> fixation in eleven peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes differing in degrees of resistance to drought. *Asian J. Plant Sci.* 8: 1-9.
- Pimratch, S., S. Jogloy, N. Vorasoot, B. Toomsan, A. Patanothai and C. C. Holbrook. 2008.** Relationship between biomass production and nitrogen fixation under drought stress conditions in peanut genotypes with different levels of drought resistance. *J. Agron. Crop Sci.* 194: 15-25.
- Saikia, S. P. and V. Jain. 2007.** Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma. *Curr. Sci.* 92: 317-322.
- Sattari, M. and P. Olia. 1999.** Isolation and identification of native strains of *Rhizobium* coexistent with pea in Maragheh region. *Pajouhesh va Sazandegi*, 45: 35-37. (In Persian with English abstract).
- Smith, G. 1989.** Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 171: 4045-4062.
- Somasegaran, P. and H. J. Hoben. 1994.** Handbook for *Rhizobia*, Methods in *Legume-Rhizobium* Technology, New York, USA. Spring-Verlag. Pp. 198.
- Thakuria, D., N. C. Talukdar, C. Goswami, S. Hazarika, R. C. Boro and M. R. Khan. 2004.** Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Curr. Sci.* 86: 978-985.

## Evaluation of potential of biological nitrogen fixation of Rhizobium strains in legume crops in West Azerbaijan province

Eivazi, A. R.<sup>1</sup>, A. Fajri<sup>2</sup>, M. Rezazad<sup>3</sup>, M. Soleimapour<sup>4</sup> and M. Rezai<sup>5</sup>

### ABSTRACT

Eivazi, A. R., A. Fajri, M. Rezazad, M. Soleimapour and M. Rezai. 2012. Evaluation of potential of biological nitrogen fixation of Rhizobium strains in legume crops in West Azerbaijan province. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 13 (4): 627-641. (In Persian).

Biological nitrogen fixation is important for supplement of nitrogen needs of host plant. Growth chamber experiments were conducted to test the nitrogen fixing abilities of isolate of Rhizobium strains collected from 10 cities (Urmieh, Khoy, Makuee, Salmas, Mahabad, Miandoab, Tekab, Sardasht, Shahindege and Piranshar) of West Azerbaijan province in symbiotic relation with alfalfa, chickpea, clover and bean cultivars. Seedlings of test plants were inoculated with proprietary Rhizobium strains. Inoculated and control seedlings of each plants were planted in pots containing sterilized perlite. The experiment was conducted using completely randomized design with three replications. The pots were irrigated with free nitrogen Hoagland solution. Results showed that the highest number of nodule and the lowest nodule dry weight was for clover and bean, respectively.. Symbiotic of Rhizobium strain of Miandoab for alfalfa, Mahabad for clover and Urmieh for bean had the highest values for most of traits. Nitrogen fixation correlated with total dry matter, and it seems this trait may be used as an indirect criterion of nitrogen fixation. This findings imply the possibility of replacing biologically fixed nitrogen with chemical fertilizers.

**Key words:** Alfalfa, Bean, Biological nitrogen fixation, Chickpea, Clover and Symbiosis.

---

Received: June, 2010

Accepted: April, 2011

1- Assistant Prof., Agricultural and Natural Resources Research Center of West Azerbaijan Province, Urmieh, Iran (Corresponding author) (Email: alirezaeivazi@yahoo.com)

2- Associate Prof., Faculty of Agriculture, Urmieh University, Urmieh, Iran

3- Assistant Prof., Faculty of Agriculture, Urmieh University, Urmieh, Iran

4- Assistant Prof., Technical Faculty of Engineering, Urmieh University, Urmieh, Iran

5- Faculty member, Agricultural and Natural Resources Research Center of West Azerbaijan Province, Urmieh, Iran