نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد ۲۹ شماره ۲ / تابستان ۱۳۹۸

تاثیر کود نیتروژن بر همزیستی توام باکتری *ریزوبیوم* و قارچ *رایزوفاگوس ایرگولاریس* در گیاه شبدر (*Trifolium repens* L)

وحیده شعبانی زنوزق[۱*]، ناصر علی‌اصغرزاد[۲]، جعفر مجیدی[۳]، بهزاد برادران[۴]، لیلی عاقبتی مالکی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۱۸

۱-دانشجوی دکتری علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲-استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳-استاد گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
٤- مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
٥-استادیار مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: vahideh_shabani@yahoo.com

چکیده

گیاهان لگوم همزیستی دو جانبه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های ریزوبیوم دارند. قارچ‌های میکوریز همزیست اجباری ریشه هستند که نقش مهمی در واکنش‌های اکولوژیکی دارند و باکتری‌های ریزوبیوم در همزیستی با لگوم، گره تشکیل می‌دهند که محل تثبیت نیتروژن است. در این راستا آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه‌ای طراحی شد. چهار سطح نیتروژن (۰، ۲، ٦ و ۱۰ میلی‌مولار به فرم نیترات) بوسیله محلول غذایی نیومن و رومهلد در گلدان‌های ۱/۵ کیلوگرمی اعمال شد و روزانه با این محلول غذایی آبیاری شدند. بذرهای شبدر استریل شده در گلدان کاشته و با قارچ *Rhizophagus irregularis* و باکتری *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* تلقیح شدند. گیاهان شاهد بدون تلقیح با باکتری یا قارچ، کشت شدند. گیاهان شبدر پس از ۱۲ هفته برداشت شده و وزن خشک اندام هوایی و ریشه، درصد کلنیزاسیون ریشه، تعداد و وزن گره، مقدار عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم در بخش هوایی و ریشه تعیین گردید. بیشترین مقدار P ریشه در تیمارهای میکوریزی و در سطح صفر و ۲ میلی‌مولار نیتروژن مشاهده شد. در تمامی سطوح نیتروژن حضور قارچ سبب افزایش مقدار P ریشه شد. در تمامی سطوح نیتروژن، حضور باکتری باعث افزایش معنی‌داری در مقدار نیتروژن بخش هوایی شد. بیشترین مقدار پتاسیم بخش هوایی (٦٤/٤ میلی‌گرم به ازای گلدان) در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن و تیمار غیرمیکوریزی و بیشترین مقدار پتاسیم ریشه (۱۹/۰۲ میلی‌گرم به ازای گلدان) در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن و در حضور قارچ میکوریز مشاهده شد. بیشترین وزن خشک اندام هوایی (٤/٤٦ گرم به ازای گلدان) در تیمار میکوریزی و در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن مشاهده شد. بیشترین درصد کلنیزاسیون ریشه در حضور باکتری و قارچ (٦٥/٥٠ درصد) بود. با افزایش سطوح نیتروژن به ٦ میلی‌مولار، درصد کلنیزاسیون ریشه افزایش یافت، به طوری که بیشترین درصد کلنیزاسیون (٣٤/٠١ ٪) در این تیمار مشاهده شد. بیشترین افزایش در تعداد و وزن تر گره زمانی بود که باکتری و قارچ به طور همزمان در گیاه حضور داشتند و در حضور قارچ میکوریز تعداد و وزن تر گره به ترتیب ٢٦/٤٤ و ۲۰/۹۸ درصد افزایش یافت.

واژه های کلیدی: ریزوبیوم، شبدر سفید، گره ریشه، میکوریز آربوسکولار، نیتروژن

The Effects of Nitrogen Fertilizer Application on Co-Symbiosis of *Rhizobium* and *Rhizophagus Irregularis* in Clover (*Trifolium repens* L)

Vahideh Shaabani Zenoozagh[1*], Nasser Aliasgharzad[2], Jaffar Majidi[3], Behzad Baradaran[4], Leili Aghebati-Maleki[5]

Received: September 23, 2018 Accepted: December 9, 2018
1- PhD. Student, Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, Uuniversity of Tabriz, Tabriz, Iran.
2-Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3-Prof., Dept. of Immunology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
4- Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
5-Assist. Prof., Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Corresponding Author Email: Vahideh_shabani@yahoo.com

Abstract

Legumes have dual symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and rhizobia. AMF are obligate biotrophs, known to play an important role in ecological processes. Legumes root forms nodules in symbiosis with rhizobia, which can fix atmospheric nitrogen. A factorial complete randomized block design with three replications was carried out under greenhouse conditions. Four levels of nitrogen (0, 2, 6 and 10 mM as nitrate), in Newman and Romheld nutrient solution were applied to the pots containing 1.5 kg sterile sand. Surface sterilized seeds of clover plants (*Trifolium repens* L.) were sown in pots and inoculated with arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus irregularis*) and/or *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli*. The control plants were left un-inoculated. The pots were daily irrigated with nutrient solution possessing the nitrogen levels. Clover plants were harvested after 12 weeks of growth and Shoot and root dry weights, root mycorrhizal colonization, nodule weights and numbers, nitrogen, phosphorus and potassium contents in shoot and root were determined. The highest amount of phosphorus was observed in mycorrhizal treatment at 0 and 2 mM nitrogen levels. At all levels of nitrogen, the presence of fungi increased the amount of root phosphorus. At all levels of nitrogen, the presence of bacterium significantly increased the amount of shoot nitrogen. The highest amount of shoot potassium (64.4 $mg.pot^{-1}$) was recorded at 2 mM nitrogen and non-mycorrhizal root and the highest amount of root K (19.02 $mg.pot^{-1}$) was seen at 2 mM nitrogen and in the presence of mycorrhizal fungus. The highest amount of shoot dry weight (4.46 $g.pot^{-1}$) was recorded in the mycorrhizal plants treated with 2mM nitrogen. The rhizobial inoculation had pronounced effects on root mycorrhizal colonization. By increasing nitrogen level up to 6 mM, the root colonization increased and the highest root colonization (34.1%) was achieved in this treatment. The highest increase in number and fresh weight of nodules were obtained in co-inoculated plants. In the presence of mycorrhizal fungus, the number and fresh weight of nodules increased by 26.44 and 20.98%, respectively.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizae, Nitrogen, *Rhizobium*, Root Nodule, White Clover

مقدمه

ریشه گیاهان در معرض طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها قرار دارند و اثرات متقابل مختلفی بین آنها ایجاد می‌شود. همزیستی یک پدیده بیولوژیک در ارتباط با تغییرات دینامیک در ژنوم، متابولیسم و شبکه سیگنالی می‌باشد. در اثرات متقابل میکروب-گیاه، دو سیستم همزیستی برای سالیان متوالی مورد مطالعه قرار گرفته است یکی از این‌ها، همزیستی AM و دیگری همزیستی لگوم-*ریزوبیوم* می‌باشد (آنتونز و همکاران ۲۰۰۶، کلارک و زتو۲۰۰۰). همزیستی AM احتمالا گسترده‌ترین اثر متقابل بین گیاهان و میکروب‌ها در زمینه فیلوژنی و اکولوژی می‌باشد. به نظر می‌رسد بیش از ۸۰ درصد از همه گیاهان کره زمین دارای همزیستی با قارچ‌های میکوریز باشند که متعلق به گلومرومایکوتاها هستند (پارینسیک ۲۰۰۸). این جانداران میکروسکوپی به وجود آورنده گسترده‌ترین نوع رابطه همزیستی در طبیعت می‌باشند و به چندین گروه تقسیم می شوند (علی‌اصغرزاده ۲۰۱۰) و از جمله مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های تامین کننده فسفر مورد نیاز گیاه می‌باشند. از مهم‌ترین مشخصات قارچ‌های AM اجباری بودن همزیستی، تشکیل آربوسکول در ریشه گیاه، داشتن اسپورهای بزرگ چند هسته‌ای با دیواره چندلایه‌ای و هیف‌های بدون دیواره عرضی (بجز در هیف‌های مسن یا در محل اتصال هیف به اسپور) می‌باشد. قارچ همزیست در داخل ریشه گیاهان بدون ایجاد هیچ‌گونه علائم بیماری، رشد و گسترش می‌یابد. انتقال مواد بین سلول‌های کورتکس ریشه گیاه کلنیزه شده با قارچ و آربوسکول‌های قارچ، مهم‌ترین مشخصه این نوع همزیستی می‌باشد. (اسمیت و رد ۱۹۹۷).

از سوی دیگر همزیستی لگوم-*ریزوبیوم* در ارتباط با تغییرات مورفولوژیکی در ریشه بوده و به وسیله ارتباط بین گیاهان و باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن شکل می‌گیرد (کاواگوجی و مینامیساوا ۲۰۱۰). مهم‌ترین شرط ایجاد همزیستی موثر، وجود جدایه باکتری کاملا کارآمد و اختصاصی برای گیاه میزبان است و بایستی از مراحل ابتدایی رویش به تعداد کافی در اختیار آن قرار گیرد. لگوم‌ها در همزیستی با باکتری‌های *ریزوبیوم*، تشکیل گره می‌دهند که محل تثبیت نیتروژن می‌باشد (شولتز و کوندورسی ۱۹۹۸). در این همزیستی گیاه مواد فتوسنتزی و سایر مواد مغذی را در اختیار اندوسیمبیونت خود قرار می‌دهد و در مقابل نیتروژن تثبیت شده توسط باکتری‌ها را به شکل آمونیوم و اسیدهای آمینه دریافت می‌کند (اودواردی و دی ۱۹۹۷).

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و ریزوبیوم‌ها می‌توانند با گیاهان لگوم روابط زیستی مشترکی برقرار کنند که همزیستی دوجانبه نامیده می‌شود. همزیستی دو جانبه قارچ **AM** و *ریزوبیوم* در گیاه لگوم، برای رشد لگوم‌ها در داخل جوامع گیاهی بسیار حیاتی می‌باشد (وندرهیجن و همکاران ۲۰۰۶). حضور یکی از این همزیست‌ها می‌تواند بر فعالیت دیگری تاثیرگذار باشد و اثرات متقابل هر دو همزیست باکتریایی و قارچی بر گیاه میزبان قابل مشاهده می‌باشد. فواید این همزیستی شامل افزایش رشد و عملکرد، بهبود تغذیه و برقراری تعادل عناصر غذایی در گیاه می‌باشد. به همین دلیل اثرات این همزیستی نیز بیشتر بصورت غیر مستقیم و براساس وضعیت تغذیه‌ای گیاه،مورد مطالعه قرار گرفته است. در عین حال اثرات مستقیم میکروسیمبیونت‌ها بر یکدیگر شامل اثرات سویه‌های ریزوبیومی بر توسعه قارچ‌های میکوریزی و کلونیزاسیون ریشه و همچنین اثرات گونه‌های قارچی بر فعالیت و کارایی سویه‌های ریزوبیومی نیز حائز اهمیت هستند.

به دنبال رشد بی‌رویه جمعیت جهان در سال‌های اخیر، افزایش تولید محصولات کشاورزی اجتناب‌ناپذیر است. یکی از راهکارهای تولید بیشتر محصولات کشاورزی، افزایش عملکرد در واحد سطح از طریق مصرف نهاده‌ها از جمله کودهای شیمیایی و زیستی

می‌باشد. تاثیر منابع مختلف نیتروژن خارجی (مخصوصاً به فرم نیترات) بر روی سیستم همزیستی بطور کامل بررسی شده است (استریتر ۱۹۸۸). به طور واضح نشان داده شده است که نیترات در تمامی مراحل تشکیل همزیستی اختلال ایجاد می‌کند. تاخیر در تشکیل گره و کاهش تعداد گره در حضور نیتروژن می‌تواند به دلیل مهار ۱) تشکیل تارهای کشنده، ۲) اتصال باکتری به ریشه گیاه، ۳) تغییر شکل تار کشنده و ٤) تشکیل طناب آلودگی باشد. همچنین تعداد طناب آلودگی بدون باکتری هم افزایش می‌یابد. مراحل نهایی تشکیل گره نظیر فعالیت نیتروژناز نیز بطور منفی تحت تاثیر نیتروژن قرار می‌گیرد. مطالعات مختلف نشان می‌دهد که نه تنها ژن‌های گیاه میزبان که گره‌سازی را کنترل می‌کنند بوسیله نیتروژن تنظیم می‌شوند بلکه ژن‌های *nodABC* نیز تحت کنترل نیتروژن ($NH4^+$) می‌باشند (دوشا و همکاران ۱۹۸۹). نیتروژن از طریق تاثیر بر باکتری *ریزوبیوم* می‌تواند بر فعالیت قارچ میکوریز در گیاه میزبان نیز تاثیر بگذارد.

یکی از راه‌های مهم در کاهش کاربرد کودهای شیمیایی بخصوص کود نیتروژن توجه به همزیستی‌های گیاهان با میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی و بکارگیری کودهای زیستی است. امروزه توجه از روابط متقابل گیاه-میکروب به سمت روابط متقابل گیاه-میکروب-میکروب معطوف شده است (لکزیان ۲۰۱۰). قارچ میکوریز و باکتری *ریزوبیوم* کارخانجات کود طبیعی هستند که یک منبع اقتصادی و ایمن برای تغذیه گیاهان در مقایسه با کودهای شیمیایی می‌باشند. این همزیستی‌ها می‌توانند تولیدات کشاورزی را افزایش داده و حاصلخیزی خاک را بهبود ببخشند و از این رو به عنوان یک منبع مکمل، تجدید پذیر و دوستدار محیط زیست در تغذیه گیاهی پتانسیل بسیار زیادی دارند. این میکروارگانیسم‌ها با ارائه مواد مغذی ضروری به گیاهان میزبان و سیستم‌های کشاورزی جهان کمک می‌کنند (مارکس ۲۰۰٤). تلاش‌هایی به منظور تشخیص فعالیت‌های میکروبی در جوامع دو یا سه عضوی از میکروارگانیسم‌ها و همینطور به منظور شناسایی مکانیسم این روابط صورت پذیرفته است. چنین روابط تغذیه‌ای دارای اهمیت اکولوژیکی هستند و همچنین در کشاورزی نیز کاربرد مهمی دارند (لکزیان ۲۰۱۰). لذا هدف از این مطالعه بررسی تاثیر قارچ *Rhizophagus irregularis* و باکتری *Rhizobium leguminosarum* بر عملکرد گیاه شبدر سفید تحت تاثیر سطوح مختلف نیتروژن می‌باشد.

مواد رو روش‌ها

تهیه زادمایه باکتری

سویه باکتری *R. leguminosarum bv. trifoli* از ریشه‌های گیاه شبدر جداسازی و خالص‌سازی شد (سوئیفت و بیگنل ۲۰۰۷). گره‌ها پس از ضدعفونی، به لوله آزمایش حاوی یک میلی‌لیتر آب استریل منتقل شده و با میله شیشه‌ای استریل له شدند. یک دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون گره بر روی محیط کشت YEMA[1] حاوی کنگورد در پتری دیش منتقل و با کمک لوپ استریل پخش شد. پتری دیش‌ها در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد و با مشاهده رشد کلنی‌های شیری و لزج، به منظور نگهداری باکتری اسلنت تهیه شد. دو هفته قبل از کشت اصلی، زادمایه باکتری از کشت اسلنت باکتری در محیط کشت مایع YEMB[2] مایه زنی شده و در شیکر انکوباتور افقی در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد منتقل و تا حصول جمعیت باکتری 10^9 cfu/ml تکثیر شد.

تهیه زادمایه قارچ‌های AM

قارچ *Rhizophagus irregularis* از دپارتمان بیولوژی دانشگاه لوند سوئد اخذ گردید. برای تهیه زادمایه قارچی، تحت شرایط استریل، زادمایه قارچی داخل گلدان‌های ۲ کیلوئی حاوی بستر ورمیکولایت و

[1]- Yeast-extract-Mannitol-Agar

[2]-Yeast-extract-Mannitol Broth

کوکوپیت (نسبت اختلاط حجمی ۱:۱) استریل اضافه شد و با گیاه ذرت و در شرایط گلخانه به مدت چهار ماه نگه‌داری شدند. در پایان این دوره، قسمت هوایی گیاه ذرت از سطح خاک قطع شده و محتویات داخل گلدان، شامل هیف‌ها، اسپور و ریشه‌های میکوریزی به عنوان زادمایه در آزمایش اصلی استفاده شد. درصد کلنیزاسیون قارچی ریشه‌ها در زادمایه‌ها تعیین شدند (علی‌اصغرزاد و همکاران ۲۰۰۱).

کشت گلدانی

جهت تهیه بستر کشت گلدانی از شن درشت استریل عبور یافته از الک دو میلیمتری، عاری از گلومالین و استفاده شد. برای این منظور ابتدا شستشو با اسیدکلریدریک ۳ نرمال و سپس استخراج با بافر سیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار (**pH** = ۸، اتوکلاو به مدت یک ساعت در دمای **°C** ۱۲۱ و فشار ۱/۱ اتمسفر) انجام گرفت. از بذرهای گیاه شبدر سفید (*Trifolium repens* L.)، تهیه شده از موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، به عنوان گیاه میزبان قارچ *R. irregularis* استفاده شد. به منظور حذف آلودگی‌های سطحی بذرها بعد از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل و غوطه‌ورسازی در اتانول ۷۰ درصد (حجمی/حجمی) به مدت ۳۰ ثانیه، به داخل محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصدانتقال یافتند و بعد از ده دقیقه حدود ده بار با آب مقطر استریل کاملاً شستشو شدند. ۳۰ عدد بذر بعد از جوانه‌زنی، در گلدان کشت گردید و ۱۰ گرم زادمایه قارچ *R. irregularis* به صورت لایه نازک در یک سانتی‌متری زیر بذرها پخش شد. جهت یکسان سازی تیمارها، ۱۰ گرم از بستر کشت استریل فاقد قارچ در شاهد اضافه شد. بعد از جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه‌ها، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده بوسیله سرنگ استریل در پای ریشه تزریق گردید (توسلی و همکاران ۲۰۱۱). در تیمارهای بدون باکتری، از محیط کشت مایع استریل بدون باکتری بوسیله سرنگ به پای ریشه‌ها تزریق شد. گیاهان به مدت ۳ ماه ، یک روز در میان با محلول غذایی (نیومن و رومهلد ۱۹۹۷) حاوی چهار سطح نیتروژن (۰, ۲, ٦ و ۱۰ میلی‌مولار) (حاجی‌بلند و همکاران ۲۰۱۵) آبیاری و در شرایط گلخانه با نور طبیعی و میانگین دمای روزانه ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از سپری شدن دوره رشد سه ماهه، بخش هوایی گیاهان برداشت شد. پس از شستشوی ریشه با آب و جداسازی دانه‌های شن، گره‌های ریشه‌ای گیاهان جدا شده و شمارش گردید و سپس وزن تر گره با استفاده از ترازوی حساس (±۰/۰۰۰۱) تعیین گردید. جهت تعیین درصد کلنیزاسیون، رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته کورمانیک مک‌گراو (۱۹۸۲) انجام شد. جهت تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها از روش تقاطع خطوط شبکه (GIM) استفاده شد (نوریف و همکاران ۱۹۹۲). غلظت فسفر اندام هوایی و ریشه به روش نیترو وانادو مولیبدات (کاتنیه ۱۹۸۰) با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) و غلظت پتاسیم اندام هوایی و ریشه، با دستگاه فلیم فتومتر (Corning, Flame Photometer 410) اندازه‌گیری شدند. غلظت نیتروژن بخش هوایی و ریشه به روش کجلدال تعیین شد (راول ۱۹۹٤). این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل در پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد استفاده عبارتند بودند از: چهار سطح نیتروژن (۰، ۲, ٦ و ۱۰ میلی‌مولار به فرم نیترات)، دو سطح قارچ *R. irregularis* و شاهد بدون قارچ)، دو سطح باکتری (باکتری *R.trifoli* و شاهد بدون باکتری). آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس (**ANOVA**) و مقایسه میانگین داده‌ها و گروه‌بندی آنها با استفاده از نرم‌افزار IBM SPSS 16.0 انجام شد. نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel رسم شد.

نتایج و بحث

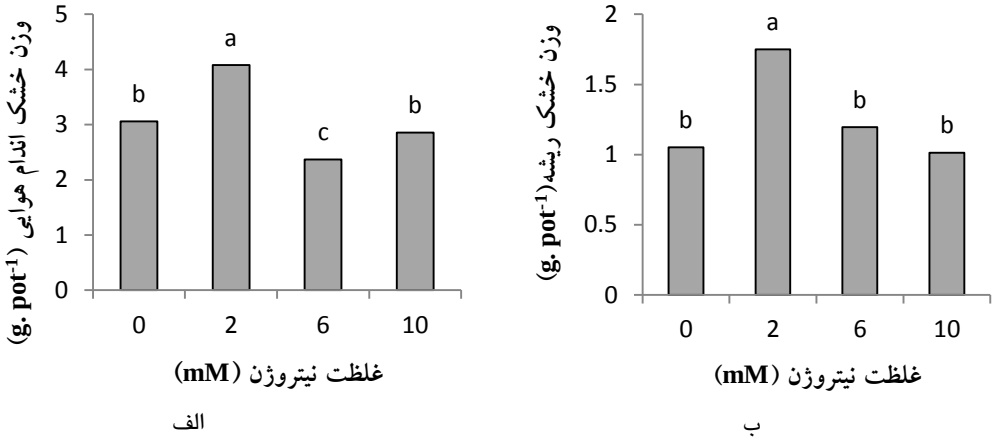
وزن خشک اندام هوایی و ریشه

اثر سطوح مختلف نیتروژن بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه معنی‌دار بود (p<۰/۰۱) (شکل ۱). با افزایش غلظت نیتروژن تا سطح ۲ میلی‌مولار، وزن خشک اندام هوایی و ریشه افزایش و پس از آن کاهش یافت. بیشترین وزن خشک اندام هوایی و ریشه (به ترتیب ٤/۰۸۱ و ۱/۷۵ گرم به ازای گلدان) در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن بود.

اثر متقابل قارچ و نیتروژن و همچنین اثر متقابل باکتری و نیتروژن بر وزن خشک اندام هوایی معنی‌دار شد (p<۰/۰۱) ولی بر وزن خشک ریشه اثر معنی‌داری نداشت (شکل ۲). بیشترین وزن خشک اندام هوایی (٤/٤٦ گرم به ازای گلدان) در تیمار میکوریزی و در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن مشاهده شد. در تمامی سطوح نیتروژن بجز سطح ۲ میلی‌مولار؛ حضور قارچ باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی شد. در تمامی سطوح نیتروژن حضور باکتری سبب افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی شد، بطوریکه بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار دارای باکتری در سطح ۲ میلی‌مولار و به مقدار ٤/٤٩ گرم به ازای گلدان بود. با افزایش سطوح نیتروژن از صفر تا ۲ میلی‌مولار وزن خشک اندام هوایی در تیمارهای دارای باکتری و تیمارهای بدون باکتری افزایش یافته ولی پس از آن کاهش یافته است. با توجه به نقش اساسی نیتروژن در ساختار کلروفیل و فرآیند فتوسنتز می‌توان گفت، با افزایش نیتروژن گیاه، فتوسنتز نیز افزایش می‌یابد. بنابراین مقدار نیتروژن قابل دسترس گیاه بر توزیع مواد فتوسنتزی بین اندام‌های رویشی و زایشی موثر بوده و سطوح بالای نیتروژن، توزیع مواد فتوسنتزی در بخش‌های برگ و ساقه افزایش یافته و وزن تر و خشک گیاه افزایش می‌یابد، اما در صورت کمبود نیتروژن، به علت کاهش کلروفیل، اندازه و سطح برگ، فتوسنتز کاهش یافته و وزن تر و خشک کاهش می‌یابد. از طرفی افزایش بیش از حد این عنصر، فرآیندهای فیزیولوژیک گیاه را دچار اختلال کرده و با تاثیر بر غلظت سایر عناصر در گیاه موجب کاهش رشد و میزان محصول می‌شود. ولی در این شرایط همزیستی با قارچ‌های میکوریز دسترسی گیاه به عناصر غذایی را بهبود بخشیده و موجب افزایش وزن خشک نسبت به تیمارهای غیرمیکوریزی می‌شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که تلقیح گیاه شبدر با زادمایه قارچ‌های **AM** موجب افزایش معنی‌دار برخی خصوصیات رویشی می‌شود که مهم‌ترین آن افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه بوده است (زهرا افشاری ۲۰۱۲). این نتایج با یافته‌های علی‌اصغرزاد و همکاران (۲۰۰٤)، اینی بونگ و همکاران (۲۰۰۸)، مهرورز و همکاران (۲۰۰۸) همسو می‌باشد.گیاهان لگوم از بدو شروع رشد تا رسیدن به مرحله تثبیت نیاز به اندکی نیتروژن دارند که مقداری از آن از نیتروژن موجود در بذر تامین می‌شود و بقیه تا تشکیل گره‌زایی باید به نحوی در اختیار گیاه قرار گیرد (شولر ۱۹۹۱). این مقدار کم نیتروژن در اوایل رشد به عنوان شروع کننده عمل می‌کند.

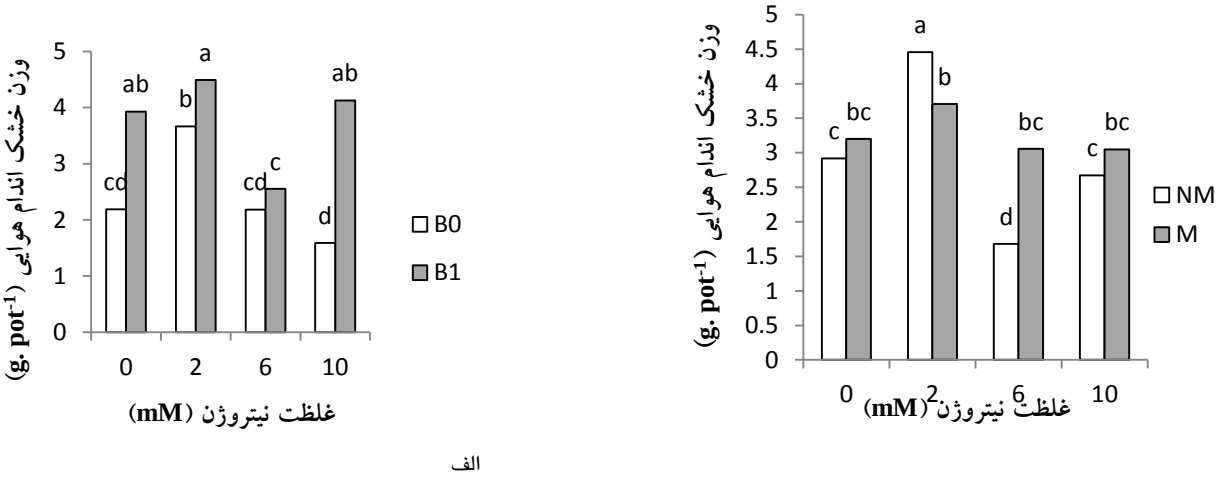
درصد کلنیزاسیون ریشه

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) اثر متقابل سطوح نیتروژن و قارچ بر درصد کلنیزاسیون ریشه معنی‌دار شد (p< ۰/۰۵). بیشترین درصد کلنیزاسیون (٦٨/۰۲ درصد) مربوط به تیمارهای دارای قارچ و غلظت ٦ میلی‌مولار نیتروژن بود (شکل۳). حضور مقداری نیتروژن در خاک و جذب آن توسط گیاه برای شروع فتوسنتز و ایجاد جریان کربن به سمت ریشه‌ها و آزادسازی آن به صورت ترکیبات قندی به محیط اطراف ریشه جهت جذب قارچ‌های آربوسکولار و همزیستی با آنها لازم و ضروری است. بنابراین در سطح بدون نیتروژن با توجه به کمبود نیتروژن در بستر شنی سرعت فتوسنتز و جریان کربن به سمت ریشه‌ها ناچیز بوده و درصد کلنیزاسیون کم است. لیو و همکاران



شکل ۱- اثر اصلی سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) بر وزن خشک: الف) اندام هوایی و ب) ریشه

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.



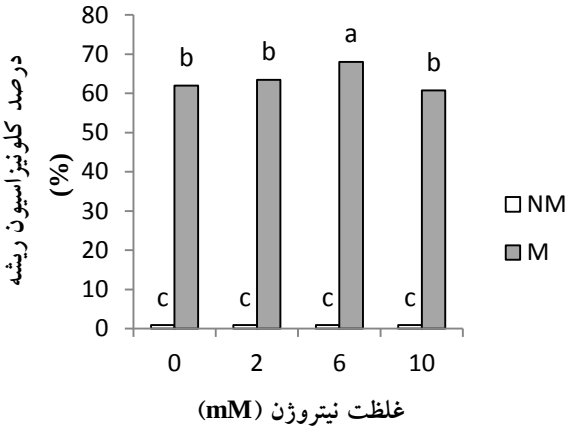
شکل۲- الف) اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) و ب) اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری *ریزوبیوم*) بر وزن خشک اندام هوایی

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

(۲۰۰۰) بیان کردند که سطوح متوسط کود نیتروژن موجب افزایش رشد گیاه و رقیق شدن غلظت فسفر گیاه می‌شود. بنابراین گیاه با تولید کربوهیدارت‌ها، موجب تحریک کلنیزاسیون برای افزایش جذب فسفر و دیگر عناصر می‌شود.

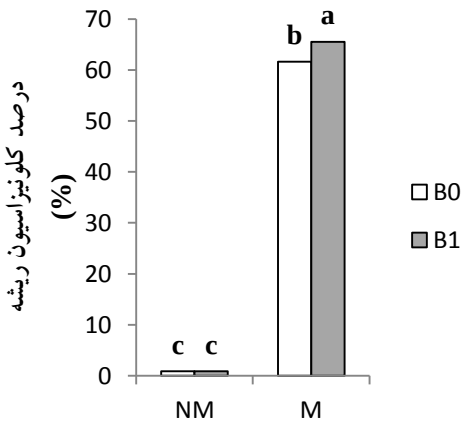
با توجه به تجزیه واریانس داده‌ها، اثرت متقابل باکتری و قارچ بر درصد کلنیزاسیون ریشه ($p<$ ۰/۰۵) معنی‌دار گردید. حضور باکتری باعث افزایش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون ریشه شد. بیشترین درصد کلنیزاسیون در حضور باکتری و قارچ (۶۵/۵۰ درصد)

بود (شکل ٤). در بیشتر مطالعات، افزایش کلنیزاسیون ریشه به وسیله قارچ‌های میکوریزی و باکتری *ریزوبیوم* وقتی به طور همزمان مایه‌زنی شده‌اند گزارش شده است. وقتی گیاهان سویا به طور همزمان با قارچ میکوریز و سویه های موتانت ریزوبیومی **Nod**$^-$ (فاقد توانایی تشکیل گره) و **Nod**$^+$ (دارای توانایی تشکیل گره) مایه‌زنی شدند، گونه ریزوبیومی **Nod**$^+$ به طور مشخصی اثر تحریک کنندگی بر کلنیزاسیون میکوریزی داشت، در حالی که سویه‌های ریزوبیومی **Nod**$^-$ هیچ تاثیری نداشتند. براساس آزمایشات به عمل آمده تنها با فاکتورهای **Nod** که میزان ترشح فلاوونوئیدها از ریشه را افزایش می‌دهند، اثر تحریک کنندگی بر روی کلنیزاسیون قارچ میکوریز ریشه نشان می‌دهند (زای و همکاران ۱۹۹۵).



شکل ۳- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر درصد کلنیزاسیون ریشه

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.



شکل ۴- اثر برهمکنش باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری *ریزوبیوم*) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر درصد کلنیزاسیون ریشه

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

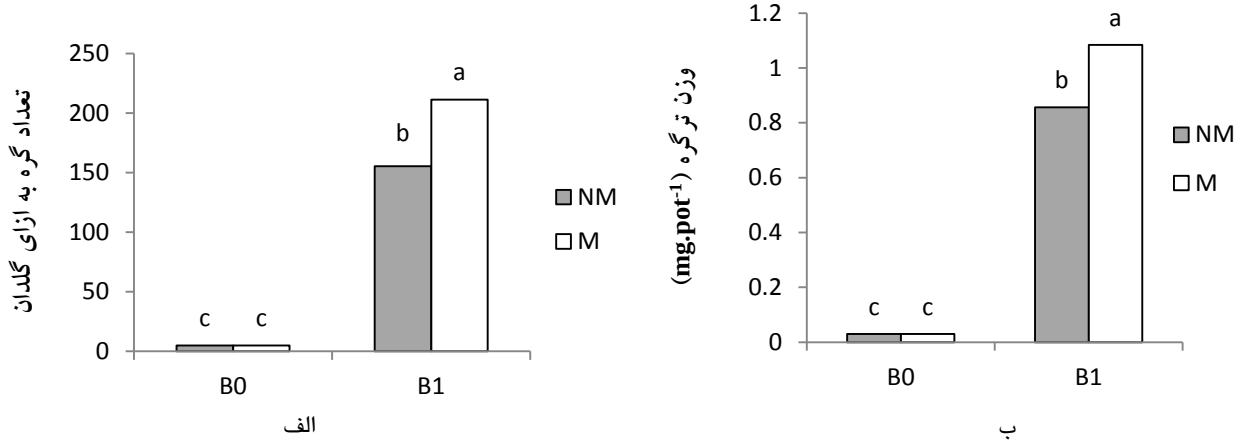
تعداد و وزن گره

تلقیح گیاهان توسط باکتری *ریزوبیوم* سبب افزایش تعداد و وزن گره شد. به علت عدم وجود باکتری در تیمارهای بدون باکتری، تشکیل گره روی ریشه صورت نگرفت. بنابراین تلقیح باکتری *ریزوبیوم* تاثیر معنی‌داری بر روی گره‌زایی شبدر داشت. این نتایج با نتایج ژنگی و همکاران (۱۹۹۲) منطبق می‌باشد. قارچ میکوریز سبب افزایش معنی‌داری در تعداد گره‌ها شد (**p**<۰/۰۱). با این حال بیشترین افزایش در تعداد و وزن تر گره زمانی بود که باکتری و قارچ به طور همزمان در گیاه حضور داشتند (شکل۵). تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که مایه‌زنی همزمان باکتری تثبیت کننده نیتروژن و قارچ میکوریز به گیاه موجب افزایش بیشتر رشد گیاه و جذب عناصر غذایی می‌شود. علی‌اصغرزاده و صالح راستین (۱۹۹٦) نشان داده‌اند که مایه‌زنی همزمان سویا با باکتری *Bradyrhizobium japonicum* و قارچ‌های AM موجب افزایش تعداد گره‌های ریشه‌ای شده است. بهبود گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در گیاهان میکوریزی ممکن است به دلیل تامین فسفر و نیز جذب برخی عناصر غذایی میکرو باشد که به بهبود رشد گیاه منجر شده و اثر غیرمستقیمی بر تثبیت نیتروژن دارد (گیری و موکرجی ۲۰۰٤). آزکون و همکاران (۱۹۹۱) نیز نتایج مشابهی را بیان نمودند که در اثر همزیستی با قارچ‌های میکوریز، تثبیت نیتروژن توسط باکتری همزیست نیز افزایش می‌یابد. وانگ و اویازو (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند بیشترین تعداد گره و بالاترین وزن تر گره در سویا در تیمارهای میکوریزی همراه با باکتری ریزبیوم بدست آمد. هیف‌های قارچ‌های میکوریز برای نفوذ به ریشه گیاهان آنزیم‌های پکتیناز و سلولاز ترشح می‌کنند که باعث سستی دیواره سلول‌های گیاهی می‌شود. این سستی دیواره نفوذ باکتری *ریزوبیوم* را تسهیل می‌کند (آلن ۱۹۹۲).

اثرات متقابل سطوح نیتروژن و باکتری *ریزوبیوم* بر تعداد و وزن گره‌های ریشه‌ای معنی‌دار بود (شکل ٦). با افزایش غلظت نیتروژن محلول غذایی، تعداد و وزن گره‌ها به طور معنی‌داری کاهش یافت. هنگامی که نیتروژن در خاک قابل دسترس باشد (برای مثال آمونیوم یا نیترات) می‌تواند از طریق مختلفی اثر بازدارنده بر همزیستی داشته باشد: الف) در کلنیزاسیون ریشه لگوم‌ها بوسیله *ریزوبیوم‌ها*، ب) بر وزن یا تعداد گره در گیاه و ج) بر فعالیت نیتروژناز باکتروئیدها (استریتر ۱۹۸۸). در مطالعات مختلف، نقش گیاه میزبان در کنترل نیتروژن و تشکیل گره بررسی شده است. فرض بر این است که مهار گره‌سازی در مراحل اولیه القای گره اتفاق می‌فتد و ترکیب منابع نیتروژن ممکن است بیان ژن‌های گره‌سازی اولیه را تحت تاثیر قرار دهد.

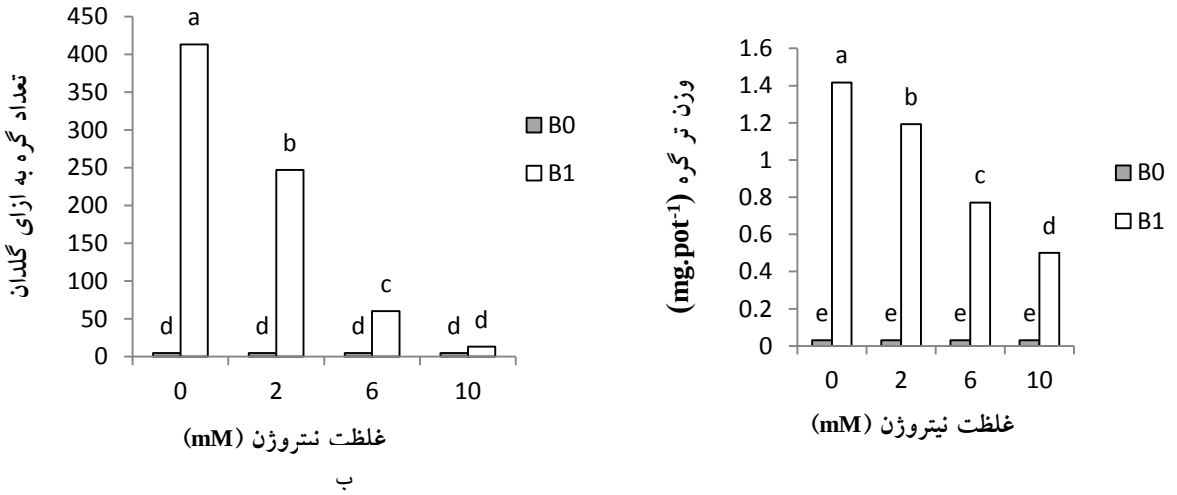
مقدار فسفر بخش هوایی وریشه

مقدار فسفر بخش هوایی و ریشه تحت تاثیر کاربرد نیتروژن، قارچ میکوریز و باکتری *ریزوبیوم* قرار گرفت. با توجه اثرات متقابل قارچ میکوریز و سطوح نیتروژن بر مقدار P بخش هوایی معنی‌دار نبود ولی بر مقدار P ریشه معنی‌دار بود (**p**< ۰/۰۱). بیشترین مقدار P ریشه در تیمارهای میکوریزی و در سطح صفر و ۲ میلی‌مولار نیتروژن مشاهده شد (شکل۷). در تمامی سطوح نیتروژن حضور قارچ سبب افزایش مقدار P ریشه شد. با توجه به مقدار P موجود در گیاهان می‌توان گفت که با افزایش جریان نیتروژن به درون گیاه، در نتیجه افزایش رشد گیاه و اثر رقت فسفر، فسفر به درون گیاه جریان می‌یابد و با توجه به کمبود شدید فسفر در بستر کشت، گیاه برای تامین این عنصر، با تولید سیگنال‌هایی، قارچ‌های AM موجود در بستر را جذب کرده و همزیستی ایجاد می‌کنند. گیاهان میکوریزی به واسطه هیف‌های خارج ریشه، سطح تماس بیشتری با خاک



شکل۵- اثر برهمکنش باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب شاهد بدون باکتری و تلقیح با باکتری *ریزوبیوم*) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر: الف) تعداد گره و ب) وزن گره

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.



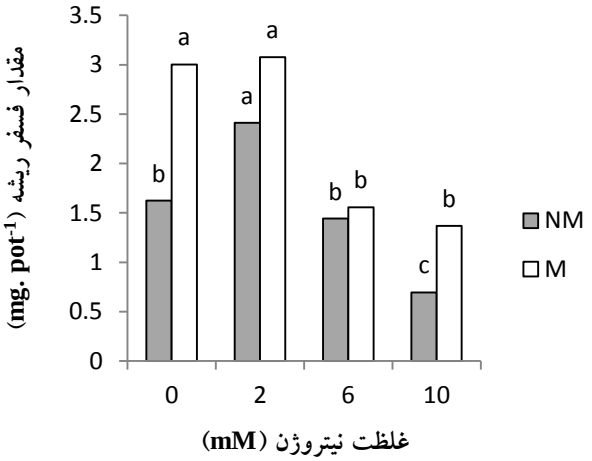
شکل۶- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری ریزوبیوم) برالف) تعداد گره و ب) وزن ترگره

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

دارند و نیز پایین بودن ثابت مایکلیس-منتن (Km) منجر به جذب بهتر فسفر در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی می‌گردد، بدین معنی که در غلظت‌های پایین یونی، سرعت جذب توسط هیف‌های قارچی نسبت به ریشه بیشتر است(پاول و باگراراژ ۱۹۸٤). با افزایش بیش از حد نیتروژن در بستر کشت، رشد گیاه کاهش یافته و در نتیجه جریان P به درون گیاه نیز کم می‌شود. در این سطوح نیز حضور قارچ‌های همزیست با وارد کردن P به درون گیاه تا حد زیادی اثرات زیادی نیتروژن را کاهش داده‌اند. هر چه میزان نیتروژن گیاه

افزایش می‌یابد رشد رویشی بیشتر شده و غلظت P کاهش می‌یابد (امیرآبادی و همکاران ۲۰۱۰).

تلقیح گیاه با قارچ و باکتری به طور همزمان اثر معنی‌داری بر مقدار فسفر بخش هوایی نداشت، اما در ریشه سبب افزایش معنی‌داری در مقدار فسفر شد (شکل ۸). این نتایج نشان می‌دهد که قارچ‌های میکوریز و باکتری *ریزوبیوم* اثرات سینرژیستی بر روی مقدار فسفر ریشه داشته‌اند. اعتقاد بر این است که قارچ میکوریز بخصوص در گیاهانی که با کمبود فسفر رشد می‌کنند، با افزایش حجم در دسترس توسط هیف‌های خارجی، نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی رشد گیاه را افزایش دهند (ژاکوبسن ۱۹۹۵). این ممکن است اثرات سینرژیستی قارچ AM و باکتری *ریزوبیوم* را که در گیاهان مختلف مشاهده شده است توجیه کند. نظر عمومی محققان بر این است که قارچ‌های AM باعث بهبود تغذیه گیاه لگوم شده، که به نوبه خود سبب افزایش رشد و توان تثبیت نیتروژن توسط باکتری *ریزوبیوم* می‌شود (کلوت و بوکر ۱۹۸۳). لیست و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که تلقیح همزمان گیاه با باکتری *ریزوبیوم* و قارچ AM سبب افزایش جذب N و P می‌شود. بنابراین در این مطالعه قارچ میکوریز انتخاب شده با ژنوتیپ *ریزوبیوم* گیاه شبدر سازگار می‌باشد، که ممکن است برای برنامه‌های کشاورزی مفید باشد.



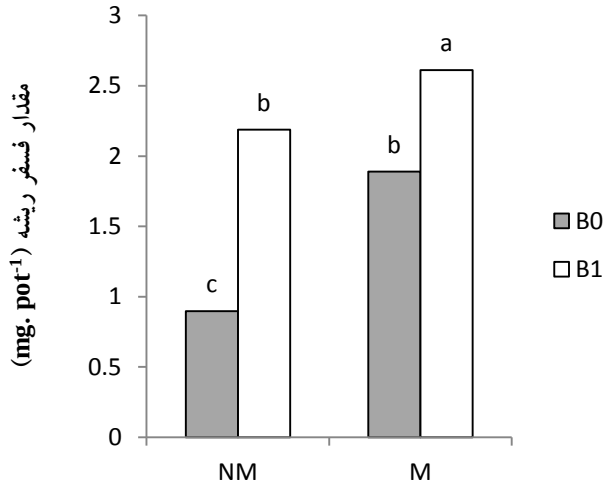
شکل۷- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر مقدار فسفر ریشه

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

مقدار نیتروژن بخش هوایی و ریشه

اثر اصلی قارچ بر مقدار نیتروژن اندام هوایی معنی‌دار (p<۰/۰۱) گردید ولی بر روی مقدار نیتروژن بخش ریشه تاثیر معنی‌داری نداشت. مقدار نیتروژن اندام هوایی گیاهان میکوریزی ۱۲/٦٦ درصد بیشتر از گیاهان غیر میکوریزی بود. اثرات متقابل سطوح نیتروژن و قارچ نیز بر مقدار نیتروژن بخش هوایی معنی‌دار بود (p<۰/۰۱) ولی بر مقدار نیتروژن ریشه معنی‌دار نشد (شکل ۹). افزایش غلظت نیتروژن بستر رشد، و حرکت آن به سمت ریشه گیاه موجب جریان این عنصر به درون گیاه و افزایش رشد آن می‌شود، با افزایش رشد و رقیق شدن غلظت این عنصر، جذب ادامه می‌یابد. استفاده از قارچ‌های آربوسکولار با افزایش سطح جذب ریشه‌ها از طریق هیف‌های خارجی موجب هدایت نیتروژن، فسفر و بسیاری از عناصر دیگر به

درون گیاه و افزایش رشد می‌شوند. قارچ‌های آربوسکولار به دو طریق مستقیم (جذب و انتقال نیتروژن محلول) و غیرمستقیم (ترشح ترکیبات آلی و تبدیل نیتروژن نامحلول خاک به محلول و سپس انتقال آن) موجب افزایش جذب نیتروژن می‌شوند (میلر ۲۰۰۰). همچنین فعالیت گلوتامین سنتتاز که تبدیل کننده آمونیوم به فرم آلی نیتروژن می‌باشد، در ریشه‌های میکوریزی بیشتر از غیر میکوریزی است (لی و همکاران ۲۰۰۵).



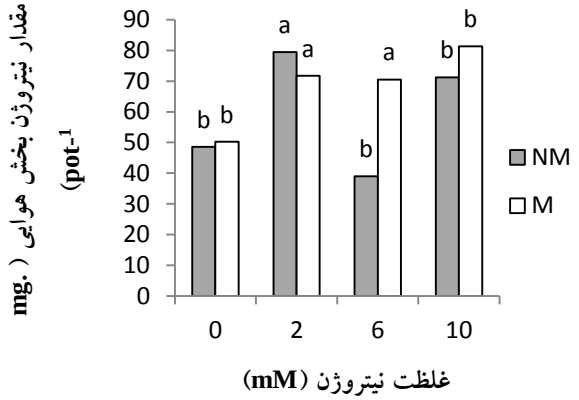
شکل۸- اثر برهمکنش باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب شاهد بدون باکتری و تلقیح با باکتری *ریزوبیوم*) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر مقدار فسفر ریشه

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

اثر متقابل باکتری و سطوح نیتروژن بر روی غلظت نیتروژن بخش هوایی معنی دار بود. در تمامی سطوح نیتروژن، حضور باکتری باعث افزایش معنی‌داری در مقدار نیتروژن بخش هوایی شد (شکل۱۰). با افزایش سطوح نیتروژن از صفر تا ٦ میلی‌مولار، تلقیح گیاه با باکتری *ریزوبیوم*، سبب افزایش معنی‌دار مقدار نیتروژن اندام هوایی نسبت به تیمارهای بدون باکتری شد، ولی با افزایش غلظت نیتروژن از ٦ به ۱۰ میلی‌مولار مقدار نیتروژن بخش هوایی کاهش یافت. مقدار کم نیتروژن به عنوان شروع کننده و افزایش دهنده رشد می‌باشد، در حالی که مقدار زیاد آن به عنوان بازدارنده عمل تثبیت نیتروژن توسط باکتری‌های *ریزوبیوم* می‌شود (هارپر و گیبسون ۱۹۸٤). دلایل و مکانیسم‌های بازدارندگی از مدت‌ها پیش مورد مطالعه قرار گرفته است و بنا به اظهار ویلسون (۱۹٤۰) عدم تشکیل گره روی ریشه در اثر نرسیدن محصولات فتوسنتز به گره‌ها می‌باشد، زیرا کربوهیدرات حاصل بهمراه نیتروژن معدنی قبل از بکار رفتن در تشکیل گره به مصرف رشد گیاه می‌رسد. پیکس و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که مایه‌زنی نخود با سویه‌های مناسب علاوه بر افزایش تثبیت بیولوژیک نیتروژن، به دلیل تولید هورمون رشد (اکسین) و همچنین مواد حل کننده فسفات‌های نامحلول توسط این سویه‌ها، ممکن است با روش‌های دیگری غیر از تثبیت نیز سبب افزایش این محصول شوند.

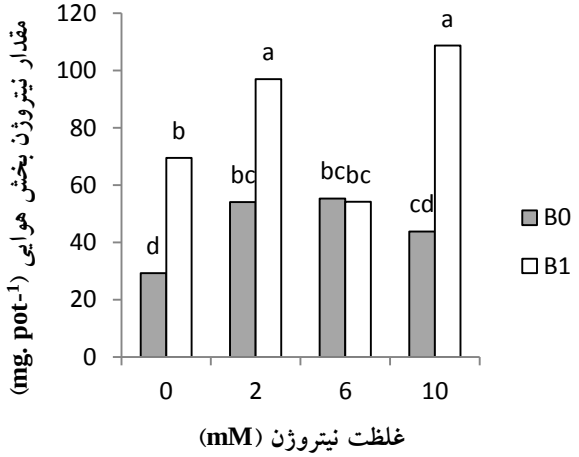
اثر متقابل قارچ و باکتری نیز بر مقدار نیتروژن اندام هوایی و ریشه معنی دار گردید (**p**<۰/۰۱). در عدم حضور باکتری، مایه‌زنی گیاه با قارچ سبب افزایش معنی‌داری مقدار نیتروژن بخش هوایی و ریشه شد، ولی وقتی گیاه با باکتری *ریزوبیوم* تلقیح شد، حضور قارچ سبب کاهش معنی‌دار مقدار نیتروژن بخش هوایی و

ریشـــه گردید (شـــکل ۱۱). فررا-ســـراتو و ویلربوس (۱۹۸۵) گزارش کردنـد کـه مقـدار نیتروژن در گیـاهـان مایه‌زنی شـده با گونه‌های *Glomus* و *ریزوبیوم* افزایش بیشـــتری یـافـت تا آنهائی‌که فقط با *ریزوبیوم* مایه‌زنی شـــده بودنـد. بیشـــترین مقـدار نیتروژن مربوط بـه تیمـارهایی بود که همزمان با قارچ میکوریز و *ریزوبیوم* مایه‌زنی شده بودند.



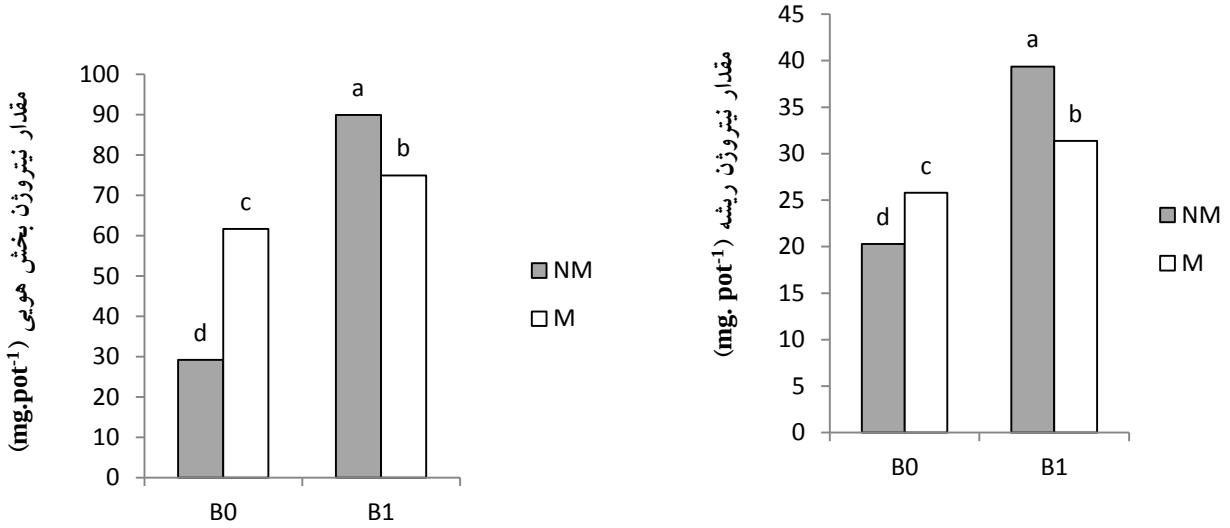
شکل ۹- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب شاهد غیرمیکوریزی و تیمار میکوریزی) بر مقدار نیتروژن بخش هوایی

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.



شکل۱۰- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری *ریزوبیوم*) بر مقدار نیتروژن بخش هوایی

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.



شکل۱۱- اثر برهمکنش باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب شاهد بدون باکتری و تلقیح با باکتری *ریزوبیوم*) و قارچ AM (NM و M به ترتیب غیرمیکوریزی و میکوریزی) بر مقدار نیتروژن: الف) بخش هوایی و ب) ریشه

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

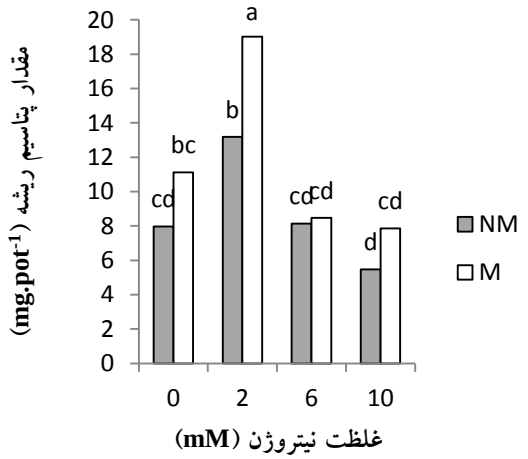
مقدار پتاسیم بخش هوایی و ریشه

با توجه به معنی‌دار بودن اثرات متقابل سطوح نیتروژن و قارچ AM، بر مقدار پتاسیم بخش هوایی (p<۰/۰۱) و ریشه (p<۰/۰۵)، بیشترین مقدار پتاسیم بخش هوایی (٦٤/٤ میلی‌گرم به ازای گلدان) در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن و تیمار غیرمیکوریزی و ریشه (۱۹/۰۲ میلی‌گرم به ازای گلدان) در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن و در حضور قارچ میکوریز مشاهده شد (شکل۱۲). با افزایش نیتروژن از صفر به ۲ میلی‌مولار مقدار پتاسیم بخش هوایی ۳۲/۹٦ درصد و بخش ریشه ٤۰/۷٦ درصد افزایش داشت. ولی در ادامه با افزایش نیتروژن محلول غذایی از ۲ میلی‌مولار به ٦ میلی‌مولار مقدار پتاسیم بخش هوایی و ریشه به طور معنی‌داری کاهش یافت. با توجه به رابطه سینرژیستی بین پتاسیم و نیتروژن، با افزایش جریان نیتروژن به درون گیاه، پتاسیم نیز افزایش یافته است. اما در زیادی نیتروژن، گیاه رشد خود را کاهش داده و از ورود نیتروژن و ایجاد مسمومیت جلوگیری کرده است، در نتیجه پتاسیم نیز وارد گیاه نمی‌شود. اما همزیستی با قارچ‌های AM از طریق فراهم سازی و جذب سایر عناصر نظیر پتاسیم و فسفر، موجب افزایش تحکل گیاه به زیادی نیتروژن می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که هیف‌های خارجی قارچ‌های AM قادر به تامین ۱۰ درصد نیاز پتاسیم گیاه میزبان هستند (مارشنر و دل ۱۹۹٤). افزایش جذب پتاسیم در حضور قارچ‌های AM توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (امیرآبادی و همکاران ۲۰۱۰).

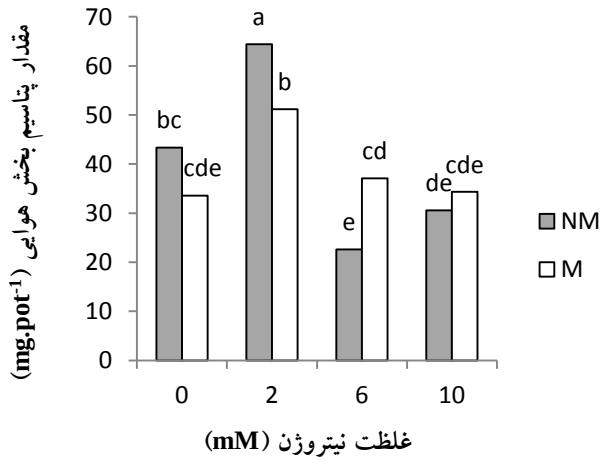
استفاده از کودهای شیمیایی حاوی نیتروژن سبب توسعه بیشتر برگ‌ها و افزایش فتوسنتز می‌گردد که پیامد آن نیاز بیشتر به مواد غذایی مانند فسفر و پتاسیم و کلسیم بوده که به عنوان دلیلی بر افزایش جذب آنها توسط گیاه به آن اشاره شده است (باراکلوگ و لی ۱۹۹۳). به علاوه تغییر و تحول نیتروژن در خاک و جذب آن به صورت نیتروات باعث افزایش بار منفی در سلول‌های ریشه می‌شود و گیاه برای ایجاد تعادل بار اقدام به جذب کاتیون می‌کند. در نتیجه جذب کاتیون‌هایی

مثل پتاسیم و کلسیم افزایش می‌یابد (یولداس و همکاران ۲۰۰۸).

اثرات اصلی قارچ و باکتری بر مقدار پتاسیم بخش هوایی و ریشه معنی‌دار بود (**p<۰/۰۱**) ولی اثرات متقابل آنها تاثیر معنی‌داری بر روی این پارامتر نداشت. حضور باکتری به ترتیب سبب افزایش ۳۵/۸۵ درصدی و ۳۷/۷۸ درصدی در مقدار پتاسیم بخش هوایی و ریشه شد. مشاهده شد که اثر متقابل نیتروژن و باکتری بر مقدار پتاسیم بخش هوایی معنی‌دار است (p<۰/۰۱) ولی اثرات متقابل نیتروژن و باکتری *ریزوبیوم* بر مقدار پتاسیم بخش ریشه معنی‌دار نبود (شکل ۱۳)، به طوریکه بیشتر مقدار پتاسیم در سطح ۲ میلی‌مولار و در حضور باکتری بود . بیس‌واس و همکاران (۲۰۰۰) گزارش دادند که مایه تلقیح‌های ریزوبیومی ممکن است سبب افزایش تعداد ریشه‌های موئین و ریشه‌های جانبی شوند و در نتیجه سبب افزایش جذب مواد مغذی شوند.



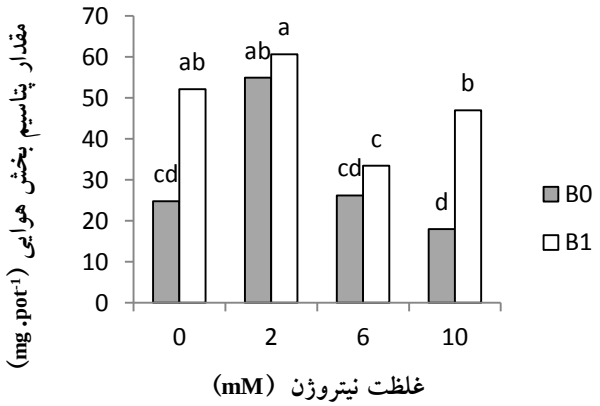
ب



الف

شکل۱۲- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و قارچ AM (NM و M به ترتیب شاهد غیرمیکوریزی و تیمار میکوریزی) بر مقدار پتاسیم: الف) بخش هوایی و ب) ریشه

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.



شکل ۱۳- اثر برهمکنش سطوح نیتروژن (۰، ۲، ۶ و ۱۰ میلی‌مولار) و باکتری *ریزوبیوم* (B0 و B1 به ترتیب بدون باکتری و تلقیح با باکتری *ریزوبیوم*) بر مقدار نیتروژن بخش هوایی

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چنددامنه ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

جدول۱- تجزیه واریانس اثر سطوح نیتروژن،باکتری *ریزوبیوم* و قارچ میکوریز آربوسکولار بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه، درصد کلنیزاسیون، تعداد و وزن گره، مقدار نیتروژن؛ فسفر و پتاسیم بخش هوایی و ریشه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	درصد کلنیزاسیون	تعداد گره	وزن گره	مقدار نیتروژن اندام هوایی	مقدار نیتروژن ریشه
نیتروژن	۳	٦/۲۲۸**	۱/۳۹٤**	۳۰/٤۱۳*	۱۰۰۸٦٦/۱۳۲**	۰/٥۱۰**	۲۳۲۳٥/۸٦۷**	۲/٥٥۱**
باکتری	۱	۲۲/٤٥۲**	۲/٥۱۹**	٤٥/۹٤٤*	٤۰۳۸۸۳/٥۲۱**	۱۱/۲۹٥**	۱٦۲٥٤/۱۹۲**	۰/۰۸٥*
نیتروژن × باکتری	۳	۲/۸۰۳ **	۰/۰۲ ns	٤/٦٤۳ns	۱۰۰۸٦٦/۱۳۲**	۰/٥۱۰**	۲۲۸٦/٤٦۷**	۰/۱۷٦*
قارچ	۱	۱/۲۳۱ *	۰/۳٥٥*	٤۸٤٥۸/۲۰۹**	۹۳۸۰/۰۲۱**	۰/۱٥٥**	۹٤۲/٦۱٥**	۱/۱٥۹**
نیتروژن × قارچ	۳	۲/۲٦۱ **	۰/۰۷٥ ns	۳۰/٤۱۳ *	۱۱٦٤/٤۱۰ ns	۰/۰۳۱**	۸٤۰/۳۱۱**	۰/۲۸۲**
باکتریی × قارچ	۱	٦/۰٤۷ **	۰/۰۸۹ ns	٤٥/۹٤٤*	۹۳۸۰/۰۲۱ **	۰/۱٥٥**	٦۸۳۸/۰۳۹**	۳/۲۲٤**
نیتروژن × باکتری × قارچ	۳	۲/۳۷٤**	۰/۲۷٦ **	٤/٦٤۳ns	۱۱٦٤/٤۱۰ ns	۰/۰۳۱**	۱٤٥۹/۸۱۲**	۰/۳۰۲**
خطا	۳۰	۰/۱٦٤	۰/۰٤۸	۷/۱۳۱	٤۸۹/٤٥۰	۰/۰۰۲	۱۰۱/۲٥۱	۰/۰۱٥
ضریب تغییرات (٪)		۱۳/۱۰	۱۷/٥٥	۸/٤۰	۲٤/۱۲	۹/۹۹	۱٥/۷۲	٥/۱۲

ادامه جدول ۱

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		مقدار فسفر بخش هوایی	مقدار فسفر ریشه	مقدار پتاسیم بخش هوایی	مقدار پتاسیم ریشه
نیتروژن	۳	۲۲/٤۱٤**	۷/۲۱۲**	۱۹۱٤/۱۰۱**	۲۰٥/٥٦۸**
باکتری	۱	٦۰/٦۸۳**	۱۲/۱۷۱**	۳٦۰۰/۳۰۸**	۲٦۸/۹۰۱**
نیتروژن × باکتری	۳	٤/۹٤۸ **	۰/۲٤۸ ns	٤۷۳/۹۷۳**	٥/۸٦٦ns
قارچ	۱	٥۲/٤۳۸ *	٦/۰۱٤*	۱٦/۸٦۳ ns	۱۰۲/۷٥٥**
نیتروژن × قارچ	۳	۳/۲۱٦ **	۰/۸۰٤ **	٤۸۷/٦۸۲ *	۱٥/٥۳۱ns
باکتریی × قارچ	۱	۰/۱۲۹ **	۰/۹٦٦ *	٦/۳٥۸ ns	۲/۷٤۱ns
نیتروژن × باکتری × قارچ	۳	۲/۷۰۲**	۰/۰٥٦ ns	٥۹٥/۸۷٦**	۱٥/۹۹٦ns
خطا	۳۰	۳/۱٥٤	۰/۱٦۲	٥۱/۷۲٥	٦/٥۹۹
ضریب تغییرات (٪)		۳۸/۱٦	۲۱/۲٤	۱۸/۱٤	۲٥/۳۰

ns، * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح ۱٪ و ٥٪ می باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که کاربرد همزمان باکتری *ریزوبیوم* و قارچ *R. irregularis* باعث افزایش صفات وزن خشک اندام هوایی و ریشه، درصد کلونیزاسیون ریشه، تعداد و وزن تر گره، جذب فسفر، پتاسیم و نیتروژن شد. در حالت کلی در تیمارهای بدون محلول غذایی و در حضور میکروارگانیسم‌ها وزن خشک بخش هوایی و ریشه، جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم به ترتیب ۳۹/۷٤، ۸۳/۱۰، ٦٤/۰٥، ۱۷/٦۷ و ۳٦/۹٥ درصد بیش از تیمارهای با محلول غذایی کامل و عدم حضور باکتری *ریزوبیوم* و قارچ **AM** بود. بیشترین مقدار نیتروژن، فسفر، پتاسیم و همچنین وزن خشک اندام هوایی و ریشه در تیمارهای دارای باکتری وقارچ و در سطح ۲ میلی‌مولار نیتروژن

مشاهده شد. بنابراین با توجه به این نتایج می‌توان گفت که با کاهش سطح استفاده از کودهای شیمیایی و استفاده از پتانسیل‌های زیستی می‌توان هم از مصرف کود کاهش داد و هم به حداکثر میزان محصول دست یافت. اثر افزایشی تاثیر همزیستی متقابل قارچ‌های AM و باکتری *ریزوبیوم* بر رشد و عملکرد گیاهان لگوم به خوبی شناخته شده است. قارچ‌های AM می‌توانند به واسطه افزایش جذب آب و مواد مغذی، رشد لگوم‌ها را افزایش دهند. افزایش جذب فسفر می‌تواند به طور مثبتی از طریق تاثیر بر مسیرهای انرژی، بر تثبیت بیولوژیک نیتروژن توسط باکتری *ریزوبیوم* تاثیر گذار باشد (مورتیمر و همکاران ۲۰۰۳). اثرات هورمونی قارچ میکوریز بر رشد ریشه و گره‌ها ممکن است بر روی تثبیت نیتروژن موثر باشد (فرانزینی ۲۰۱۰). نیتروژن و فسفر دو عنصر غذایی بسیار مهم برای رشد و عملکرد گیاهان است (ریچاردسون و همکاران ۲۰۰۹). کودهای شیمیایی، بخصوص در مقادیر بسیار بالا توصیه نمی‌شود؛ از این رو فراهم کردن نیتروژن و فسفر به روش بیولوژیکی توسط باکتری و قارچ AM در کنار کودهای شیمیایی می‌تواند منجر به افزایش محصول شده و از نظر کشاورزی پایدار و محیط زیست بسیار حائز اهمیت است (میرانصاری و مکنزی ۲۰۱۰). در نتیجه می‌توان گفت، در یک همزیستی سه جانبه، اگر ظرفیت تثبیت نیتروژن باکتری *ریزوبیوم* از طریق همزیستی قارچ **AM** افزایش یابد می‌تواند اثرات زیست‌محیطی مثبتی داشته باشد. این مساله در تولید زادمایه‌های میکروبی حائز اهمیت خواهد بود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از سرکار خانم دکتر رقیه حاجی‌بلند،عضو هیات علمی گروه علوم گیاهی دانشکده علوم طبیعی که ما را در بخش معرفی و تعیین غلظت محیط غذایی و انجام این تحقیق یاری نموده و سبب ارتقاء کیفی این پژوهش شدند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع مورد استفاده

Afshari Z. 2013. Effects of nitrogen and phosphorous levels on glomalin produced by Glomerales in symbiosis with corn plant (Single Cross 704). MSc. Thesis University of Tabriz. (In Persian).

Aliasgharzad N. 2011. Soil biology and biochemistry. Publication of Tabriz University. (In Persian).

Aliasgharzadeh N, Saleh Rastin N, Towfighi H and Alizadeh A. 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungal in salin soils of Tabriz plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil, Mycorrhiza, 11:119-122.

Aliasgharzad N and Esfandiari MR. 2004. Effects of dual inoculations of Sinorhizobium melliloti and arbuscular mycorrhizal on growth and salt stressed alfalfa: CIGR International conference, 11-14 October 2004, Beijing, China.

Aliasgharzad N and Saleh Rastin N. 1996. Effect of soybean inoculation with VA mycorrhizal fungi and Bradyrhizobium bacterium on growth and absorption of nutrients in several soils around of Karaj. Journal of Soil and Water, 10: 1-11. (In Persian)

Allen MF. 1992. Mycorrhizal Functioning, an Integrative Plant-Fungal Process .New York, p.534.

Amirabadi M., Ardakani MR, Rejali F and Mohsen B. 2010. Effects of *Azotobacter chroococcum* and mycorrhizal fungus at different levels of phosphorus on qualitative and morphological characteristics of forage maize (K S C 704). Iranian Journal of Soil and Water Research, 41(1): 49- 56. (In Persian).

Antunes PM, Rajcan I and Goss MJ, 2006. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, *Bradyrhizobium japonicum* (kirchner) Jordan and

soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Soil Biology and Biochemistry, 38: 533-543.

Barraclough, PB, and Leigh RA. 1993. Critical plant K concentrations for growth and problems in the diagnosis of nutrient deficiencies by plant analysis. Plant Soil, 155: 219-222.

Biswas, JC, Ladha JK and Dazzo FB. 2000. Rhizobial inoculation improves nutritional uptake and growth of lowland rice. Soil Sceince Society of American Journal, 64: 1644-1650.

Clark RB and Zeto SK, 2000. Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. Journal of Plant Nutrition, 23: 867-902.

Cluett HC, Boucher DH. 1983. Indirect mutualism in the legume Rhizobium-mycorrhizal fungus interaction. Oecologia, 59:405–408.

Cottenie A. 1980. Soil and Plant Testing. FAO Soils Bulletin, No. 38/2, 94-100.

Dusha I, Kovalenko S, Banfalvi Z, Kondorosi A. 1987. *Rhizobium.meliloti* insertion element ISRm2 and its use for identification of *thefixX* gene. Journal of Bacteriology, 169:1403-1409.

Ferrera-Cerrato R, and Villerias SJ. 1985. The VA endomycorrhiza and its effect of the development of three arboreous legumes. In Proceeding of the Sixth North American Conference on Mycorrhizae held at ben, Oregon, USA, pp. 328.

Franzini V, Azcon R, Mendes F, Aroca R. 2010. Interactions between Glomus species and Rhizobium strains affect the nutritional Application Microbiol Biotechnol (2011) 89:917–930 927 physiology of drought-stressed legume hosts. Journal of Plant Physiology, 167:614–619.

Giri B, and Mukerji KG. 2004. Mycorrhizal inoculant alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field condition: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. Mycorrhiza, 14: 307-312.

Hajiboland R, Rahmat S, Aliasgharzad N and Hartikainen H. 2015. Selenium-induced enhancement in carbohydrate metabolism in nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) as related to the glutathione redox state. Soil Science and Plant Nutrition, 61:676-687.

Harper JE and Gibson AH. 1984. Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. Crop Science, 24: 497-801.

Iniobong OE, Solomon MG and Osonubi O. 2008. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus inoculation and phosphorus fertilization on the growth of *Gliricidia sepiom* in sterile and non-sterile soil. Research Journal of Agronomy, 2: 23-27.

Jakobsen I. 1995. Transport of phosphorus and carbon in VA mycorrhiza *In:* Mycorrhiza, Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology. A. Varma and B. Hock (eds). Springer–Verlag. Berlin. PP. 297-324.

Kormanic PP and Graw Mc. 1982.Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. *In*: Schenck NC (eds). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. American Phytopathological Society. Saint Paul Minnesota. Pp: 37-45.

Lakzian A. 2011. Microbial activity in rhizosphere. Publication of Ferdowsi University of Mashhad. (In Persian).

Li M, Liu R, Christie P and Li X. 2005. Influence of three arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus on growth and nutrient status of Taro. Communication on Soil Science and Plant analysis 36: 2383-2396.

Liu R, Li M and Meng X. 2000. Effects of AM fungi on endogenous hormones in corn and cotton plants. Mycosystem, 19: 91-96.

Lisette J, Xavier C, Germida JJ. 2003. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobium leguminosarum bv. viceae enhance pea yield and nutrition. Biology and Fertility of Soils, 37:261– 267.

Marschner H, and Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizai symbiosis. Plant and Soil, 159:89–102.

Marx J. 2004. The roots of plant-microbe collaborations. Science, 304:234_236.

Mehrvarz S and Chaichi MR. 2008. Effect of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus chemical fertilizer on forage and grain quality of barely *(Hordeum vulgare* L.). American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science, 3: 855-860.

Miller MH. 2000. Arbuscular mycorrhiza and phosohorus nutrition of maize; a review of Guelph studies. Canadian Journal of Plant Science, 80: 47-52.

Miransari M and Mackenzie AF. 2010. Wheat (*Triticum aestivum* L.) grain N uptake as affected by soil total and mineral N, for the determination of optimum N fertilizer rates for wheat production. Communication in Soil Science and Plant Analysis, 41:1644–1653.

Mortimer PE, Perez-Fernandez MA and Valentine AJ. 2008. The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nitrogen economy of the tripartite symbiosis with nodulated Phaseolus vulgaris. Soil Biology and Biochemistry, 40:1019–1027

Newman G and Romheld. 1999. Root excertion of carboxylic acids and protons in phosphorus-deficient plants. Plant and soil, 211: 121-130.

Norrif IR, Read DJ and Varma AK. 1992. Methods in Microbiology Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic press, London.

Parinske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: The mother of plant root endosymbioses. Natural Review Microbiology, 6: 763-775.

Peix B, Mazurier S, Lemanceau P, Siblot S, Berta G, Mougel C, and Van Tuinen D. 2007. Medicago species affect the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi associated with roots. New Phytologist, 176: 197-210.

Powell CA and Bagraraj DJ. 1984. VA Mycorrhiza. CRC.Press Inc., Boca Raton.

Richardson A, Barea J-M, McNeill A, Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil, 321:305– 339.

Rowell DL, 1994.Soil Science: Method and Applicaation. Longman Scientific and Technical, Wiley, U K P.350.

Schultze M and kondorosi A, 1998. Regulation of simbitic root nodule development. Annual Review of Genetics, 32: 33-57.

Streeter J.1988. Inhibition of legume nodule formation and N_2 fixation by nitrate. CRC *Critical* Reviews in Plant Sciences, 7: 1-24.

Swift M and Bignell D. 2001. Standard methods for assessment of soil biodioversity and land use practice.International centre for research in Agroforestry (ICRAF) Southeast Asia. Available at: http://www.icraf.cgiar.org/sea. 2001 (visited 31 January 2018).

Tavasolee A, Aliagharzad N, Salehi GR, Mardi M, Asgharzadeh A and Akbarivala S, 2011. Effects of co-Inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and Rhizobia on fungal occupancy in Chickpea root and nodule determined by real-time PCR. Current Microbiology, 63: 107-114.

Udvardi MK, Day DA. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48:493_523

Van der Heijden MGA, Bakker R, Verwaal J, Sceublin TR, Rutten M, Van Logestijn RSP and Staehelin C. 2006. Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. FEMS Microbiology Ecology, 56: 178-187.

Wang Y and Oyaizu H. 2009. Evaluation of the phytoremediation potential of four plant species for dibenzofuran-contaminated soil. Journal of hazardous materials, 168(2), pp.760-764.

Wilson PW. 1940. The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation. The University of Wisconsin Press, Madison, Wis.

Yoldas F, Ceylan S, Yagmur B and Mordogan N. 2008. Effects of nitrogen fertilizer on yield quality and nutrient content in broccoli. Journal of Plant Nutrition, 31: 1333-1343.

Zhengi C, Mackenzie AF, and Fanous MA. 1992. Soybean nodulation and grain yield as influenced by N-fertilizer rate, Plant population density and cultivar in southern Quebec. Canadian Journal of Plant Science, 4:1049-1056.

Xie Z-P, Staehelin C, Vierheilig H, Wiemken A, Jabbouri S, Broughton WJ, Vögeli-Lange R and Boller T. 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. Plant Physiology, 108:1519–1525.