

مقایسه کار آبی تثبیت بیولوژیک نیتروژن در نژادهای بومی و غیر بومی *Rhizobium leguminosarum*;bv. phaseoli در لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)

مهدی مهریویان^{۱*} و امیرحسین شیرانی‌راد^۲

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد میانه

۲- دانشیار پژوهش مؤسسه تحقیقات اصلاح نژاد و بذر کرج، مؤسسه تحقیقات دانه‌های روغنی

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۰۸/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۰۳/۰۱

چکیده

به منظور بررسی کارآبی تثبیت بیولوژیک نیتروژن نژادهای باکتری همزیست با لوبیا، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار طی سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ در منطقه خرمدره استان زنجان انجام شد. سطوح تلقیح و کود شامل نژاد Rb117 جمع‌آوری شده از خاک‌های منطقه، نژاد Rb123 از منطقه همدان، نژاد Rb136 از منطقه چهارمحال و بختیاری به همراه مایه تلقیح صنعتی ویژه لوبیا، استفاده از ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن خالص از منبع کود اوره و بدون تلقیح بودند که در سه رقم لوبیای تیپ I (رشد محدود) به نام لوبیاچیتی COS16، قرمز اختر و قرمز درخشان مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های مورد بررسی به کمک آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور تهیه گردید، به طوری که در هیچ‌یک از بسته‌ها تعداد باکتری کمتر از 4×10^8 سلول در هر گرم نبود. نتایج نشان داد که در مجموع، تلقیح ارقام مختلف لوبیا با سویه‌های باکتری، موجب برتری صفاتی چون عملکرد دانه، وزن و تعداد گره در ریشه، درصد و عملکرد پروتئین نسبت به حالت بدون تلقیح و در بعضی موارد نسبت به مصرف ۱۰۰ کیلوگرم کود خالص نیتروژن می‌گردد. در بین سویه‌های مورد استفاده، نژاد باکتری بومی Rb117 نسبت به سایر نژادها برتری نشان داد و در بین ارقام مورد استفاده، رقم لوبیاچیتی COS16 نسبت به دو رقم دیگر برتری صفات بیشتری را در برابر تیمارهای مورد اعمال، نشان داد. کاشت لوبیا با انواع مایه تلقیح، توانست حدود ۴۳ درصد محصول را نسبت به شاهد (بدون تلقیح و بدون کود) افزایش دهد و در بین انواع نژادها، نژاد بومی Rb117، بیشترین تأثیر را بر عملکرد کمی انواع لوبیا داشت.

واژه‌های کلیدی: ارقام لوبیا، تثبیت نیتروژن، رشد محدود، عملکرد دانه

مقدمه

نیتروژن ایفا می‌کند و مؤثرترین گیاهان برای همزیستی با باکتری، آنهایی هستند که ترکیبات کربنی را برای تثبیت‌کننده‌های نیتروژن به ریشه‌ها منتقل کرده و در اختیار آن‌ها قرار می‌دهند.

توانایی رقابت بین نژادهای ریزوبیوم برای تشکیل گره در ریشه‌های عدس در هاوایی بررسی شد و از ۳۱ نژاد مورد مطالعه در این تحقیق، سه نژاد خیلی مؤثر تشخیص داده شد و اثرات متقابل نژاد ریزوبیوم و رقم نیز معنی‌دار بود (May & Bohloul, 1983). قدرت رقابت نژادهای جدید و بومی ریزوبیوم لوبیا چشم‌بلبلی بررسی شد و مشخص گردید که سویه‌های باکتری، قدرت رقابتی متفاوتی داشتند به طوری که نژادهای بومی نقش مؤثرتری داشته و همچنین عواملی مثل تعداد نسبی نژاد و اختصاصی بودن آن، در قدرت رقابت و ایجاد گره‌بندی مناسب اثرات مهمی دارند (Danso & Owiredu., 1998).

مقدار سالانه تثبیت بیولوژیک نیتروژن حدود ۱۷۵ میلیون تن تخمین زده می‌شود که حدود ۷۹ درصد آن مربوط به سیستم‌های خاکی است (Assadi-Rahmani et al., 2005). بسیاری از خاک‌ها، حاوی تعداد زیادی از ریزوبیوم‌های بومی هستند که ممکن است از نظر تثبیت نیتروژن، قدرت بالایی نداشته باشند، اما به دلیل سازگاری خوبی که با شرایط محیطی پیدا کرده‌اند، از قدرت رقابت بالاتری برخوردارند (Khavazi, 2005). کارآبی کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار، پایین است، در حالی که از پتانسیل بالای آلوده‌سازی محیط برخوردارند. ژنوتیپ گیاه، نقش مهمی را در برقراری همزیستی مفید بین گیاه و باکتری تثبیت‌کننده

*نویسنده مسئول: زنجان، کوی قائم، خیابان خیبر، خیبر ۶، پلاک ۳۲۰۲، کد پستی: ۴۵۱۴۹۱۸۳۷۳، همراه: ۰۹۱۲۷۴۱۳۳۴۸، تلفن: ۰۲۴۱۴۲۴۳۳۱۲، پست الکترونیک: mtaherkhani_2000@yahoo.com

مواد و روش‌ها

این آزمایش طی دو سال زراعی ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ در محل مزرعه تحقیقاتی کشت و صنعت بنیاد خرمدره با ۱۵۷۴ متر ارتفاع از سطح دریا انجام شد. اقلیم منطقه نیمه‌خشک (Semi Arid) و میانگین بارندگی سالیانه این منطقه ۲۹۸ میلی‌متر می‌باشد. این آزمایش به صورت آزمایشات فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. سطوح تلقیح و کود در شش سطح عبارت بودند از: بدون تلقیح و بدون کود (شاهد)، نژاد Rb117 جمع‌آوری شده از خاک‌های منطقه، نژاد Rb123 از منطقه همدان، نژاد Rb136 از منطقه چهارمحال و بختیاری به همراه مایه تلقیح صنعتی ویژه لوبیا با نام ریزوبین و استفاده از ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار از منبع کود اوره. برای جداسازی باکتری، سال قبل از اجرای آزمون در مرحله شروع غلاف‌بندی، از مزارع لوبیا گره‌هایی به اندازه یک تا دو میلی‌متر انتخاب شدند و همراه با ریشه، توسط قیچی جدا شده و در ظرف شیشه‌ای، چندین بار با آب معمولی شستشو داده شدند. در مرحله بعد، گره‌ها با اتانول ۹۵٪ به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه و سپس برای پنج دقیقه با کلرور جیوه $HgCl_2$ ۰/۲ درصد ضدعفونی گردیدند و پس از آن، پنج مرتبه با آب مقطر استریل، شستشو داده شدند. گره‌ها به هاون چینی منتقل و به همراه یک قطره آب مقطر، کاملاً له شدند. سپس با لوپ ضدعفونی شده مقداری از آن، برداشته شده و بر روی محیط کشت YMB¹ (شامل دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵، سولفات منیزیم ۰/۱، کلرید سدیم ۰/۱، مانیتول ۱۰ و عصاره مخمر ۰/۵ گرم در یک لیتر آب مقطر؛ pH محیط، تنظیم بر روی عدد ۷) منتقل شدند (Beck et al., 1993). کشت در درون شیشه در شرایط استریل انجام شد و برای هر نمونه چهار تکرار در نظر گرفته شد. لوله‌های کشت داده‌شده در دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور به مدت یک هفته قرار داده شدند. پس از این مدت، نژادهای سفیدرنگ ظاهر شدند. روش علمی رنگ‌آمیزی گرم مثبت و منفی برای شناسایی استفاده شد که وجود باکتری‌های گرم منفی بیانگر نژادهای مورد نظر است. یک کلنی توسط لوپ ضدعفونی شده از نمونه درون شیشه، بر روی محیط YMA درون پتری‌دیش، تحت شرایط فوق کشت شد. در نهایت پس از یک تا دو روز، کلنی خالص شده به دست آمد. این کار برای چندین مرتبه تکرار شد تا تک کلنی باکتری استخراج گردید. همچنین ارقام مورد استفاده (تیپ I) عبارت بودند از:

برخی از نژادهای بومی ریزوبیوم تلقیح شده با لوبیا، علاوه بر تأثیری که بر روی وزن خشک هوایی و درصد نیتروژن بخش هوایی گیاه دارند، موجب افزایش جذب برخی عناصر نیز می‌گردند و مشخص گردید که مایه تلقیح L-75 باعث افزایش حدود ۱۰۰ درصدی در وزن گره‌ها و ۷۰ درصدی در جذب نیتروژن نسبت به تیمار شاهد شده است و تیمار تلقیح شده L-54 نسبت به تیمار شاهد، ۴۵ درصد و نسبت به تیمار ۲۰۰ کیلوگرم اوره در هکتار، ۳۲ درصد افزایش جذب نیتروژن را داشته است (Yahya-Abadi et al., 2008). با بررسی تشکیل گره توسط نژادهای باکتری *Bradyrhizobium japonicum* در سویا، در خاک‌های ایالت آیوا مشخص شد که برخی نژادهای معرفی شده در محلول‌های مختلف آزمایش، قدرت رقابتی متفاوت دارند (Berg & Logenachan, 1988). توان گره‌بندی نژادهای مختلف باکتری و یک مخلوط تجاری برادی‌ریزوبیوم با دو رقم سویا بررسی شد و مشخص گردید که نژادهای باکتری از لحاظ توان گره‌زایی مشابه بودند، اما سه سویه از نظر زمان تشکیل گره، تعداد و وزن گره در گیاه، توسعه ریشه و رشد اندام‌ها و تجمع نیتروژن در گیاه برتر بودند. همچنین یکی از ارقام سویا پتانسیل بیشتری برای گره‌بندی زودتر از خود نشان داد و تعداد گره بیشتری نیز تولید کرد. این رقم، نیتروژن بیشتری را در قسمت‌های هوایی و ریشه جمع کرده و رشد بیشتری را نسبت به رقم دیگر داشت (Bailay, 1988). جهت تعیین اثرات کود نیتروژنه، تراکم گیاهی و ارقام سویا، آزمایشی صورت گرفت که نشان داد کاربرد کود نیتروژنه، گره‌دهی را در ارقام مختلف سویا کاهش می‌دهد (Zhengqi & Mackenize, 1992). نتایج بررسی چهار نژاد باکتری برادی‌ریزوبیوم به روی رقم ویلیامز و یک لاین سویا در کرج، نشان داد که نژاد Highstick نسبت به سایر نژادها از کارآیی گره‌بندی و تثبیت نیتروژن بیشتری برخوردار بود (Yadegari et al., 2005). به لحاظ این که منطقه خرمدره در استان زنجان، به عنوان یکی از قطب‌های تولید لوبیا در سطح کشور می‌باشد و سالانه مقادیر زیادی کود نیتروژنه جهت تأمین نیازهای غذایی این محصول در منطقه مصرف می‌گردد، یافتن راهکاری جهت کاهش هزینه‌ها، حفظ سلامت منابع و محیط‌زیست و افزایش تولید برای این محصول استراتژیک منطقه، امری ضروری به نظر می‌رسید و این تحقیق نیز در راستای همین اهداف، برای اولین بار در منطقه انجام گرفت.

1. Yeast Manitol Broth

و غیره می‌باشد. جهت بررسی و آنالیز شیمیایی آب زیرزمینی مورد استفاده از طرح، هر ساله نمونه‌ای از آب چاه مربوطه به آزمایشگاه ارسال گردید که نتایج آن در جدول ۳-۲ آمده است. یکی از روش‌های طبقه‌بندی آب آبیاری برای مقاصد کشاورزی، استفاده از ضریب جذب سدیم (SAR) و هدایت الکتریکی (EC) براساس نمودار ویلکاکس می‌باشد. این روش توسط آزمایشگاه شوری خاک ایالات متحده آمریکا پیشنهاد شده است. دیاگرام کیفیت آب چاه مورد استفاده در حد قابل قبول بود، به طوری که در کلاس C2-S1 قرار گرفت.

جهت تلقیح بذور در تیمارهای باکتریایی، میزان هفت گرم مایه تلقیح تهیه شده در بخش بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب به همراه ۲۰ میلی‌لیتر آب‌شکر ۲۰ درصد به ازای هر کیلوگرم بذر مصرف گردید. پس از مخلوط کردن مایه تلقیح با بذرها و خشک نمودن آن‌ها در سایه، به سرعت اقدام به کاشت گردید. در کرت‌های تیمارهای باکتریایی، مقدار ۲۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار به عنوان شروع کننده، مصرف گردید. بذور به صورت دستی در محل موردنظر به صورت جوی‌وپشته‌ای کشت گردیدند. کشت لوبیا در این آزمایش به صورت جوی‌وپشته و هیرم‌کاری انجام گرفت. کشت در سال اول آزمایش، اول خرداد و در سال دوم آزمایش، در ۲۲ اردیبهشت انجام گرفت. آبیاری‌های بعدی، با فاصله ۸ تا ۱۰ روز بعد از زمان جوانه‌زنی کلیه بذور تا زمان رسیدگی انجام گرفت. برای مقابله با خسارت علف‌های هرز، دو هفته قبل از کاشت از سم تریفلورالین به صورت پیش‌کاشتی استفاده گردید و در فصل رویش نیز از وجین دستی استفاده شد.

برای تجزیه واریانس مرکب از نرم‌افزار آماری SAS 9.2 استفاده شد و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج جدول تجزیه واریانس مرکب نشان داد که اثر سال، اثر مایه تلقیح و اثر رقم در سطح ۱ درصد و اثر متقابل مایه تلقیح در رقم در سطح ۵ درصد بر مقدار تثبیت نیتروژن، معنی‌دار شد ولی سایر اثرات متقابل بر این مقدار، بی‌تأثیر بودند (جدول ۳). همچنین نتایج مقایسات میانگین نشان داد که میزان تثبیت نیتروژن در سال اول، به میزان ۶۲ و در سال دوم آزمایش به میزان ۷۱ کیلوگرم در هکتار بوده است (جدول ۴). همچنین بالاترین میانگین نیتروژن تثبیت‌شده، از تیمارهای تلقیح به دست آمد و کمترین آن مربوط به تیمار شاهد و کودی بود (شکل ۱).

چیتی COS16، قرمز اختر و قرمز درخشان. بنابراین در هر بلوک آزمایشی از ترکیب سطوح تلقیح و ارقام، ۱۸ کرت و در مجموع ۵۴ واحد آزمایشی ایجاد شد.

برای به دست آوردن تعداد و وزن گره تشکیل شده بر روی ریشه لوبیا، دو روز پس از آبیاری مزرعه، در زمان ۵۰ درصد گلدهی اقدام به نمونه‌برداری از چهار بوته به طور تصادفی به همراه ۰/۰۶۴ مترمکعب (به عمق، طول و عرض ۴۰ سانتی‌متر) حجم خاک اطراف هر بوته شد. پس از شستشوی خاک، تعداد گره‌های فعال تشکیل شده بر روی ریشه شمرده شد و همچنین وزن خشک گره‌ها با ترازوی دقیق (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) تعیین گردید. تعداد ۲۰ بذر که از دو بوته به صورت تصادفی برداشت شده بودند، برای تعیین غلظت نیتروژن (میزان پروتئین در دانه) به آزمایشگاه ارسال گردید که به روش کج‌لدال اندازه‌گیری شد. نمونه‌های گیاهی، ابتدا با آب معمولی به طور کامل شستشو داده شده و سپس با آب مقطر، آب‌کشی گردیدند و بعد نمونه‌ها را داخل دستگاه آون قرار داده و به مدت ۴۸ ساعت آن را در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگه داشته و بعد به کمک دستگاه آسیاب آن‌ها را پودر نموده و از الک نیم‌میلی‌متری عبور داده تا آماده برای تجزیه گردند. کلیه نمونه‌های گیاهی آسیاب شده، به روش هضم مرطوب هضم گردیدند و میزان نیتروژن در عصاره هضم‌شده به روش تیتراسیون بعد از تقطیر و با استفاده از دستگاه اتوماتیک کج‌لدال اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری نیتروژن کل تثبیت‌شده، از روش N-difference تعدیل‌شده استفاده شد (Assadi Rahmani et al., 2005). گیاه غیرلگوم کشت‌شده در مجاورت مزرعه، ذرت بود.

$$N_2\text{fixed} = (N_{\text{leg}} - N_{\text{nonfix}}) + (\text{Soil } N_{\text{leg}} - \text{Soil } N_{\text{nonfix}})$$

$N_2\text{fixed}$: میزان نیتروژن تثبیت‌شده

N_{leg} : نیتروژن تجمع‌یافته در گیاه لگوم

N_{nonfix} : نیتروژن تجمع‌یافته در گیاه غیرلگوم

$\text{Soil } N_{\text{leg}}$: میزان نیتروژن معدنی خاک ناحیه ریشه گیاه لگوم

$\text{Soil } N_{\text{nonfix}}$: میزان نیتروژن معدنی خاک ناحیه ریشه گیاه غیرلگوم

برای آگاهی از وضعیت خاک و آب مزرعه، در هر سال از اجرای آزمایش، یک نمونه مرکب خاک از عمق صفر تا ۴۰ سانتی‌متر جهت اندازه‌گیری مشخصات فیزیکی و شیمیایی برداشت شد و به آزمایشگاه منتقل شد که نتایج تجزیه خاک در هر سال در جدول ۲-۲ آمده است. بررسی خصوصیات شیمیایی یک نمونه آب، مستلزم تجزیه شیمیایی آن بوده و نیاز به تعیین مقدار مواد معدنی اعم از کاتیون‌ها و آنیون‌های موجود، همچنین مقادیر SAR، TDS، هدایت الکتریکی، pH

جدول ۱- مشخصات خاک مزرعه قبل از کاشت (عمق نمونه‌برداری صفر تا ۴۰ سانتی‌متر) در سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶

Table 1. Results of soil analysis (0-40 cm) in 2006 and 2007

مشخصات نمونه	درصد اشباع S.P%	هدایت الکتریکی ds/m ²	واکنش گل اشباع pH	درصد مواد خنثی‌شونده T.N.V%	درصد کربن آلی OC%	نیتروژن کل Total N%	فسفر قابل جذب P ppm	پتاسیم قابل جذب K ppm	رس Clay%	سیلت Silt%	شن Sand%
R1	44.5	1.37	7.1	3.3	1.53	0.076	13	433	30	31	39
R2	46	1.03	7.2	3.4	1.38	0.090	10	445	29	30	41
R3	40.7	1.15	7.1	3.3	1.39	0.087	16	404	34	26	40

مشخصات نمونه	درصد اشباع S.P%	هدایت الکتریکی ds/m ²	واکنش گل اشباع pH	درصد مواد خنثی‌شونده T.N.V%	درصد کربن آلی OC%	نیتروژن کل Total N%	فسفر قابل جذب P ppm	پتاسیم قابل جذب K ppm	رس Clay%	سیلت Silt%	شن Sand%
R1	40.5	1.5	7.4	3.6	1.43	0.086	12	418	32	38	31
R2	44	1.2	7.3	3.4	1.54	0.091	11.5	429	32	39	29
R3	41.2	1.1	7.1	3.46	1.71	0.079	15.3	414	33	40	27

جدول ۲- مشخصات فیزیکوشیمیایی آب آبیاری

Table 2. Results of water analysis

سال Year	SAR	NA (%)	K ⁺ (meq/l)	NA ⁺ (meq/l)	CL ⁻ (meq/l)	Hco ₃ ⁻ (meq/l)	اسیدیته pH	TDS (mg/l)	Ec (µs/cm)	Class
2006	1.486	37.76	0.02	1.8	0.6	3.2	8.07	308	488	C2-S1
2007	1.436	36.02	0.03	1.8	0.62	2.5	8.32	333	510	C2-S1

(جدول ۴) نشان می‌دهد که مایه تلقیح Rb117 (با میانگین ۵۵/۹ عدد)، بیشترین تعداد گره را حاصل نمود و کمترین تعداد گره مربوط به تیمار N₁₀₀ و شاهد (بدون کود و مایه تلقیح) به ترتیب با میانگین ۱۳/۵ عدد و ۲۶/۶ عدد بود. همان‌گونه که نتایج جدول ۴ نشان می‌دهد میانگین تعداد گره تشکیل شده، به واسطه کاربرد مایه تلقیح، حدود ۷۵ درصد بیشتر از میانگین گره در بدون تلقیح و شاهد نیتروژن است، به طوری که کاربرد ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن خالص، تعداد گره را به طور متوسط ۷۶ درصد کاهش داد.

بیشترین تعداد گره تشکیل شده با ۵۵/۹ عدد، مربوط به نژاد Rb117 بود و تیمار N₁₀₀ با میانگین ۱۳/۵ عدد، کمترین مقدار را به خود اختصاص داد. سایر مایه‌های تلقیح نیز با میانگین ۶۷/۵ درصد افزایش در تعداد گره، نسبت به تیمار مصرف نیتروژن، در کلاس آماری پایین‌تری از Rb117 قرار گرفتند.

نتایج جدول مقایسه میانگین، اختلافی را در ارقام مختلف از نظر تثبیت نیتروژن اتمسفری نیز نشان داد، به طوری که میانگین تثبیت نیتروژن در رقم لوبیاچیتی COS16 نسبت به دو رقم دیگر بیشتر بود و نشان‌دهنده ایجاد همزیستی بهتر آن با انواع مایه‌های تلقیح در مقایسه با سایر ارقام مورد بررسی است.

نتایج همچنین نشان داد که بیشترین نیتروژن تثبیت شده در تمامی ارقام، از نژاد Rb117 و کمترین مقدار نیتروژن تثبیت شده از تیمار ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن خالص حاصل شده است. در هر سه رقم در شرایط تیمار کودی، به جهت خاصیت بازدارندگی نیترات معدنی در تثبیت نیتروژن، مقدار تولید گره و تثبیت نیتروژن کاهش یافت (شکل ۳).

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، اثر سال بر صفت تعداد گره در بوته در سطح ۵ درصد و اثر مایه تلقیح و رقم در سطح ۱ درصد بر این صفت معنی‌دار شد، اما سایر اثرات متقابل معنی‌دار نبودند. نتایج جدول مقایسات میانگین

جدول ۳- تجزیه واریانس مرکب تأثیر مایه تلقیح (نژاد باکتری) و رقم لوبیا بر صفات کمی لوبیا

Table 3. Combined analysis of variance for common bean characteristics under effect of different strains of Rhizobium

S.O.V	درجه آزادی df	نیترژن تثبیت شده در هکتار N fixation/ha	وزن خشک گره‌ها Node dry weight	تعداد گره در بوته Node number	عملکرد پروتئین Protein yield	درصد پروتئین دانه Protein%	عملکرد دانه Seed yield
Year(Y) سال	1	2086.2*	22594.0**	877.2*	31476.0**	16.0 ^{n.s}	592889.0**
سال × تکرار Replication×Year	4	4784.1	939.6	283.05	13147.7	0.657	303392.7
Strains (A) نژاد باکتری	5	20892.5**	413101.8**	4063.97**	273534/0**	15.2**	3651492.2**
Cultivars (B) ارقام	2	16374.4**	10415.1**	784.9**	12492.6**	0.17 ^{n.s}	2737721.0**
A×B اثر متقابل	10	762.4*	1307.24**	74.1 ^{n.s}	18219**	4.06**	437916.9**
Y×A اثر متقابل	5	84.5 ^{n.s}	1111.21**	56.04 ^{n.s}	2792 ^{n.s}	0.1117 ^{n.s}	50110.0 ^{n.s}
Y×B اثر متقابل	2	193.42 ^{n.s}	712.79*	22.420 ^{n.s}	17.57 ^{n.s}	0.53 ^{n.s}	19034.3 ^{n.s}
Y×A×B اثر متقابل	10	6602.9 ^{n.s}	256.35 ^{n.s}	83.48 ^{n.s}	2467.0 ^{n.s}	0.44 ^{n.s}	13543.7 ^{n.s}
(E) اشتباه آزمایشی	68	275.7	187.15	126.7	3126.0	0.857	25971.7
ضریب تغییرات (درصد) C.V%		12.17	13.3	30.08	7.7	3.9	5.3

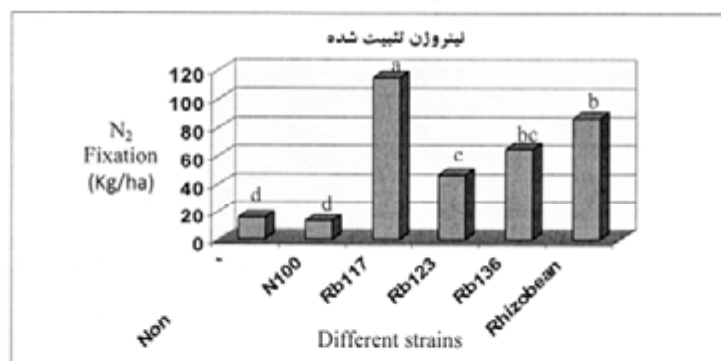
n.s و * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح $\alpha=0.05$ و $\alpha=0.01$
ns :Non-significant, *and **: Significant at $\alpha=0.05$ & $\alpha=0.01$, respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات کمی لوبیا در تیمارهای مختلف نژادهای باکتری در ارقام لوبیا

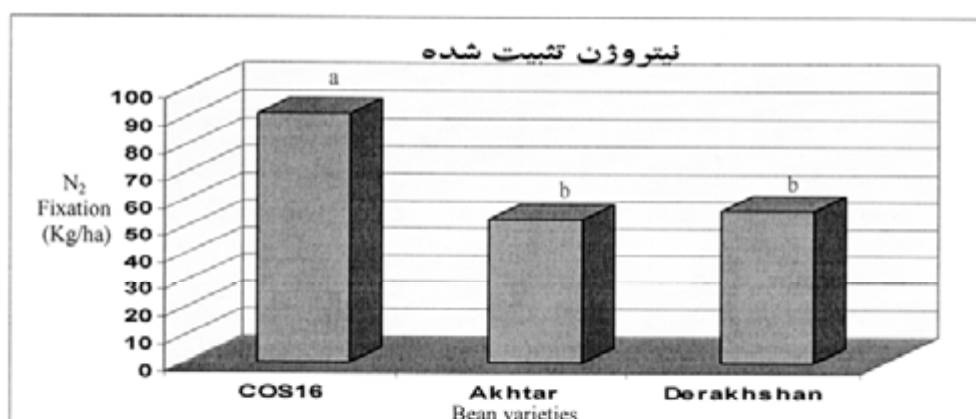
Table 4. Mean comparison for some traits in Common Bean cultivars under different inoculants application

سال Year	درصد پروتئین دانه Protein%	وزن خشک گره‌ها Node dry weight (g)	تعداد گره Node number Per plant	میزان تثبیت نیترژن N fixation (Kg/ha)	عملکرد پروتئین Protein Yield (Kg/ha)	عملکرد دانه Seed yield (Kg/ha)
2006	23.6a	88.5b	34.6 b	62.3 b	706.7 b	2973.54 b
2007	23.7 a	117.3a	40.3 a	71.1 a	740.8 a	3121.7 a
تلقیح Inoculants						
N0	21.9c	56.8e	26.65 c	15.8 e	500.0 e	2230.44 e
N100	23.8a	39.6f	13.5 d	13.7 e	751.5 c	3198.8b
Rb117	24.2a	166.8 a	55.9 a	115.8a	864.3 a	3557.7 a
Rb123	23.6b	99.5d	40.36 b	47.2 d	694.4 d	2947.4 d
Rb136	24.4a	122.7c	42.97 b	64.8 c	742.0 c	3074.3 c
Rhizobean	24.0ab	132.0 b	45.0 b	86.9 b	789.0 b	3277.9 b
رقم Varieties						
COS16	23.7 a	121.8 a	42.8 a	91.2 a	781.5 a	3308.08 a
Akhtar	23.7 a	88.9 c	34.7 b	52.9b	663.7c	2758.75 c
Derakhshan	23.6 a	98.0 b	34.8 b	56.0b	726.0 b	3076.06 b

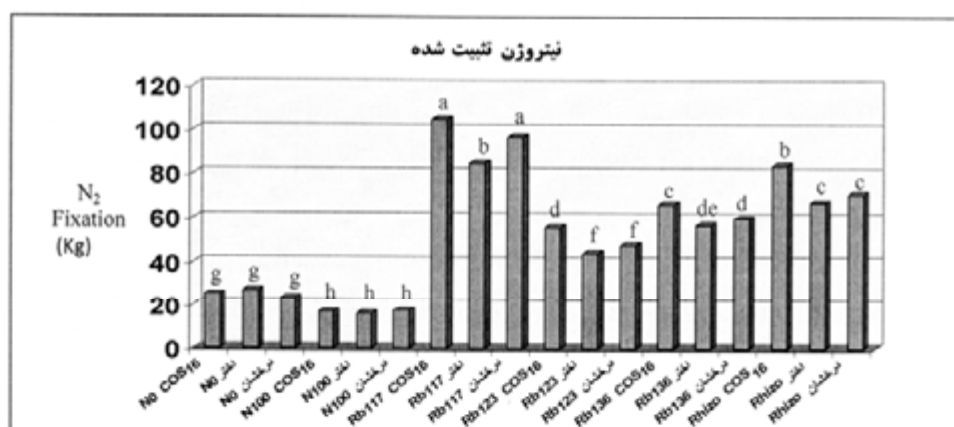
میانگین‌هایی که در هر ستون، حداقل یک حرف مشترک دارند، در سطح $\alpha=0.05$ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.
Means within each column with a letter in common are not significantly different at $\alpha=0.05$.



شکل ۱- اثر انواع نژادهای حاوی باکتری بر میزان تثبیت نیتروژن
 Fig. 1. Effect of different strains on nitrogen fixation



شکل ۲- اثر رقم بر میزان تثبیت نیتروژن
 Fig. 2. Changes of N fixation in different varieties of Common Bean



شکل ۳- اثرات متقابل رقم و مایه تلقیح بر میزان تثبیت نیتروژن
 Fig. 3. Interaction effect of different varieties and strains on changes of N fixation in Common Bean

گرفتند (جدول ۴). در مجموع، کاشت بذور تلقیح شده با انواع مایه تلقیح توانست عملکرد دانه را حدود ۴۳ درصد نسبت به تیمار بدون تلقیح و بدون کود، افزایش دهد. در بین انواع نژادهای حاوی باکتری، نژاد Rb117 حاوی باکتری‌های بومی با تاثیر حدود ۵۹ درصدی و نژاد Rb123 با تاثیر ۳۲ درصدی نسبت به شاهد، به ترتیب بیشترین و کمترین تاثیر را بر عملکرد دانه داشتند. مایه تلقیح ریزوبین و عامل کودی، به یک اندازه بر عملکرد مؤثر واقع شدند (۴۴ درصد افزایش نسبت به شاهد). به نظر می‌رسد نژاد باکتری Rb117 در مقایسه با سایر نژادها، از توانایی رقابت بالاتری برخوردار است. بررسی کارآیی مایه تلقیح ریزوبیومی در نواحی مختلف استان مرکزی، نشان داد که با مصرف مایه تلقیح، عملکرد لوبیا نسبت به تیمار مصرف کود نیتروژن (N_{150}) افزایش داشته است، به طوری که میزان افزایش نسبت به تیمار کودی، در شهرستان اراک ۱۱، خمین ۱/۶ و شازند ۸/۶ درصد بود (Dadivar & Khodshenas, 2005). بالاترین عملکرد دانه از رقم لوبیاچیتی COS16، به مقدار ۳۳۰۸ کیلوگرم حاصل شد که حدود ۷/۵ درصد از رقم درخشان و حدود ۱۹ درصد از رقم اختر بیشتر بود (جدول ۴).

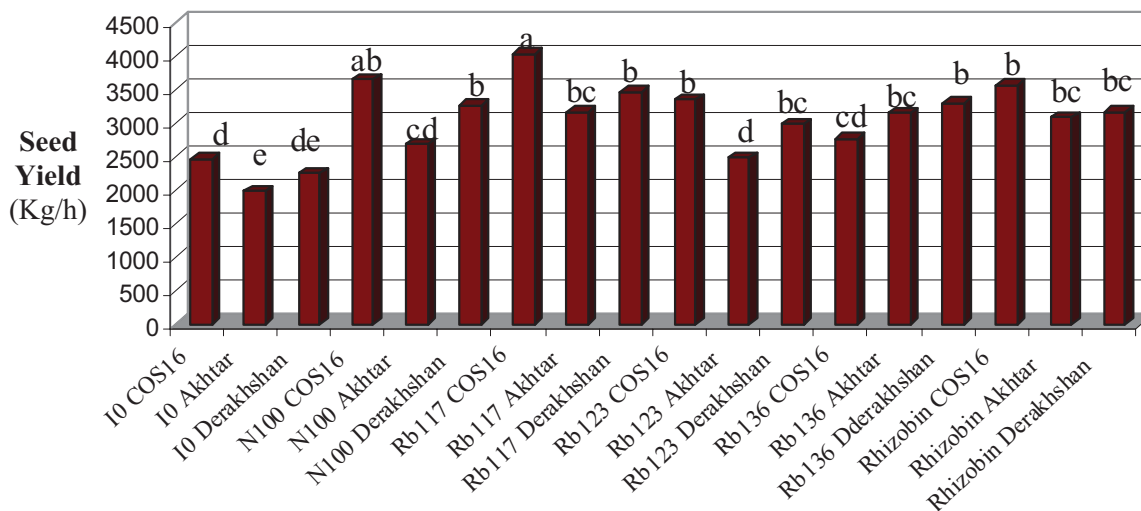
در بین اثرات متقابل، تنها اثر متقابل مایه تلقیح و رقم در سطح یک درصد معنی‌دار شد و مابقی اثرات متقابل، غیرمعنی‌دار بودند. بیشترین عملکرد دانه، ناشی از ترکیب تیمار Rb117 با ارقام مورد آزمایش بود و در این بین، ترکیب Rb117 با رقم COS16، با عملکردی معادل ۴۰۳۴ کیلوگرم به بیشترین عملکرد دانه منجر شد و کمترین آن مربوط به اثر متقابل بدون تلقیح و رقم اختر، به میزان ۱۹۷۷ کیلوگرم بود (شکل ۴). این شکل نشان می‌دهد که عکس‌العمل کلیه ارقام نسبت به کاربرد انواع مایه تلقیح یکسان نیست و تغییرات در رقم COS16 شدیدتر از سایر ارقام است. کاربرد نژادهای L-۵۸ و L-۳۰، به ترتیب بیشترین عملکرد دانه (۲۵۳/۵ گرم بر مترمربع) و وزن خشک اندام هوایی (۵۵۱/۴ گرم بر مترمربع) را در لوبیا ایجاد کردند و تیمار شاهد (بدون تلقیح) با ۱۷۳/۹ گرم بر مترمربع، دارای کمترین مقدار عملکرد دانه بود (Khodshenas et al., 2006). تلقیح با ریزوبیوم، به طور معنی‌داری موجب افزایش عملکرد، مقدار تانن و پروتئین دانه در باقلا گردید و آلودگی به ویروس موزائیک زرد باقلا را نیز به طور چشمگیری کاهش داد (Babiker et al., 1995).

استفاده از مایه تلقیح در لوبیا سبب افزایش معنی‌دار تعداد و وزن گره‌ها نسبت به تیمار عدم تلقیح می‌گردد، به طوری که دو سویه L-51 و L-100 به ترتیب با ایجاد بیشترین تعداد (به ترتیب با ۶۲/۵ عدد برای L-51 و ۵۸/۸ عدد برای L-100) برترین سویه‌ها از میان ۱۰ نژاد جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران تشخیص داده شدند (Assadi Rahmani et al., 1999).

نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) نشان داد که اثر سال، اثر مایه تلقیح و اثر رقم، همچنین اثرات متقابل مایه تلقیح و رقم، سال و مایه تلقیح، در سطح یک درصد و اثر متقابل سال در رقم، در سطح پنج درصد بر وزن گره معنی‌دار شده است، اما اثر متقابل سال و رقم و مایه تلقیح بر این صفت معنی‌دار نشد.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تأثیر مایه تلقیح بر وزن گره در هر بوته، معنی‌دار بوده است و آن‌ها را در کلاس‌های آماری متفاوت قرار داده است، به طوری که در اثر تلقیح، وزن گره افزایش یافت و کمترین وزن گره، از تیمار شاهد نیتروژن به دست آمد. مایه تلقیح Rb117 (با میانگین ۱۶۶/۸ گرم با کلاس آماری a)، ریزوبین (با میانگین ۱۳۲ گرم در کلاس آماری b)، مایه تلقیح Rb136 (با میانگین ۱۲۲/۷ گرم در کلاس آماری c) و مایه تلقیح Rb123 (با میانگین ۹۹/۵ گرم در کلاس آماری d)، بیشترین وزن گره را حاصل نمودند و کمترین وزن گره مربوط به تیمار N_{100} و شاهد مایه تلقیح به ترتیب با میانگین ۳۹/۵ گرم (در کلاس آماری f) و ۵۶/۸ گرم (کلاس آماری e) بود (جدول ۴). با ارزیابی استفاده از مایه تلقیح ریزوبیوم در مقایسه با مصرف کود نیتروژن در زراعت لوبیا در استان مرکزی، که شامل ۱۰ تیمار تلقیح باکتری (L-۱۲۰، L-۱۰۹، L-۳۹، L-۵۸، L-۱۰۰، L-۳۰، L-۷۰، L-۲۱۶، L-۴۷، L-۷۸ و دو تیمار کودی ۲۰۰ و ۴۰۰ کیلوگرم اوره در هکتار و یک تیمار شاهد (بدون مصرف کود نیتروژن) و تلقیح میکروبی) بود، نتیجه گرفته شد که تیمار ۱ با ۲۹ گره و وزن ۰/۲۷۷ گرم دارای بیشترین و تیمار کودی ۱۲ با پنج گره و وزن ۰/۰۲۷ گرم، دارای کمترین تعداد گره و به همراه تیمار ۱۱، دارای کمترین وزن گره می‌باشد. در سال‌های ۱۳۸۰ و ۱۳۸۲، تیمار باکتریایی ۸، دارای بیشترین تعداد گره بود (Khodshenas et al., 2006).

بیشترین وزن گره به میزان ۱۲۱/۸ گرم با کلاس آماری a مربوط به رقم COS16 بوده و ارقام درخشان و اختر به ترتیب با میانگین‌های ۸۸/۹ و ۹۸ گرم، در کلاس آماری b و c قرار



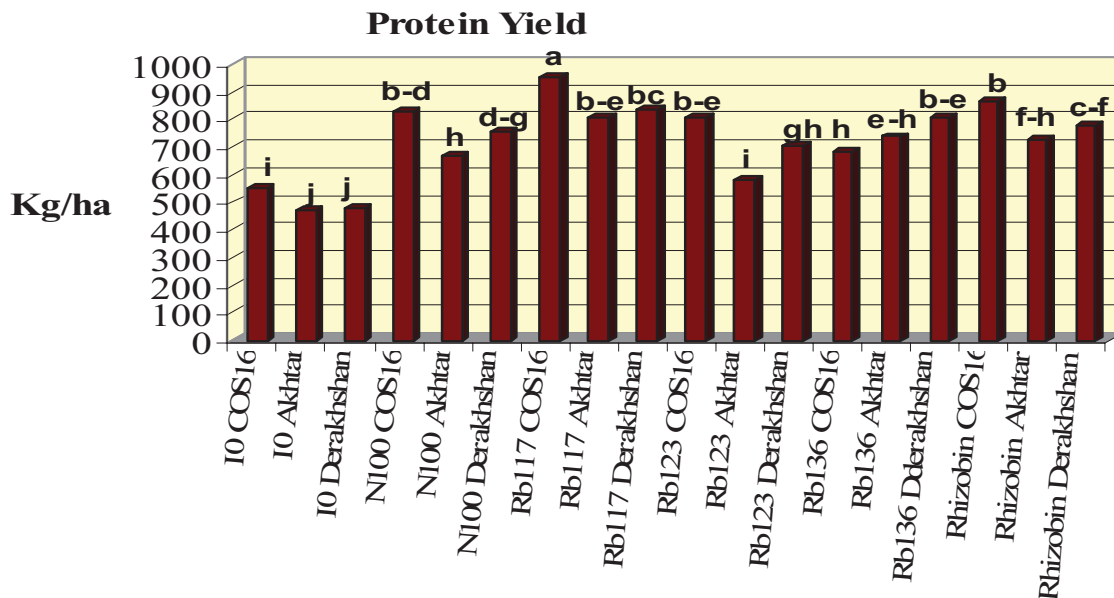
شکل ۴- اثرات متقابل رقم و مایه تلقیح بر عملکرد دانه

Fig. 4. Interaction effect of different varieties and strains on changes yield in Common Bean

بالاترین و رقم اختر با میانگین $663/7$ کیلوگرم در هکتار، کمترین عملکرد پروتئین را به خود اختصاص دادند. بیشترین عملکرد پروتئین، از رقم لوبیا چیتی تلقیح‌شده با مایه تلقیح Rb117 به‌دست آمد (جدول ۴). نتایج اثرات متقابل مایه تلقیح و رقم بر عملکرد پروتئین (شکل ۵) نشان می‌دهد که بالاترین عملکرد پروتئین نیز از ترکیب Rb117 با رقم COS16 با عملکردی معادل 806 کیلوگرم به‌دست آمد و کمترین آن، مربوط به اثر متقابل شاهد بدون تلقیح و رقم‌های اختر و درخشان به‌ترتیب به میزان 471 و 477 کیلوگرم بود (شکل ۵). همچنین بالاترین درصد پروتئین، به ترتیب به مقدار $24/4$ و $23/8$ درصد، مربوط به تیمار مایه تلقیح Rb117 و کود نیتروژن بود و کمترین آن، مربوط به تیمار شاهد (بدون تلقیح و کود) با میانگین $21/9$ درصد بود. با بررسی توان تثبیت نیتروژن توسط ایزوله‌های مختلف باکتری ریزوبیوم فازتولی در لوبیاچیتی و قرمز در منطقه شهرکرد، این نتیجه گرفته شد که بیشترین درصد پروتئین دانه از تلقیح بذور با سویه L-125 منطقه الشتر، به میزان $21/47$ درصد و کمترین آن، از تیمار مصرف کود نیتروژن به میزان $18/37$ درصد به‌دست آمد. همچنین بیشترین عملکرد دانه، از تلقیح بذور با نژاد L-125 منطقه الشتر به میزان $0/251$ کیلوگرم در مترمربع و کمترین آن از شاهد به میزان $0/141$ کیلوگرم در مترمربع به‌دست آمد. نژاد مذکور با سویه‌های L-78 از منطقه شهرکرد و L-109 از منطقه تویسرکان همدان در یک گروه آماری قرار گرفتند (Yadegari et al., 2005).

همچنین نتایج یک آزمایش مزرعه‌ای در شیش منطقه از ویکتوریا استرالیا نشان داد که عملکرد دانه، در تمام تیمارهای تلقیحی افزایش داشته است (Carter et al., 1994). تیمارهای تلقیحی به روی باقلا در خوزستان نیز بین 35 تا 69 درصد نسبت به شاهد افزایش عملکرد نشان دادند (Khosravi et al., 2001). مصرف مایه تلقیح در سویا، عملکرد دانه را نسبت به تیمار 180 کیلوگرم مصرف کود، دو برابر و نسبت به شاهد بدون تلقیح، 10 برابر افزایش داده است (Duong et al., 1984). بررسی نژادهای مختلف نشان داد که بین ارقام لوبیا از لحاظ عملکرد دانه، تعداد دانه در غلاف، تعداد غلاف، وزن 100 دانه، عملکرد بیولوژیک، شاخص سطح برگ و وزن غلاف خشک در مترمربع، اختلاف بسیار معنی‌داری بدست آمد، در حالی که از نظر شاخص برداشت دانه، تفاوت معنی‌داری حاصل نشد (Ghasemi-Pirbaloti et al., 2003). نتایج این تحقیق نشان داد که نژادهای برتر بومی، به دلیل سازگاری بهتر به شرایط خاک و اقلیم منطقه، توانایی رقابت بیشتری با باکتری‌های دیگر دارند و مؤثرترند.

بالاترین عملکرد پروتئین به مقدار $864/3$ کیلوگرم در هر هکتار، به تیمار مایه تلقیح Rb117 و کمترین آن، مربوط به تیمار بدون تلقیح با میانگین 500 کیلوگرم بود. کمترین عملکرد پروتئین به تیمارهای N100 و Rb136 مربوط بود. تأثیر رقم نیز بر عملکرد پروتئین دانه، در سطح 5 درصد معنی‌دار شد، به‌طوری‌که لوبیاچیتی رقم COS16، با میانگین $781/5$ کیلوگرم،



شکل ۵- اثرات متقابل رقم و مایه تلقیح بر عملکرد پروتئین دانه

Fig. 5. Interaction effect of different varieties and strains on changes protein yield

جدول ۵- ضرایب همبستگی صفات عملکرد دانه، عملکرد پروتئین، تعداد گره، وزن گره در بوته، نیتروژن تثبیت شده و درصد پروتئین.

Table 5. Correlations coefficients between grain yield, protein yield, node number, node weight, nitrogen fixation and protein percent

درصد پروتئین Protein%	نیتروژن تثبیت شده N fixation/ha	وزن گره Node dry weight	تعداد گره در ریشه Node number per plant	عملکرد پروتئین Protein yield	عملکرد دانه Seed yield	صفات Traits
					1	عملکرد دانه Seed yield
				1	0.979 ^{**}	عملکرد پروتئین Protein yield
			1	0.526 [*]	0.47 ^{ns}	تعداد گره Node number
		1	0.956 ^{**}	0.64 ^{**}	0.594 [*]	وزن گره Node dry weight
	1	0.68 ^{**}	0.59 [*]	0.90 ^{**}	0.878 ^{**}	تثبیت نیتروژن N fixation/ha
1	0.55 [*]	0.4 ^{ns}	0.36 ^{ns}	0.64 ^{**}	0.48 ^{ns}	درصد پروتئین Protein%

n.s. * and **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح $\alpha=0.05$ و $\alpha=0.01$.
ns: Non-significant, *and **: Significant at $\alpha=0.05$ & $\alpha=0.01$, respectively.

به ترتیب با میزان نیتروژن تثبیت شده در واحد سطح و وزن گره در هر بوته، همبستگی مثبت و معنی داری در سطح یک درصد و پنج درصد دارد، به طوری که با افزایش میزان تثبیت نیتروژن، عملکرد دانه افزایش می‌یابد. همچنین این نتایج نشان می‌دهد که نیتروژن تثبیت شده، با وزن گره‌ها در بوته در سطح یک درصد و با تعداد گره و درصد پروتئین در سطح پنج درصد همبستگی مثبت و معنی داری دارد.

این تغییرات در عملکرد و پروتئین، احتمالاً مربوط به اختلاف در میزان توان تثبیت نیتروژن و فراهمی میزان نیتروژن برای گیاه توسط سویه‌های مختلف باکتری می‌باشد. بیشترین درصد پروتئین، از رقم اختر تلقیح شده با مایه تلقیح Rb117 (با میانگین ۲۵/۳ درصد) و کود داده شده (با میانگین ۲۵/۰۳ درصد)، به دست آمد که به طور متوسط ۱۹ درصد از میانگین کمترین مقادیر حاصله، بیشتر است. نتایج جدول همبستگی صفات (جدول ۵) نشان می‌دهد که عملکرد دانه

منابع

1. Assadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Asgharzadeh, A., and Rejali, F. 2005. Methods for evaluating biological nitrogen fixation. In: K. Khavazi, H. Assadi-Rahmani and M.J. Malakoti (Eds.). Necessity for the production of biofertilizers in Iran. Compilation of papers- 2nd Edition. Soil and Water Research Institute. p. 80-108.
2. Assadi-Rahmani, H., Afshari, M., Khavazi, K., and Sajadi, H. 1999. Study the nitrogen fixation efficiency of native strains of symbiosis Rhizobium bacteria in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Soil and Water Research Institute. Jahad-Agriculture Ministry. p: 93-97.
3. Babiker, E.E., Elsheikh, A.E., Osman, A.J., and Tinay, A.H.E. 1995. Effect of nitrogen fixation, nitrogen fertilization and viral infection on yield, tannin and protein contents and in vitro protein digestibility of faba bean. *Plant Foods for Human Nutrition* 47: 257-263.
4. Bailay, L.D. 1988. Influence of single strain and a commercial mixture of *Bradyrhizobium japonicum* on growth, nitrogen accumulation and nodulation of two early maturing soybean cultivars. *Canadian Journal of Plant Science* 68: 411-418.
5. Berg, R.K., and Lognathan, J.K. 1988. Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa soils. *Agronomy Journal* 80: 876-88
6. Carter, J.M., Gardner, W.K., and Gibson, A.H. 1994. Improved growth and yield of faba beans (*Vicia faba* cv. Fiord) by inoculation with strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viciae* in acid soils in south-west Victoria. *Aust. J. Agri. Research* 94: 613-623.
7. Dadivar, M., and Khodshenas, M.A. 2005. Evaluation the efficiency of Rhizobium inoculants application on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Markazi Province. First Iranian Pulse Crops Symposium, 20-21 November, Mashhad, Iran.
8. Danso, S.K., and Owiredu, J.D. 1988. Competitiveness of introduced and indigenous cowpea in three soil. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 305-310.
9. Duong, T.P., Diep, V.C.N., Khiem, N.H., Tol, N.V., and Nhan, L.T.K. 1984. Rhizobium inoculants for soybean [*Glycine max* L. Merrill] in Mekong delta. II. Response of soybean to chemical nitrogen fertilizer and Rhizobium inoculation. *Plant and Soil* 79: 241-247.
10. Ghasemi-Pirbaloti, A., Allah-Dadi, I., and Akbari, G.A. 2003. Study the effect of seed inoculation with different strains of Rhizobium in different varieties of common bean on yield and yield components for selection the best strain-variety composition. Final Report of Research Design. Tehran University.
11. Khavazi, K. 2005. Use of markers gene to monitoring of Rhizobiums competition ability. In: K. Khavazi, H. Assadi-Rahmani, H., and M.J. Malakoti (Eds.). Necessity for the Production of Biofertilizers in Iran. Compilation of Papers- 2nd Edition. Soil and Water Research Institute. p: 109-131.
12. Khavazi, H., Assadi-Rahmani, H., and Malakoti, M.J. 2005. Necessity for the Production of Biofertilizers in Iran. Compilation of Papers- 2nd Edition. Soil and Water Research Institute. p: 154-170.
13. Khodshenas, M.A., Dadivar, M., Assadi-Rahmani, H., and Afshar, M. 2006. Study the effect of rhizobacteria seed inoculation compare with using chemical nitrogen fertilizer in common bean cultivation in Markazi Province. *Agriculture and Natural Resource Sci.* 13.
14. Khosravi, H., Khavazi, K., and Mirzashahi, K. 2001. Use of faba bean inoculants instead of chemical fertilizer (Urea fertilizer) in Safi-Abad Dezfol region. *Soil and Water Res. (Special for optimizing fertilizers application)* 12: 146-153.
15. May, S., and Bohlool, N.B. 1983. Competition among *Rhizobium leguminosarum* strains for nodulation of lentils. *Applied Microbiology* 45: 960-965.

16. Yadegari, M., Akbari, G.A., Allahdadi, I., Dasneshiyan, J., and Assadi-Rahmani, H. 2005. Study the effect of different inoculants of *Bradyrhizobium japonicum* on soybean (*Glycine max* L.). Iranian Agronomy Journal Science 6(1): 32-55.
17. Yahyaabadi, M. 2008. Evaluation of nitrogen fixation potential and nutrients uptaking in some common bean symbiosis bacteria. Proceeding of 1^{0th} Iranian Congress of Crop Production and Plant Breeding. 19-21 August, Karaj, Iran, p: 75.
18. Zhengqi, C., and Mackenize, A.F. 1992. Soybean nodulation and grain yield as influenced by N-fertilizer rate. Canadian Journal & Plant Science 72: 1049-1056.

Comparing the biological nitrogen fixation efficiency, in native and non-native strains of *Rhizobium leguminosarum*;bv.phaseoli in Common Bean

Mehrpoyan^{1*}, M. & Shirani Rad², A.H.

1- Islamic Azad University, Miyaneh Branch, Miyaneh, Iran

2- Associate Professor of Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

Received: 12 November 2010

Accepted: 22 May 2011

Abstract

In order to study the biological fixation efficiency of different strains of symbiosis bacteria in three varieties of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) a factorial experiment based on randomized complete block design was conducted in Zanjan province during 2006 and 2007. In this investigation three strains of Rizobium including: Rb117 (extracted from the Zanjan soils), Rb123 (extracted from the Hamadan soils), Rb136 (extracted from the Chahar Mahal Bakhtiyari soils) and a biological inoculants (Rhizobean), with two nitrogen fertilizer treatments (application of 100 kg/ha N and no N application as control), and three bean cultivars (erect type) (COS16, Akhtar and Derakhshan) arranged and data analysis preformed using SAS9.1 and means comparison were done with Duncan's Multiple Range Test. Results showed that Rb117 strain caused 59% increasing in seed yield compared with non inoculants treatments. The results showed that significant difference in seed and protein yield, seed protein percentage, number and weight of nodules (50 day after emergence) were observed among seed inoculated and non-inoculated. The highest protein content (about 24%) and protein yield (864 kg/ha) were achieved from 100 kg nitrogen, inoculated by Rb117 strain and lowest protein yield was produced from control. Among of all inoculants *Rhizobium leguminosarum*;bv.phaseoli, Rb117 strain was more effective than other strains, on common bean yield. Among three cultivars, COS16 line was successful in compared with other cultivars. Among Rizobium strains, Rb117 and among bean cultivars, COS16 produced the highest seed yield. Common bean production using strains of Rizobium caused 43% yield increasing and Rb117 strain compatibility was more than other strains and had the most influence on yield.

Key words: Common bean, Inoculants, Nitrogen fixation, Varieties, Yield

* Corresponding Author: E-mail: mtaherkhani_2000@yahoo.com, Mobile : 09127413348