بررسی برخی عوامل محدود کننده تشکیل گره بر ریشه یونجه در بعضی از نقاط استان اصفهان

مجتبی یحیی‌آبادی[1]* و کاظم خاوازی

مربی پژوهش مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان؛ Mo_yahya@yahoo.com

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ kkhavazi@yahoo.com

چکیده

موفقیت ریزوبیوم در هریک از مراحل همزیستی، بستگی به توان تحمل انواع تنش‌های محیطی و سازگاری با شرایط محیطی دارد. پژوهش حاضر به منظور بررسی برخی عوامل محدود کننده گره بندی ریشه یونجه در تعدادی از مزارع یونجه استان اصفهان به مورد اجرا گذاشته شد. بعضی خصوصیات خاک مثل وزن مخصوص ظاهری، بافت خاک، pH،EC، درصد کربن‌آلی ، مقادیر ازت کل، فسفر و پتاسیم اندازه‌گیری شد. شمارش ریزوبیوم های خاک هر منطقه به روشMPN و از طریقه آلوده کردن گیاه انجام گردید. براساس ضرایب همبستگی ساده بدست آمده بین خصوصیات مختلف خاک و درجه گره‌بندی و جمعیت ریزوبیومها، پارامترهایی مثل جرم مخصوص ظاهری خاک و میزان فسفر و پتاسیم خاک، همبستگی مثبت و اثرات معنی‌دارتری از خود نشان دادند. براساس آنالیز رگرسیون ، میزان پتاسیم و فسفر خاک در سطح یک درصد و مقدار جرم مخصوص ظاهری خاک در سطح پنج درصد با درجه گره‌بندی ریشه وجمعیت ریزوبیومها معنی‌دار می‌باشد.از طرفی دیگر عواملی همچون عدم آشنایی کشاورزان، با پدیده همزیستی لگوم- ریزوبیوم، شرایط نامساعد آب و هوایی بعضی مناطق، نامناسب بودن خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک‌ها، عدم مدیریت صحیح مزارع یونجه در مراحل کاشت، داشت و برداشت، عدم توجه به اصول تغذیه گیاه یونجه، عدم رعایت زمان مناسب برداشت و همچنین تعداد چین زیاد، چرانیدن دام روی مزاع یونجه و عدم وجود باکتری‌های مؤثر در خاک، از مهمترین عوامل محدود کنندۀ گره‌بندی ریشۀ یونجه بوده‌اند.

واژهای کلیدی: یونجه، سینو ریزوبیوم ملیلوتی، گره‌بندی، خصوصیات خاک، مدیریت خاک

مقدمه

پتانسیل تثبیت ازت مستقیماً به وجود باکتریهای ریزوبیوم کارآمد، گره‌بندی مؤثر و فاکتورهای رشد گیاه بستگی دارد. هر گونه شرایط نامساعد خاک یا تنشهای محیطی که برروی رشد گیاه اثر منفی دارند، باعث کندی فرآیند تثبیت ازت می‌شوند. این پروسه همچنین تحت تأثیر مقادیر ازت قابل استفاده در خاک قراردارد. مقادیر بالای ازت خاک تثبیت ازت را کاهش می‌دهد زیرا لگوم ها قبل از اینکه شروع به تثبیت ازت اتمسفر نمایند ترجیحاً از ازت قبل استفادۀ خاک مصرف می‌کنند. هنگامیکه ازت نیتراته خاک به بیش از 35 کیلوگرم در هکتار برسد، به دلیل اثرات مهارکنندگی نیترات در فرایند آنزیمی تثبیت

1- نویسنده مسئول، آدرس: اصفهان، شهرک امیرحمزه، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان – کد پستی 199-81785.

* دریافت: 84/12/4 و پذیرش: 85/9/1

ازت، تشکیل گره در ریشه محدود می‌شود. برعکس اگر میزان ازت خاک خیلی کم باشد رشد گیاه کاهش می‌یابد. در ابتدای تشکیل گره‌ها، لگوم ها نیاز به 15 کیلوگرم در هکتار ازت از منابع دیگر دارند که معمولاً ازت باقیمانده در خاک، این نیاز آنها را برطرف می‌کند، در غیر اینصورت افزودن 20 تا 30 کیلوگرم در هکتار کودهای ازته لازم می‌باشد (Biederbeck *et al.*, 1995).

موفقیت ریزوبیوم در هریک از مراحل همزیستی به تحمل تنش‌های محیطی توسط باکتری‌ها بستگی دارد (Valssak and Vanderleyden, 1997). به عنوان مثال، در بررسی اثر بازدارندگی نیترات روی ریزوبیوم، ملاحظه گردید که شکل تارهای کشنده تحت تأثیر نیترات زیاد، تغییر یافته و آلودگی در ریشه‌ها ایجاد نمی‌گردد. ازت بیش از میزان بحرانی نیز برروی نفوذ باکتری به درون تارهای کشنده اثر منفی گذاشته و تعداد و وزن خشک گره‌های تشکیل شده روی میزبان را غالبا کاهش می‌دهد (Eayleshan *et al.*, 1983;Schubert,1995). میزان اثرات منفی ترکیبات نیتراته با فاکتورهای مختلف نظیر فرم و نوع ترکیبات نیتراته، گونه و واریته میزبان، سوش باکتری، فصل‌رشد، شدت نور، درجه حرارت و وضعیت عناصر غذایی بستگی دارد (Dazzo *et al.*, 1978; Schubert, 1995). همچنین، اثرات محدود کننده خاکهای اسیدی نیز بر فرایند همزیستی بخوبی شناخته شده است. در خاکهای اسیدی، قابلیت جذب عناصر ضروری مانند کلسیم و مولیبدن برای همزیستی کاهش می‌یابد (Leung and Bottomley, 1987) همچنین گزارش شده که در خاکهای اسیدی تشکیل کلنی بر سطح ریشه توسط باکتری و تعداد و اندازه گره کم می‌شود (Wood *et al.*, 1984). یوسف و همکاران (1987)،تأثیر عوامل محیطی روی تعداد ریزوبیوم‌های همزیست با گیاه بادام زمینی در 66 نمونه خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف عراق را مورد بررسی قرار دادند.آنها همبستگی منفی عواملی مثل اسیدیته خاک ، هدایت الکتریکی خاک و میزان آهک خاک را با تعداد باکتریهای ریزوبیوم مشاهده کردند (Yousef *et al.*, 1987). وومر و همکاران (1988) همبستگی مثبت معنی‌دار میانگین بارندگی سالانه، درجه حرارت خاک، اسیدیته خاک وبیوماس ریشه گیاه میزبان با تعداد ریزوبیوم را گزارش کردند (Woomer *et al.*, 1988) همزیستی لگوم-ریزوبیوم در دمای مناسبی بوقوع می‌پیوندد و در درجه حرارتهای کمتر یا بیشتر، مراحل گره بندی به تأخیر می‌افتد.گیبسون (1971) نشان داد که در درجه حرارت پایین، مقدار ازت باقیمانده در گره‌ها نسبت به درجات بالاتر، زیادتر است. به نظر می‌رسد که در درجه حرارت پایین انتقال مواد ازته از ریشه به قسمت هوایی محدود می‌شود. معمولاً در درجه حرارت‌های کمتر از 7 و بیشتر از 36 درجه سانتی‌گراد، گره تشکیل نمی‌شود و یا به‌صورت محدود می‌باشد. این مسئله با تغییر در سوش باکتری و واریته گیاه متفاوت خواهد بود (Roughley and Dart, 1970). نقش نور نیز بر تثبیت ازت از طریق تأثیر آن بر فتوسنتز و در نتیجه اثر بر تأمین مواد فتوسنتزی جهت رشد و فعالیتهای گره صورت می‌گیرد. بنابراین ممکن است ارتباط مستقیمی بین شدت نور، گره‌بندی و تثبیت ازت وجود داشته باشد (Feigfnbaum and Mengel, 1979). شوری خاک یا مقدار نمکها با کاهش جمعیت ریزوبیومی و تنزل قدرت نفوذ ریزوبیومها به داخل تارهای کشنده، تثبیت ازت به صورت همزیستی را کاهش می‌دهند. علاوه بر آن در شرایط شور، تشکیل تارهای کشنده کم می‌شود که خود نفوذ و جذب ریزوبیوم را محدود می‌کند (Keck *et al.*, 1984).این گزارش نشان داد که غلظت 291 میلی مولار کلرور سدیم باعث کاهش جمعیت ریزوبیومی تا 50 درصد شده و در غلظت بالایی همانند 793 میلی مولار نمک، رشد جمعیت ریزوبیومی کاملاً متوقف گردید (Keck *et al.*, 1984). تنش خشکی نیز که اغلب همراه با شوری در خاک می‌باشد، سبب کاهش جمعیت میکروبی خاک می‌شود. در خاکهای خشک، آلودگی به دلیل غیاب تارهای کشنده معمولی محدود می‌گردد و از طرف دیگر در شرایط کمبود آب، تارهای کشنده به صورت منشعب ظاهر می‌شوند که برای آلودگی ریزوبیومی مناسب نمی‌باشند. خشکی، میزان تثبیت ازت و تنفس گره‌ها را کاهش می‌دهد و این خسارت به دلیل غلظت بالای نمک در کنار یا درون گره‌ها می‌باشد (Balasunhramanian and Sinha, 1976).

با توجه به هوازی بودن باکتریهای ریزوبیوم، نقش اکسیژن در فرایند همزیستی قابل توجه می‌باشد. آزمایشات در مورد سویا نشان داد که افزایش فشار اکسیژن از 0/2 به 0/24 اتمسفر، فعالیت تثبیت ازت را به مقدار 28 درصد افزایش می‌دهد. حالت غرقابی چون باعث کاهش مقدار اکسیژن در

اتمسفر ریشه در خاک می‌گردد، عامل بازدارنده‌ای در فرآیند تثبیت ازت خواهد بود (Keck *et al.*, 1984). از طرفی لگومها مانند سایر گیاهان برای رشد خود به عناصر میکرو و ماکرو نیاز دارند. در این میان آنها به عناصر آهن و مولیبدن نیاز بیشتری برای ساخت نیتروژناز و هموگلوبین دارند. از طرفی کمبود فسفر یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تثبیت ازت مولکولی محسوب می‌شود. فسفر در گره بندی، تعداد،حجم و وزن گرهک، رشد گیاه میزبان و فرایند تثبیت ازت نقش موثری دارد. همچنین برخی از عناصر پرمصرف مانند پتاسیم و تعداد دیگری از عناصر کم مصرف مثل روی ، منگنز و مس بدلیل نقشی که در فتوسنتز و متابولیسم عمومی گیاه و باکتری به عهده دارند، بر فرآیند تثبیت ازت مؤثر می‌باشند (Sprent, 1991). گزارشاتی نیز حاکی از آن است که وجود بیش از حد عناصر سنگین مثل سرب، مس و کادمیوم در خاک که بر اثر استفاده بیش از حد کودهای لجن فاضلاب و کمپوست زباله تجمع می یابند، اثر منفی بر تعداد ریزوبیوم ها ومیزان تثبیت ازت مولکولی دارد (Boreleau and Prevest, 1994). ریزوبیومها نیز مانند بسیاری از موجودات ذره‌بینی خاک بوسیله موجوداتی مثل پروتوزوئرها و میکسوباکترها مورد تغذیه قرار می‌گیرند. ویروسهای گیاهی، ریزو بیوفاژها و نماتدها از طریق تأثیر بر فیزیولوژی و بیولوژی گیاهان میزبان وگرهک‌های ریشه‌ای تثبیت ازت را متأثر می‌سازند. همچنین قارچ‌کش‌هایی که مورد استفاده قرار می‌گیرند بعنوان یک تنش محسوب شده و بر بقای ریزوبیومها مؤثر می‌باشند (Alexander, 1982; Sprent, 1990).

سطح کاشت یونجه در استان اصفهان حدود 30000 هکتار تخمین زده می‌شود (بی نام، 1380) و ارقام کشت شده در استان ، عمدتاً از اکوتیپ های ارقام یزدی ، همدانی، رهنانی و بومی هستند. تحقیق حاضر به منظور بررسی برخی عوامل محدود کننده گره‌بندی ریشه یونجه در تعدادی از مزارع یونجه استان اصفهان به مورد اجرا گذاشته شد.

مواد و روشها

ده منطقه مختلف از استان اصفهان انتخاب گردید و نمونه‌های خاک و گیاه یونجه همراه ریشه از این مناطق تهیه شد. نمونه برداری‌ها عمدتاً از مزارع یونجه دو یا سه ساله و در ابتدای گلدهی انجام پذیرفت. غده‌ها پس از شستشو و استریل سطحی (با الکل 96% و کلرید جیوه 0/1 درصد)، در محیط سیلیکاژل نگهداری شدند. بعضی خصوصیات خاک مثل وزن مخصوص ظاهری، بافت خاک، pH،EC، درصد کربن آلی، مقادیر عناصر ازت کل، فسفر و پتاسیم اندازه‌گیری شد. برای تعیین درجه گره‌بندی ریشه گیاهان یونجه، از هر محل تعدادی (حداقل سه عدد) بوته گیاه و ریشه همراه با خاک اطراف آنها برداشته و بوسیله آب به آرامی شسته شدند. سپس درجه گره بندی با استفاده از جدول طبقه‌بندی گره بندی وینست تعیین شد (Vincent, 1970). به منظور تایید ایزوله‌های حاصل از کشت گره، پس ازله کردن گره‌های استریل شده در سرم فیزیولوژیک، سوسپانسیون برروی پلیت های حاوی YMA کشت شد و پس از خالص سازی، برای تهیه سوسپانسیون باکتری، سوسپانسیون به محیط YMB تلقیح گردید، سپس ارلن حاوی YMB و سینوریزوبیوم *ملیلوتی* به انکوباتور شیکردار منتقل شدند. از طرفی بذور یونجه استریل سطحی شده با الکل، کلرید جیوه و آب مقطر استریل را که برروی آب- آگار 1/5 درصد جوانه زده بودند، داخل لوله اسلنت حاوی محیط غذایی Dillworth قرار داده (ICARDA, 1993) و ته لوله را با فویل آلومینیم پوشانده و به اتاقک رشد منتقل شدند وبرای تست تأییدی گره بندی، سوسپانسیون تهیه شده به کنار بذرجوانه زده داخل اسلنت تزریق شد. شمارش ریزوبیومهای خاک هر منطقه به روشMPN و براساس روش وینسنت (1970) انجام گردید (Vincent, 1970). به منظور تخمین جمعیت ریزوبیوم در خاک، از روش آلوده سازی ریشه گیاه استفاده شد. برای انجام این آزمایش، ابتدا از همان محل‌هایی که برای اندازه‌گیری پارامترهای خاک نمونه تهیه می‌شد، از عمق 20 تا 30 سانتی‌متری نمونه‌برداری صورت گرفت. برای اینکار از ناحیه ریزوسفر بوسیله کاردک استریل (با الکل 96 درجه وچراغ الکلی استریل شد) حدود 20 گرم خاک در داخل ظرف پتری دیش که قبلاً در آون استریل شده بودند ریخته شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. از نمونه خاک، 6 سری رقت (روش ده‌دهی) و هر سری در سه تکرار تهیه شد (Vincent,1970). رقت‌های تهیه شده از خاک به لوله‌های حاوی بذر جوانه زده یونجه در لوله‌های حاوی محیط شیبدار جامد Dillworth تلقیح شده و لوله‌هایی که گرهک در آنها تشکیل شده به عنوان لوله مثبت در نظر گرفته شد. پس از دو هفته نگهداری لوله‌های تلقیح شده در

اتاقک رشد، لوله‌های مثبت هر سری قرائت و MPN آنها با استفاده از جدول تعیین شد (Vincent, 1970).

نتایج

برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک در مناطق مورد مطالعه در جدول 1 و درجه گره بندی ریشه و جمعیت ریزوبیوم‌ها در خاک در جدول 2 آمده است. با توجه به نتایج حاصل، هر یک از خصوصیات فوق جداگانه مورد بررسی قرارگرفت. ابتدا همبستگی خصوصیات فوق با درجه گره‌بندی و جمعیت *سینوریزوبیوم* مورد بررسی قرار گرفته و سپس جهت تعیین سهم هریک از عوامل مؤثر، از روش رگرسیون گام به گام (استپ وایز) جلو رونده استفاده شد.

تغییرات pH خاک مناطق مورد مطالعه از 6/9 تا 8 بود و کمترین pH مربوط به منطقه داران وبیشترین آن مربوط به سمیرم می باشد. میانگین جمعیت *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (MPN) در یک گرم خاک مناطق فوق به ترتیب $70/8\times10^2$ و $17/4\times10^3$ تخمین زده شد. نتایج حاصل از بررسی ضرایب همبستگی ساده اثر اسیدیته خاک بر تعداد باکتریهای سینوریزوبیوم و درجه گره‌بندی ریشه نشان داد که اثر pH در این دامنه بر پارامترهای فوق معنی‌دار نمی‌باشد.(جدول2). EC اندازه‌گیری شده خاک در مناطق مورد مطالعه از 0/9 در منطقه شهرضا تا 4/4 دسی زیمنس در نائین گزارش شد. همچنین میانگین جمعیت باکتری‌های *سینوریزوبیوم* در این مناطق به‌ترتیب $87/2\times10^2$ و $1/7\times10^2$ در هر گرم خاک تخمین زده شد. نتایج حاصل از بررسی ضرایب همبستگی ساده، دال بر معنی‌دارشدن اثر بازدارندگی EC خاک بر تعداد باکتریهای ریزوبیوم (MPN) در سطح ده درصد می‌باشد. دامنه تغییرات درصد کربن آلی خاک در مناطق مختلف نمونه‌برداری شده از 0/42 درصد در منطقه نایین تا 1/38 درصد در منطقه نجف‌آباد می‌باشد. میانگین جمعیت باکتریهای *سینوریزوبیوم* در این مناطق به ترتیب $1/7\times10^2$ تا $23/9\times10^2$ تخمین زده شد. نتایج ضرایب همبستگی در این تحقیق نشان دهنده همبستگی مثبت درصد کربن آلی بر جمعیت *ریزوبیوم* (MPN) و درجه گره بندی در سطح احتمال 5 درصد می‌باشد که نشان دهنده اثر مثبت مواد آلی بر فعالیت‌های زیستی خاک می‌باشد. وومر (1988) نیز در تحقیقات خود معنی‌دار بودن اثر کربن آلی بر جمعیت باکتریها را مشاهده کرد (Woomer etal., 1988).

میزان ازت کل خاک از 0/04 در مناطق نایین و نطنز تا 0/13 در مناطق شهرضا و نجف‌آباد متغییر است. ضرایب همبستگی نتایج نشان داد که اثر ازت کل خاک بر درجه گره بندی و جمعیت *سینوریزوبیوم‌ها* در سطح 5 درصد در این تحقیق معنی‌دارشده است. این در حالی است که بررسی منابع حاکی از اثر بازدارندگی اشکال ترکیبی ازت بر تشکیل گره می‌باشد. میزان فسفر خاک از mg/kg 9/8 در شاهین شهر تا mg/kg 31/5 در داران متغییر بود. نتایج حاصل از بررسی ضرایب همبستگی نشان داد که اثر فسفر خاک با جمعیت *ریزوبیوم‌های* خاک در سطح یک درصد و با درجه گره‌بندی ریشه در سطح پنج درصد همبستگی مثبت داشته است . مقدار پتاسیم خاک نیز به میزان mg/kg 110 در منطقه اردستان تا mg/kg 312 در منطقه داران مشاهده شد. نتایج حاصله حاکی از همبستگی مثبت پتاسیم کل خاک با درجه گره بندی ریشه و جمعیت باکتریهای *ریزوبیوم* در سطح یک درصد می‌باشد.

درصد رس خاک مناطق نمونه‌برداری شده از 24/1 درصد مربوط به منطقه فلاورجان تا 44/3 درصد مربوط به منطقه اردستان می‌باشد. براساس جدول ضرایب همبستگی، تأثیر درصد رس خاک بر تعداد باکتریهای *سینوریزوبیوم* در مناطق مورد مطالعه معنی‌دار نمی‌باشد. لاوسون و همکاران نیز بر این عقیده‌اند که اثر رس خاک مناطق کامدن استرالیا بر تعداد باکتریهای *ریزوبیوم لگومینوزاروم* در واحد حجم خاک معنی‌دار نمی‌باشد (Lawson et al., 1987) وزن مخصوص ظاهری خاک در مناطق مورد مطالعه از مقادیر 1/18 گرم بر سانتی‌متر مکعب در منطقه شهرضا تا 1/51 گرم بر سانتی‌متر مکعب در منطقه نایین می‌باشد. براساس ضرایب همبستگی ساده، این خصوصیت خاک با درجه گره‌بندی ریشه وجمعیت *سینوریزوبیوم* خاک همبستگی منفی در سطح 5 درصد داشته است، بنابراین می‌توان انتظار داشت در خاکهایی که وزن مخصوص ظاهری کمتری دارند، جمعیت باکتریها بیشتر باشند. در بسیاری از مناطق مورد بررسی و پس از هر چین، مزارع یونجه در معرض چرای دام قرار می‌گیرد. این مسئله بعد از آخرین چین تقریباً در اکثر نقاط استان مرسوم است و یکی از دلایل فشرده شدن خاک محسوب می‌گردد.

براساس ضرایب همبستگی ساده بدست آمده بین خصوصیات مختلف خاک و درجه گره‌بندی ریشه و جمعیت ریزوبیومها، پارامترهایی مثل وزن مخصوص ظاهری خاک و میزان فسفر و پتاسیم خاک، اثرات معنی‌دارتری از خود نشان دادند. معادله استپ وایز بین مقادیر پتاسیم (mg/kg) و وزن مخصوص ظاهری (g/cm^3) و جمعیت ریزوبیوم‌ها به روش MPN با استفاده از آنالیر رگرسیون چند مرحله‌ای بصورت ذیل محاسبه گردید

(جدول4) (Y نمایانگر جمعیت ریزوبیومها در یک گرم خاک می‌باشد.)

Y= 14421/882+33/330K-13573/685BD

براساس داده‌های فوق، مقدار پتاسیم خاک اثر مهمی برگره‌بندی ریشه و جمعیت ریزوبیوم‌ها دارد. اثر پتاسیم بر همزیستی لگوم‌ریزوبیوم بصورت غیر مستقیم و از طریق تأثیر بر فیزیولوژی گیاه میزبان می‌باشد. نقش مهم پتاسیم عمدتاً در فتوسنتز، انتقال مواد هیدروکربنی، تشکیل ترکیبات ازته و تبدیل آنها به پروتئین است. به نظر می‌رسد که پتاسیم از طریق افزایش ذخیره هیدرات‌های کربن در گره‌های ریشه‌ای و متعاقباً افزایش انرژی قابل استفاده جهت احیاء و جذب ازت ، نقش مفیدی بر تثبیت ازت داشته باشد (Collins etal., 1986).

از طرفی، آنالیز رگرسیون چند مرحله‌ای نشان داد که فسفر نیز تأثیر معنی‌داری بر جمعیت ریزوبیوم دارد (جدول5). معادله استپ وایز بین مقادیر فسفرخاک (mg/kg) و جمعیت ریزوبیوم‌ها با استفاده از آنالیز رگرسیون چند مرحله‌ای بصورت زیر محاسبه گردید. (Y نمایانگر جمعیت ریزوبیومها در یک گرم خاک و فسفر برحسب mg/kg می باشد)

Y=3491652+47156011P

کمبود فسفر یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تثبیت ازت مولکولی محسوب می‌شود. گیاهانی که قادر به تثبیت ازت مولکولی هستند، در مقایسه با گیاهان مصرف کننده ازت معدنی، به مقادیر بیشتری از عنصر فسفر نیازمندند. این نیاز شدید به فسفر نشان دهنده نقش حیاتی آن در انتقال انرژی در تثبیت ازت می‌باشد (Leung and Bottomely , 1987). فسفر در گره بندی، تعداد، حجم و وزن گره، رشد گیاهان میزبان و فرآیند تثبیت اثر داشته و در صورت وجود مقادیر کافی فسفر در گیاه، تثبیت ازت مولکولی به سرعت شروع شده و با افزایش میزان این عنصر در گیاه، مقدار ازت نیز افزایش می‌یابد (Sprent, 1990).

بحث

ازآنجایی که بررسی عوامل پایداری سیستم همزیستی لگوم-ریزوبیوم فراتر از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک می‌باشند، بعضی فاکتورهای دیگر نیز در این تحقیق مورد توجه قرار گرفت. جنبه‌های مختلف مدیریت کاشت، داشت و برداشت یونجه نیز بر کارآیی همزیستی مؤثر هستند. یکی از مهمترین فاکتورهای پایداری یونجه، عمق کاشت بذر است. عمق مناسب کاشت بذر با بافت خاک تفاوت می‌کند. اسمیت (1999) معتقد است برای گره زنی بهتر ریشه یونجه، عمق کاشت بذر باید بین 0/6 تا 1/3 سانتیمتر در خاکهای سنگین و 1/3 تا 3/8 سانتیمتر در خاکهای سبک باشد. عمق زیاد کاشت باعث ایجاد محدودیت جوانه زنی می‌شود. در بسیاری از مناطق مورد مطالعه، کاشت بذر بدون رعایت موارد فوق انجام می‌گیرد. همچنین بهترین تراکم کاشت بذر، 11 تا 20 کیلوگرم در هکتار اعلام شده است (Smith and Beek, 1999). اسپرنت (1990)، معتقد است از تکنیک‌هایی که می‌توان توسط آن ذخیره فتوسنتز یونجه و نتیجتاً کارآیی تثبیت ازت را بالا برد، کاهش تراکم گیاه و افزایش نوردهی آن است. او معتقد است برای آنکه یک لگوم بتواند با بازده خوب و مؤثر تثبیت ازت کند باید فتوسنتز کافی داشته باشد. برای این کار گیاه نیاز به عملکرد مناسب، سطح برگ، نورو CO_2 کافی داشته و انتقال مواد حاصل از فتوسنتز به گره‌ها با راندمان بالا صورت گیرد. (Sprent, 1990).

مدیریت کود دهی مزارع یونجه نیز در استقرار یونجه و تشکیل گره‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. رشد یونجه به طور مستمر باعث تخلیه عناصر غذایی خاک می‌شود. هر تن یونجه خشک برداشت شده شامل 23 کیلوگرم ازت، 5 کیلوگرم فسفر (P2O5) و 30 کیلوگرم پتاسیم (K2O) می‌باشد. برای تعیین وضعیت عناصر غذایی خاک بویژه فسفر، آزمون خاک بصورت سالیانه و حداقل دو ماه قبل از کاشت الزامی است. این کار، زمان لازم برای کسب نتایج آزمایش خاک را فراهم کرده و باعث در آمیختن کافی کود در خاک می‌شود. اگرچه رشد یونجه بستگی به نیتروژن قابل استفاده خاک قبل از تشکیل گره‌های ریشه دارد که باید با مصرف ازت استارتر تأمین گردد اما مصرف ازت زیاد در هنگام کاشت زیان آور می‌باشد زیرا از گره بندی جلوگیری شده و رقابت علف‌های هرز را نیز تشدید می‌کند. از آنجایی که فسفر در خاک براحتی حرکت نمی‌کند، افزودن فسفر به لایه شخم وهمچنین بصورت سرک در زمان بروز کمبود لازم است. پتاسیم خاک نیز بویژه درخاکهای با بافت سبک باید تأمین شود. پتاسیم مستقیماً بر فعالیت گره‌ها مؤثر است و بطور غیر مستقیم در فتوسنتز دخالت دارد. یونجه همچنین نیازمند گوگرد می‌باشد که بخصوص در خاکهای با مواد آلی کم باید استفاده

شود. منیزیم، روی، آهن، منگنز، مس، بور و مولیبدن (در صورت کمبود) نیز برای رشد یونجه و ایجاد شرایط مناسب برای تثبیت ازت باید تأمین گردد. در تمام مناطق مورد مطالعه، مدیریت کوددهی مزارع یونجه، محدود به استفاده زیاد اوره یا نیترات آمونیم می‌باشد که از دلایل مهم پایین بودن کارآیی تثبیت ازت می‌باشد. تو و فورد (1984) مشاهده کردند که ویروس‌های یک گیاه آلوده، از طریق ترشحات ریشه‌ای، گره‌های تثبیت ازت را تحت تأثیر قرار می‌دهند. همچنین گزارشاتی حاکی از اثر قارچهای پاتوژن بر گره‌های ریشه‌ای وجود دارد. از طرفی گره‌های ریشه لگوم‌ها توسط انواع لاروها و نماتد های مختلف مورد حمله قرارمی‌گیرد (Tu and Ford, 1984) بنابراین منطقی بنظر می‌رسد که زمین اختصاص یافته برای مزارع یونجه عاری از عوامل بیماریزا باشد و محصول قبلی نیز از این نظر، پیشینه سالمی داشته باشد. از طرف دیگر استفاده از سموم شیمیایی به منظور مبارزه با آفاتی همچون شته‌ها و سرخرطومی و بیماری‌هایی مثل پژمردگی باکتریایی در تمام مزارع یونجه معمول می‌باشد. استفاده از سموم مختلف، نه تنها موجب آسیب رساندن به فلور میکروبی و ریزوبیوم‌های بومی خاک می‌گردد، بلکه باقیمانده سموم باعث اختلال در ترکیب سیگنال های شیمیایی ریشه یونجه می‌شود. از این رو استفاده از روشهایی مثل انتخاب واریته‌های مقاوم و یا کنترل بیولوژیکی باید بیشتر مد نظر قرار گیرد (Sprent,1990). در تمام مناطق مورد مطالعه این پژوهش، کشاورزان یونجه‌کار با اهداف تغذیه دام، تسطیح زمین و سم‌کوب کردن زمین و مبارزه با آفات، اقدام به چرانیدن گوسفند و یا گاو برروی زمین یونجه می‌کنند. این عمل علاوه بر فشردن خاک، باعث از بین رفتن طوقه یا جوانه یونجه شده، فتوسنتز گیاه را از بین می‌برد و موجب انتقال عوامل بیماریزای گیاهی از مزرعه‌ای به مزرعه دیگر شده و اضافه شدن حجم زیاد ادرار دام به خاک، باعث می‌شود که خاک در حالت اشباع کاذب ازت قرار گرفته، توانایی گیاه برای تثبیت ازت را کاهش دهد. گیبسون (1977) اعلام کرد که چین زیاد و چرانیدن دام در مزرعهٔ یونجه نه تنها باعث کندی شدید فعالیت گره‌های ریشه می‌گردد بلکه گاهی موجب ریزش گرهها نیز می‌شود (Gibson, 1977). در مجموع باید گفت که تعدادی از بقولات در بعضی از خاکها به اندازه کافی گره تولید نمی‌کنند (کیلهام، 1977). به نظر می‌رسد که این خاکها اغلب محتوی تعداد کمی از باکتری‌های مؤثر باشند، و بیش از نیمی از جمعیت، تأثیر متوسط یا کمی دارند. اگر چه از نظر اصول صحیح اکولوژیکی، جمعیت میکروبی بومی خاک در مقایسه با اغلب مایه‌های تلقیحی باید بهتر به شرایط ویژه خاک سازگار شود، استفاده از مایه تلقیحی که دارای تعداد بیشتری باکتری هست، می‌تواند مؤثرتر از جمعیت باکتری‌های بومی باشد. واکنش گیاه زراعی به روش‌های مختلف تلقیح سینوریزوبیوم، زمانی زیاد است که در محل برای اولین بار بقولات کشت شوند.

جدول1- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مناطق مورد بررسی

منطقه	EC dS/m	pH	OC %	N %	P Mg/kg	K Mg/kg	Clay %	BD g/cm^3
	1/8	7/2	0/55	0/05	18/4	220	40/1	1/42
کبوترآباد	2/7	7/6	0/62	0/06	10/3	130	38/2	1/40
	2/9	7/4	0/72	0/07	12/2	175	42/3	1/32
	4/2	7/8	0/51	0/05	15/3	112	40/2	1/44
نایین	2/7	7/2	0/52	0/05	18/4	120	36/3	1/45
	4/4	7/9	0/42	0/04	10/2	137	40/5	1/51
	3/4	7/3	0/48	0/05	28/5	230	42/6	1/37
نجف‌آباد	1/1	7/7	1/38	0/13	29/2	180	40/5	1/20
	2/2	7/7	0/68	0/07	20/8	185	33/4	1/23
	1/1	7/4	0/82	0/08	29/5	290	40/8	1/32
شهرضا	0/9	7/7	1/03	0/10	30/4	175	32/6	1/18
	1/8	7/5	1/26	0/13	23/6	275	32/2	1/21
	1/9	7/2	1/01	0/10	22/3	310	38/6	1/35
داران	1/8	6/9	0/77	0/08	28/8	290	40/3	1/40
	2/1	7/4	0/92	0/09	31/5	312	40/0	1/28
	2/2	7/5	0/87	0/09	22/2	295	40/2	1/34
شاهین شهر	3/3	7/9	1/02	0/10	09/8	145	28/6	1/30
	1/8	7/7	0/95	0/10	18/6	185	36/2	1/38
	3/8	7/9	0/52	0/05	12/7	195	39/2	1/42
سمیرم	1/6	8/0	0/55	0/05	22/6	224	38/5	1/40
	2/9	7/7	0/68	0/07	10/8	270	42/5	1/40
	3/2	7/5	0/72	0/07	18/3	185	35/5	1/42
اردستان	4/1	7/9	0/95	0/10	15/3	180	40/5	1/31
	2/7	7/9	0/90	0/09	10/6	110	44/3	1/36
	3/1	7/4	0/55	0/06	12/2	212	28/2	1/41
نطنز	2/2	7/8	0/82	0/08	18/6	136	33/6	1/32
	1/2	6/9	0/45	0/04	13/6	118	24/8	1/40
	2/1	7/5	0/58	0/06	14/2	220	35/2	1/43
فلاورجان	3/1	7/4	0/73	0/07	22/8	160	24/1	1/39
	3/3	7/2	0/85	0/08	18/5	120	24/3	1/35

جدول 2- درجه گره‌بندی ریشه یونجه و جمعیت باکتریهای *سینو ریزوبیوم ملیلوتی* در خاک مناطق مورد مطالعه

منطقه	درجه گره بندی *	جمعیت باکتری‌ها به روش**MPN
	2	$2/3\times10^2$
کبوترآباد	2/5	$9/2\times10^2$
	1/5	$4/2\times10^2$
	1	$1/5\times10^2$
نایین	2	$1/5\times10^2$
	1/5	$2/3\times10^2$
	3	$42/4\times10^2$
نجف‌آباد	2	$14/7\times10^2$
	2/5	$14/7\times10^2$
	3	$91/8\times10^2$
شهرضا	2/5	$23/0\times10^2$
	3	$14/7\times10^3$

	2/5	$23/0\times10^2$
داران	2	$42/4\times10^2$
	3/5	$14/7\times10^3$
	2	$14/7\times10^2$
شاهین شهر	2/5	$4/2\times10^2$
	2/5	$23/0\times10^2$
	2	$14/7\times10^2$
سمیرم	1/5	$23/0\times10^2$
	2/5	$14/7\times10^2$
	3	$42/4\times10^2$
اردستان	1/5	$9/2\times10^2$
	2/5	$9/2\times10^2$
	2	$9/2\times10^2$
نطنز	2	$2/3\times10^2$
	1	$9/2\times10^2$
	1/5	$14/7\times10^2$
فلاورجان	2	$4/2\times10^2$
	2	$4/2\times10^2$

*- Vincent 1988

** - در یک گرم خاک

جدول3- ضرایب همبستگی ساده تعیین شده بین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و درجه گره‌بندی و جمعیت *ریزوبیومها*

پارامترها	EC dS/m	pH	OC	N	P	K	Clay %	BD g/cm3
			%		Mg/kg			
درجه گره بندی ریشه	-0/22	-0/04	0/41*	0/43*	0/43*	0/46**	0/16	-0/41*
جمعیت *سینوریزوبیوم*(MPN)	-0/32*	-0/16	0/37*	0/39*	0/56**	0/62**	0/20	-0/40*

**و * -بترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد معنی‌دار است.

جدول4- آنالیز رگرسیون چند مرحله‌ای بین جمعیت ریزوبیومها (MPN)،BD,K خاک

مرحله	متغیر وارد مدل شده	R^2 پارشال	R^2 مدل	F
1	K	0/386	0/386	17/672**
2	BD	0/076	0/463	3/845*

**و * -بترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد معنی‌دار است.

جدول5- آنالیز واریانس چند مرحله‌ای بین جمعیت ریزوبیومها و فسفر خاک

مرحله	متغیر وارد مدل شده	R^2 پارشال	R^2 مدل	F
1	**P**	0/331	0/331	13/876**

**-درسطح یک درصد معنی‌دار است.

فهرست منابع:

1. بی نـام. 1380.آمـارنامـه کشـاورزی اسـتان اصـفهان. معاونـت طـرح و برنامـه ، سـازمان جهـاد کشـاورزی اسـتان اصفهان.
2. کیلهام، کن. 1997. بوم شناسی خاک. ترجمه عوض کوچکی.(1376). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.
3. Alexander, M. 1982. Ecology of *Rhizobium*. Biological nitrogen fixation. Academic Publisher, pp. 39-50.
4. Balasunhramanian, V. and K. Sinha. 1976. Effect of salt stress on growth, nodulations and nitrogen fixation in cowpea and mungbean. Plant Physiol, 36:197-200.
5. Biederbeck, V. O., H. A. Bjorge, S.A. Brandt, and J.L. Henry. 1995. Soil improvement with legumes including legumes in crop rotation. Canada-Saskatchewan Agreement on Soil Conservation.
6. Boreleau, L. M. and S. T. D. Prevest. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. Plant and Soil, Vol. 161:115-125.
7. Collins, M., D. J. Lang and K. A. Kelling. 1986. Effects of phosphorus, potassium and sulfur on alfalfa nitrogen fixation under field condition. Agron. J. 78: 959-963.
8. Dazzo, F. B.and W. J. Brill. 1978. Regulation by fixed nitrogen of host symbiont recognition in the *Rhizobiom*-clover symbiosis. Plant Physiol, Vol. 62:18-20.
9. Eayleshan, A. R., J. S. Hassouna and F. Seegars. 1983. Fertilizers-N effect on N_2 fixation by cowpea and soybean. Agron. J. Vol. 75, pp. 61-66.
10. Feigfnbaum, S. and D. Mengel.1979. The effect of reduced light intensity and sub-optimal potassium supply on N_2-fixation and N turn over in rhizobium-infected lucerne. Physiol. Plant, 45:245-249.
11. Gibson, A. H. 1977. The influence of the environmental and managerial practices on the *Legume-Rhizobium* symbiosis. John Wiley and Sons. pp. 394-450.
12. Gibson, A.H. 1971. Factors in the physical and biological environment affecting nodulation and nitrogen fixation by legumes. Plant and Soil. Special, 2:139-152.
13. ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) 1993. Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual No.19, Aleppo, Syria.
14. Keck, T. J., P. Wagnet, W. F. Compbell, and R. E. Knighton. 1984. Effect of water and salt stress on growth and acetylene reduction in alfalfa. Soil. Sci. Soc. Am. J., 48:1310-1315.
15. Lawson, K. A., Y. M. Barnet and C. A. McGilehrist.1987. Environmental factors influencing numbers of *Rhizobium legominosarum* biovar trifolii and its bacteriophages in two fields' soils. Appl. Environ. Microbiol. 53:1125-1131.
16. Leung, K. and P. Y. Bottomley. 1987. Influence of phosphate on the growth and nodulation characteristic of *Rhizobium trifolii*. Appl. Environ. Microbiol., 53:2098-2105.
17. Lindemann, W.C. and C.R. Glover.2003. Nitrogen fixation by legumes. Guide A-129. New Mexico state university.
18. Roughley, R. J. and P. J. Dart. 1970. Root temperature and root hair infection of *trifolium subteraneum*. Plant and Soil, 32:518-520.
19. Schubert, S. 1995. Nitrogen assimilation by legumes processes and ecological limitation. Fertilizers Research, 23: 222-226.
20. Smith, D. H. and G. K. Beck.1999. Alfalfa: production and management No. 703. Colorado State University Cooprative Extention.
21. Sprent, Janet I. 1990. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall.

22. Tu, J.C. and R. E. Ford. 1984. Plant virus intraction in nitrogen-fixing nodules. Zeit. Fur pflantenkrank heiten, 91: 200-212.
23. Valssak, k.m.and J. Vanderleyden. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant *rhizobia*. Crit Rev. Plant. Sci. 16:163-229.
24. Vance, C. P., and P. H. Graham. 1997.16th. North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference.
25. Vincent, J. M. 1982. Enumeration and determination of growth. Pp.35-45 in Vincent, J. M.(Ed). Nitrogen Fixation in Legumes. Wiley, Sydney.
26. Wood, M., J. E. Cooper and A. J. Holding. 1984. Aluminum toxicity and nodulation of trifolium response. Plant and Soil, 8:381-391.
27. Woomer, P. L., P. W. Singleton and B.B. Bohlool. 1988. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. Appl. Environ. Microbiol. 54: 1112-1116.
28. Yousef, A. W., A. S. Al-Nassiri, S.k. Al-Azawi and N. Abdul Hossain. 1987. Abundance of peanut rhizobia as affected by environmental factors. Soil Biol. Biochemo 19:319-396.