261-277/Journal of Soil Biology Vol. 12, No. 2, 2025

Publisher: Soil Science Society of Iran

Soil Biology Journal

https://sbj.areeo.ac.ir/

Research article

Screening and identification of the most effective rhizobial isolate (*Mezorhizobiumciceri*)and investigating its interaction with arbuscular mycorrhizal fungus in the yield and quality of chickpea seeds of Anna

Mehrzad Ansari[1], Mohammad Jafar Malakouti[2]*, Farhad Rejali[3], Ali Mokhtassi Bidgoli[4] and Saber Golkari[5]

[1] PHD student of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; M_ansari@modares.ac.ir
[2] Professor of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Mjmalakouti@modares.ac.ir
[3] Professor of Soil Biology and Biotechnology Department, Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; Frejali@yahoo.com
[4] Associate Professor of Agronomy Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran; Mokhtassi@modares.ac.ir
[5] Associate Professor of Genomics Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran; Sgolkari@yahoo.com

Article Info

Received:
October5,2024
Accepted:
April 12, 2025

Keywords:
Chickpea seed quality, *Chickpea yield*, Cicer arietinum L., *Nitrogen fixing rhizobium*, Rhizophagusintraradices

Corresponding author's email:ansari_mehrzad@yahoo.com

DOI:10.22092/SBJ.2025.367013.270

Extended Abstract

Background and objective:
Legumes are one of the most important vegetable sources rich in protein and the second most important human food source after cereals. 64% of the cultivated area of legumes in Iran is related to the cultivation of chickpeas, which ranks third among the crops in terms of cultivated area, after wheat and barley. Chickpeas are often cultivated in dry conditions and the yield of this crop in Iran is very low compared to the global average yield of chickpea producing countries. Waterdeficit is one of the important factors that reduce the yield of this plant.The present study has identified the most effective nitrogen-fixing rhizobium bacterium for chickpea of Anna variety and investigated its interaction with arbuscular mycorrhizal fungus (Rhizophagusintraradices) in the yield and quality of chickpea seeds.

Material and Methods:
This project was done in three stages: In the first stage, 53 rhizobium isolates available in the microbial collection of the Soil and Water Research Institute of Iran were cultured. The second phase of the project was a greenhouse, which was carried out in two phases: the purpose of the first phase of this stage was to determine the most effective rhizobium bacteria symbiotic with the pea plant (Anna cultivar). For this purpose, rhizobium isolates were inoculated into chickpea plants and subjected to the plant contamination test. After about a month, the presence or absence of nodules on the roots of chickpea seedlings was checked. The isolates that were able to form nodules on the chickpea root system were transferred to the next phase. In the second phase of the second stage, during another greenhouse test and in comparison with

specific levels of nitrogen, the molecular stabilization ability of the selected isolates using leonard jar containers and then measuring the amount of nitrogen by the Keldahl method as well as measuring the acetylene reduction process. Among the tested, the isolates which had the best result, was transferred to the next phase. The third (final) stage of the research was carried out in the fields of Sararood rain research station in the cropping season of 1400-1401. Chickpea cultivation in this area is done in a rainfed manner. In this factorial experiment, in the form of randomized complete block design, The first factor, fungal treatment in two levels of inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus and without arbuscular mycorrhizal fungus. The second factor, bacterial treatment at two levels of inoculation with C-110 bacteria and without bacteria. The third factor was the levels of chemical fertilizers in two levels without fertilizer and optimal fertilizer consumption (50 kg/ha of urea before planting, 50 kg/ha of urea and 25 kg/ha of potassium sulfate containing zinc chelate in the form of side-dressing fertilizer in the spring season).The seed inoculation method was used to use mycorrhizal fungi and rhizobium bacteria. After the growth period, grain yield, biomas, number of side branches per plant and quality of chickpea seeds were measured.

Results:

Among the 53 isolates of rhizobium, 42 isolates were able to form nodules on the chickpea root system, and after testing the second phase of the second stage, isolate C-110 had the best result and was transferred to the next phase. The results of the third stage showed that the application of mycorrhizal bacteria, rhizobium C-110 and fertilizer, increased grain yield, biomas, number of side branches per plant and grain quality (nitrogen, phosphorus and zinc) in Sararood research stations.

Conclusion:

The general results of this research indicated that although the waterdeficit in rainy conditions caused a decrease in the examined traits, the use of microorganisms (arbuscular mycorrhizal fungus and rhizobium C-110 bacteria) could reduce the negative effect of Waterdeficit and In the regions of the country where legumes are grown and there is water stress, the use of these two microorganisms can reduce the negative effects of water stress, and since climate change and some agricultural management practices, such as tillage and excessive use of chemical fertilizers, in have played a role in the destruction of soil fertility, these microorganisms can be used for ecosystem health and increasing productivity in agriculture. It is obvious that the symbiosis of mycorrhizal fungi and rhizobium bacteria in each stress and each plant should be investigated separately in order to be able to identify the appropriate species for those conditions so that plants can be helped by the correct use of this triple symbiosis. In other words, the condition for effective symbiosis is the existence of a completely efficient and specific bacterial isolate for the host plant And it should be provided in sufficient quantity from the initial stages of growth. But in general, it can be said that the symbiosis between mycorrhizal fungi and rhizobium bacteria in legumes improves plant growth and makes plants more tolerant of living and non-living stresses. The efficiency potential of these materials will be revealed when all agricultural operations are carried out at the right time and place with the help of appropriate tools.

Cite this article: Ansari, M., Malakouti, M.J., Rejali,F., MokhtasiBidgoli,A., Golkari,S.,2025. Screening and identification of the most effective rhizobial isolate (Mezorhizobiumciceri)and investigating its interaction with arbuscular mycorrhizal fungus in the yield and quality of chickpea seeds of Anna. Soil Biology, 12 (2),261-277.

DOI:10.22092/SBJ.2025.367013.270
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصلنامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

غربالگری و شناسایی مؤثرترین جدایه‌ی ریزوبیومی (*Mezorhizobiumciceri*) و بررسی برهمکنش آن با قارچ میکوریز آربسکولار در عملکرد و کیفیت بذر نخود رقم آنا

مهرزاد انصاری[۱]، محمدجعفر ملکوتی*[۲]، فرهاد رجالی[۳]، علی مختصی بیدگلی[۴]، صابر گلکاری[۵]

[۱] دانشجوی دکتری گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ M_ansari@modares.ac.ir

[۲] استاد گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ Mjmalakouti@modares.ac.ir

[۳] استاد بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ Frejali@yahoo.com

[۴] دانشیار گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ Mokhtassi@modares.ac.ir

[۵] دانشیار بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران؛ Sgolkari@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۳/۷/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۴/۱/۲۳

چکیده

نخود، از مهم‌ترین منابع گیاهی غنی از پروتئین است و غالباً در شرایط دیم کشت می‌شود. ریزوبیوم‌ها و قارچ‌های میکوریز، از همزیست‌های مهم گیاه هستند و می‌توانند باعث افزایش محصول در گیاهان شوند. مطالعه‌ی حاضر، مؤثرترین باکتری ریزوبیوم تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن برای نخود (*Mezorhizobiumciceri*)رقم آنا را شناسایی کرده و اثر متقابل آن با قارچ میکوریز آربسکولار (*Rhizophagusintraradices*) در عملکرد و کیفیت بذر نخود را مورد بررسی قرارداده‌است. این تحقیق در سه مرحله انجام شد: در مرحله‌ی اول، ۵۳ جدایه‌ی ریزوبیوم کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، کشت داده‌شدند. مرحله‌ی دوم تحقیق، گلخانه‌ای بود که در دو فاز انجام شد: در فاز اول، گیاه نخود (رقم آنا)، تحت آزمون آلوده‌سازی با باکتری‌های ریزوبیوم قرارگرفت که ۴۲ ایزوله ایجاد گرهک کردند. در فاز دوم، بااستفاده از جار لئونارد، توانایی تثبیت مولکولی ایزوله‌هایی که در فاز اول ایجاد گرهک کرده‌بودند، سنجیده‌شده و بهترین ایزوله (ایزوله‌ی C-110) انتخاب شد. مرحله‌ی سوم تحقیق، در مزارع ایستگاه تحقیقات دیم سرارود در فصل زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ به‌صورت دیم اجرا شد. در این آزمایش فاکتوریل، در قالب طرح بلوک کامل تصادفی، فاکتور اول، تیمار قارچی در دو سطح تلقیح با قارچ و فاقد قارچ، فاکتور دوم، تیمار باکتریایی در دو سطح تلقیح با باکتری(C-110) و فاقد باکتری و فاکتور سوم، سطوح کود شیمیایی در دو سطح فاقد کود و مصرف بهینه‌ی کود بود. پس از برداشت، نتایج نشان داد استفاده از ریزجانداران مانند قارچ میکوریز و باکتری ریزوبیوم (جدایه‌ی کاملاً کارآمد و اختصاصی برای هر رقم)و توصیه‌ی بهینه‌ی کودی در شرایط دیم می‌تواند باعث افزایش بیومس، عملکرد، تعداد شاخه‌های فرعی در بوته و کیفیت دانه (غلظت نیتروژن، فسفر و روی دانه) شود و از استفاده‌ی بیش از حد از کودهای شیمیایی که باعث تخریب حاصلخیزی خاک می‌شوند، جلوگیری کند.

واژه‌های کلیدی: ریزوبیوم‌های تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن، کیفیت بذر نخود، عملکرد دانه‌ی نخود، *Cicer arietinum* L.، *Rhizophagusintraradices*.

استناد: انصاری،م.، ملکوتی،م.ج.، رجالی،ف.، مختصی بیگدلی،ع.، گلکاری،ص.،۱۴۰۴. غربالگری و شناسایی مؤثرترین جدایه‌ی ریزوبیومی (*Mezorhizobiumciceri*)و بررسی برهمکنش آن با قارچ میکوریز آربسکولار در عملکرد و کیفیت بذر نخود رقم آنا. نشریه زیست شناسی خاک(۲)۱۲، ۲۷۷-۲۶۱

مقدمه

حبوبات از مهم‌ترین منابع گیاهی غنی از پروتئین و دومین منبع مهم غذایی انسان بعد از غلات به‌شمار می‌رود. ۶۴ درصد از سطح زیرکشت حبوبات در ایران، به کشت نخود اختصاص داده‌شده‌است که در بین محصولات، از نظر سطح زیر کشت، بعد از گندم و جو، رتبه‌ی سوم را دارا می‌باشد. نخود غالباً در شرایط دیم کشت شده و عملکرد این محصول در ایران نسبت به میانگین عملکرد جهانی کشورهای تولیدکننده‌ی آن، بسیار پایین است. تنش کم‌آبی، یکی از عوامل مهم کاهش‌دهنده‌ی محصول در این گیاه است (Sabbaghpour et al., 2006).

طی چند دهه‌ی اخیر، استفاده از واریته‌های پر محصول سبب افزایش سطح تولیدات کشاورزی شدهو به موازات آن، مصرف کودهای شیمیایی علاوه بر مشکلات اقتصادی، افزایش خطر آلودگی خاک و آب را به همراه داشته‌است. به‌هم خوردن تعادل جامعه‌یزیستی خاک از دیگر اثرات منفی کودهای شیمیایی است که خسارت زیادی به اکوسیستم های کشاورزی واردمی‌سازد. یکی از راه‌های مقابله با این مشکلات، به‌کارگیری هرچه بیشتر از نهاده‌های درون مزرعه‌ای سازگار با محیط زیست از جمله استفاده از نهاده‌های مفید زیستی، به‌ویژه انواع حاوی ریزجانداران همزیست با گیاهان است.

ریزوبیوم‌ها و قارچ‌های میکوریزی نوع آربسکولار، دو همزیست مهم گیاه هستند. ریزوبیوم‌ها، مشهورترین باکتری تثبیت‌کننده‌ی نیتروژن مولکولی موجود در اتمسفر هستند که آن را به شکل قابل جذب در اختیار گیاه میزبان قرارمی‌دهند. این باکتری‌ها، آندوفیت طبیعی لگوم‌ها و جزوگروهی از باکتری‌ها با نام ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) می‌باشند (Soumare et al., 2015). در سرتاسر جهان در حدود ۱۷۰۰۰ تا ۱۹۰۰۰ گونه لگوم وجوددارد. این درحالی است که تنها تعداد کمی از باکتری‌های همزیست این گیاهان شناسایی شده‌اند. در اغلب موارد رابطه‌ی همزیستی بین باکتری‌های خانواده‌ی *ریزوبیاسه* و لگوم‌ها به صورت اختصاصی است. بدین معنا که گونه‌های باکتریایی تنها با میزبان اختصاصی خود رابطه برقرار می‌کنند و باعث تثبیت نیتروژن مولکولی می‌شوند (Soumare et al., 2015).

قارچ‌های میکوریزی جزو ریزجانداران فراگیر خاک هستند که با بیش از ۸۰ درصد گونه‌های گیاهی رابطه‌ی همزیستی برقرارمی‌کنند (Soumare et al., 2015; Rejali, 2018). اهمیت قارچ‌های میکوریز در اکثر اکوسیستم‌ها به واسطه‌ی فوایدی نظیر افزایش سطح جذب ریشه، افزایش رشد، مقاومت به بیماری‌های خاکزاد، حفظ خاکدانه‌ها، افزایش تاب‌آوری اکوسیستم‌ها دربرابر تنش‌های محیطی از جمله خشکی و نیز بهبود چرخه‌ی میکروبی و عناصر معدنی در خاک است (Allosh et al., 2000; Larimer et al., 2014; Volpiano et al., 2018). افزایش کارایی مصرف آب و افزایش جذب عناصر غذایی در دو واریته‌ی مقاوم و حساس به تنش کم‌آبی درگندم مورد بررسی قرارگرفت و نتایج نشان داد که قسمت عمده‌ی کاهش وزن ایجاد شده‌ی ناشی از تنش رطوبتی، از طریق برقراری همزیستی میکوریزی قابل جبران می‌باشد(Pellegrino et al., 2015).هیو همکاران (He et al., 2019) بیان کردند که استفاده از قارچ میکوریزی نوع آربسکولار می‌تواند تحمل گیاه به خشکی را به دلیل افزایش کلونیزاسیون ریشه، افزایش یا کاهش بیان ژن‌هایی که بر نفوذپذیری غشا أثر دارند، افزایش پتانسیل آب برگ و افزایش میزان آبسزیک اسید در گیاه افزایش دهد.

بهره‌گیری از رابطه‌ی همزیستی گیاه با قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن نیز یکی از راهکارهای افزایش عملکرد گیاه به‌خصوص در شرایط کمبود آب می‌باشد. اسمیت (Smith, 2002) بیان کرد برقراری رابطه‌ی همزیستی در گیاهان لگوم با ریزوبیوم‌ها در صورت حضور قارچ‌های میکوریزی، به‌دلیل تأمین بهتر فسفر و سایر عناصر معدنی مورد نیاز گیاه، به نحو مطلوب‌تر و با کارایی بهتری به گیاه میزبان کمک می‌نماید. ایجاد رابطه‌ی همزیستی در ریشه‌های گیاهان لگوم توسط قارچ‌های میکوریزی، شرایط را برای گره‌زایی باکتری‌های

ریزوبیوم مساعد می‌کند، در نتیجه، تعداد گره‌ها در گیاهان میکوریزی نسبت به گیاهان غیرمیکوریزی بیشتر است(Benami et al., 2020). بنابراین برقراری یک رابطه‌ی همزیستی سه‌جانبه بین قارچ‌های میکوریزی، ریزوبیوم و گیاه، شرایط مساعدتری را برای افزایش رشد و عملکرد گیاهان لگوم به‌وجود می‌آورد (Denison & Kiers, 2011). رابطه‌یهم‌افزاییدر همزیستی نخود، ریزوبیوم و قارچ در شرایط تنش کمبود آب، سبب افزایش گره‌زایی، تثبیت نیتروژن و محصول‌دهی می‌شود (Yadav, 2020). البته واکنش گیاه میزبان به گونه‌های مختلف قارچ و ایزوله‌های باکتری موجود در یک گونه متغیر است(Yadav et al., 2007). توسلی و همکاران (Tavassoli et al., 2017) نشان دادند این همزیستی سه‌گانه باعث افزایش جذب عناصر نیتروژن، فسفر، روی، آهن و مس در گیاه شد. همچنین مرادی و همکاران (Moradi et al., 2018) بیان کردند که کاربرد باکتری‌های ریزوبیوم و قارچ‌های میکوریز در گیاه نخود، اثر معنی‌داری بر غلظت عناصر پتاسیم، نیتروژن و فسفر ریشه و اندام هوایی داشت.

فرضیه‌ی مطالعه‌ی حاضر این است که همزیستی بین باکتری‌های ریزوبیوم (جدایه‌ی کاملاً کارآمد و اختصاصی برای هر رقم) و قارچ‌های میکوریزی، باعث جذب بیشتر عناصر غذایی از خاک و به طبع آن، افزایش عملکرد و کیفیت نخود در شرایط دیم می‌شود.

هدف از انجام این پژوهش، کاربرد نهاده‌های زیستی سازگار با محیط زیست به‌صورت یک روش تغذیه‌ی تلفیقی حاوی کودهای شیمیایی مرسوم در منطقه و استفاده از نهاده‌های زیستی در کشت نخود در شرایط مزرعه‌ای به‌منظور افزایش رشد و عملکرد گیاه و نیل به امنیت غذایی در کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سه مرحله انجام شد:

مرحله‌ی اول آزمایشگاهی بوده و به‌منظور تهیه‌ی مایه تلقیح ریزوبیومی انجام شد.

مرحله‌ی دوم تحقیق، گلخانه‌ای بوده که در دو فاز انجام شد:

فاز اول، بررسی توان گره‌زایی باکتری‌های ریزوبیوم همزیست با گیاه نخود (رقم آنا)

فاز دوم، اندازه‌گیری توان ایزوله‌ها در تثبیت نیتروژن مولکولی

مرحله‌ی سوم، بررسی اثر متقابل باکتری‌های ریزوبیوم و قارچ میکوریز آربسکولار و توصیه‌ی بهینه‌ی کودی در مزارع ایستگاه تحقیقات دیم سرارود

مرحله‌ی اول تحقیق، تهیه‌ی مایه تلقیح ریزوبیومی در مقیاس آزمایشگاهی (تکثیر باکتری در محیط مایع)

در این تحقیق، از ۵۳ ریزوبیوم موجود در کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور استفاده شد. به‌منظور اطمینان از خالص بودن جدایه‌های ریزوبیوم درون اسلنت، این جدایه‌ها برروی محیط کشت YMA(Yeast Mannitol Agar) کشت داده شدند و پس از اطمینان از خلوص آن‌ها، برای تهیه‌ی مایه تلقیح ریزوبیومی، از محیط کشت YMB (Yeast Extract Mannitol Broth) استفاده شد.

مرحله‌ی دوم تحقیق، فاز گلخانه‌ای

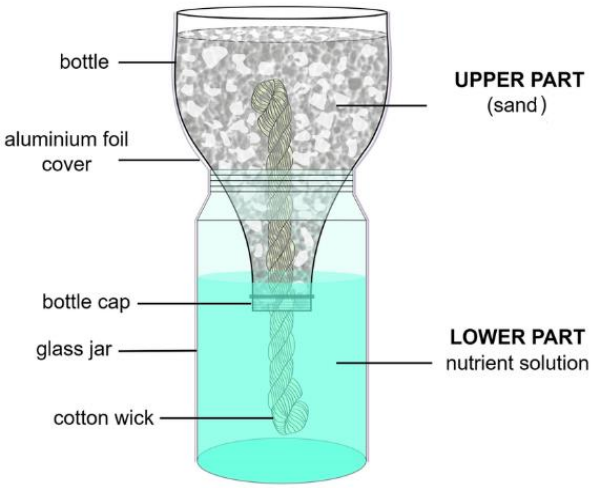
فاز اول، بررسی توان گره‌زایی باکتری‌های ریزوبیوم همزیست با گیاه نخود (رقم آنا)

اگر چه جدایه‌های ریزوبیوم مورد مطالعه، قبلاً از نظر توان گره‌زایی آزمایش شده‌بودند، ولی در اکثر مواقع پس از ۵ سال نگهداری ایزوله‌ها در اسلنت، لازم است ایزوله‌ها از نظر توان گره‌زایی آزمایش شوند. در این مرحله، نیاز به بذرهای سالم و بدون آلودگی داریم، به‌همین منظور، بذرهای سالم که از رقم آنا انتخاب شد، برداشته شده، ابتدا با مقدار کمی مایع دستشویی و آب شستشو داده‌شدند. سپس برای حذف هرگونه آلودگی میکروبی، در داخل ارلن

تمیز و درپوش‌دار به مدت ۴۰ ثانیه در الکل ۹۶ درصد غوطه‌ور شدند. پس از خالی کردن الکل، به مدت ۶ دقیقه بذرها درون وایتکس ۳۰ درصد قرارگرفتند. پس از آن، بذرها ۱۰–۸ مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند تا آثار مواد ضدعفونی کننده کاملاً ازبین برود. سپس بذرها روی پلیت‌های حاوی یک درصد آب–آگار (Water-Agar) چیده‌شد و به انکوباتور منتقل شدند تا جوانه زده و آماده‌ی استفاده شوند. برای آزمون تلقیح گیاه و مرحله‌ی ایجاد همزیستی، از گلدان‌های حاوی ماسه و پرلیت استریل استفاده شد، بدین صورت که در هر گلدان سه بذر جوانه زده قرار داده و هر گیاهچه با یک میلی‌لیتر مایه تلقیح ریزوبیومی ($۳*۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تلقیح شد. در طول دوره‌ی رشد، هفته‌ای سه‌بار گلدان‌ها آبیاری شدند به نحوی که آب از انتهای گلدان‌ها خارج نشود. پس از گذشت حدود یک ماه، وجود و یا عدم وجود گرهک‌ها بر روی ریشه‌ی گیاهچه‌ی نخود بررسی شد (Ferreira & Marques, 1992; Fujishige et al., 2006). ایزوله‌هایی که قادر به ایجاد گرهک روی سیستم ریشه‌ای نخود بودند، به مرحله‌ی بعد منتقل شدند.

فاز دوم، اندازه‌گیری توان ایزوله‌ها در تثبیت نیتروژن مولکولی

در این فاز آزمایشی، از جار لئونارد استفاده‌شد (Trung& Yoshida, 1983). گیاهان درون جارلئونارد به‌صورت طرح کاملاً تصادفی شامل ایزوله‌هایی که از تست قبلی به این مرحله انتقال داده‌شده‌اند، کشت شدند. قسمت بالای جار با شن و منبع زیرین جار از محلول غذایی بدون نیتروژن Broughton and Dilworth (1971)، که برای لگوم‌های درشت معرفی شده، پرشد. محل اتصال دو قطعه با کمک چسب نواری چسبانده شد و پس از پوشاندن سطح آن با ورق آلومنیومی، در اتوکلاو استریل گردید. شکل ۱ نمایی کلی از جارلئونارد را نشان می‌دهد. پس از سرد شدن، در هر جار سه نشای نخود که قبلاً در شرایط استریل جوانه‌دار شده‌بودند، کاشته شد و به هریک از آن‌ها یک میلی‌لیتر مایه تلقیح آماده‌شده از هر جدایه ($۳*۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر)، در سه تکرار اضافه گردید. در این آزمون از شاهد منفی جارهای تلقیح نشده و بدون منبع نیتروژن و دو سطح ۳۵و ۷۰ میلی‌گرم در لیتر نیتروژن (از منبع نیترات آمونیوم) در سه تکرار استفاده شد (N-35 و N-70). در تمام موارد، گیاهان در شرایط گلخانه‌ای با دوره‌ی روشنایی ۱۶ ساعت و با شدت نور ۱۰۰۰۰ – ۸۰۰۰ لوکس (Lux) و در دمای ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد قرارداشتند. در طول مدت رشد در گلخانه، تمامی مراقبت‌های لازم اعمال گردید و در صورت اتمام محلول غذایی، به آن‌ها محلول غذایی با غلظت اولیه افزوده‌شد. پس از حدود یک ماه مراقبت، با شروع غلاف‌بندی، آزمایش خاتمه یافت، گیاهان برداشت شد، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه و همچنین میزان نیتروژن موجود در اندام هوایی گیاه‌های نخود در مقایسه با تیمار شاهد و سطوح نیتروژن بررسی شد و کارایی همزیستی با توجه به وزن خشک ساقه، وزن خشک ریشه و مقدار نیتروژن محاسبه گردید.در این مرحله، گرهک‌ها نیز از ریشه‌ها جدا شده، با استفاده از دستگاه GC(Gas Chromatography) با روش احیای استیلن به اتیلن، مقدار اتیلن تولیدشده را اندازه‌گیری کرده، بیشترین پتانسیل احیای استیلن به اتیلن و قدرت تثبیت نیتروژن در جدایه‌ها بررسی شد و بهترین ایزوله انتخاب گردید. این ایزوله در مرحله‌ی سوم آزمایش مورداستفاده قرارگرفت.



شکل ۱- نمایی کلی از جارلئونارد

اندازه‌گیری مقدار اتیلن تولید شده با استفاده از دستگاه GC

همزمان با قطع هر گیاه، غده‌های آن نیز از ریشه جدا و در داخل ظروف کوچکی ریخته‌شدند. پس از آن ده درصد از حجم هوای ظرف مذکور را با استفاده از سرنگ کشیده و به جای آن گاز استیلن ۹۹ درصد تزریق شد. بعد از ۲۴ ساعت، مقدار اتیلن تجمع یافته در ظرف را با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگراف مدل Perkin elemen sigma 300 با ستون Poropaktبه طول ۱/۸ متر و قطر ۳/۲ میلی‌متر با درجه حرارت ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و دتکتور l.F.D با درجه حرارت ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، گاز حامل ازت با سرعت ۲۵ میلی‌لیتر در دقیقه، حساسیت یک با دامنه‌ی 10x، جریان هیدروژن ۱۵۰ کیلوپاسکال و جریان هوای ۲۰۰ کیلوپاسکال، اندازه گرفته و آن‌گاه بااستفاده از ارتفاع پیک‌های اتیلن تولیدشده در لوله‌ی آزمایش، محاسبات لازم را انجام داده و درنهایت نانومول اتیلن تولیدشده به ازای هر جار محاسبه گردید (Muangthong et al., 2015).

مرحله‌ی سوم تحقیق، بررسی اثر متقابل باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریز آربسکولار *(Rhizophagusintraradices)* و توصیه‌ی بهینه‌ی کودی در مزرعه‌ای در ایستگاه تحقیقات دیم سرارود

مرحله‌ی سوم (نهایی) تحقیق، در مزرعه‌ای در ایستگاه تحقیقات دیم سرارود در فصل زراعی ۱۴۰۱-۱۴۰۰ اجرا شد. این ایستگاه تحقیقاتی در شهرستان سرارود استان کرمانشاه قراردارد. دارای طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۲۰ دقیقه و عرض جغرافیایی ۳۴ درجه و ۲۰ دقیقه بوده، میانگین سالانه‌ی دما ۱۳/۸، حداکثر مطلق دما ۴۴+ و حداقل مطلق دما ۲۷- درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد. همچنین شرایط دیم‌زارهای آن، معتدل و تاحدی معتدل سرد و میانگین بارندگی آن ۴۷۸ میلی‌متر است. غالباً کشت نخود در این منطقه به صورت دیم انجام‌می‌شود. نتایج تجزیه خاک این منطقه که غلظت عناصر براساس روش‌های استاندارد آزمایشگاهی اندازه‌گیری شدند (Ali Ahiaei, 1997)، در جدول ۱ ارائه شده‌است. برای استفاده از قارچ میکوریز و باکتری ریزوبیوم از روش تلقیح بذری استفاده‌شد. برای تلقیح میکوریز، ابتدا ریشه‌ی تلقیح شده‌ی گیاه را پودر کرده، سپس با ماده‌ی حامل (ماده‌ی معدنی پوکه‌ی آسیاب شده و استریل) به نسبتی که به ازای هر گرم، ۳۰۰ اندام

فعال قارچ را تأمین نماید، مخلوط و به بذر تلقیح می‌گردد. برای تلقیح بذر با باکتری ریزوبیوم نیز، مایه تلقیح با نسبتی مشخص با پرلیت استریل شده و مایع چسباننده با بذر مخلوط و سپس کشت شد. در این آزمایش فاکتوریل که در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام‌شد، فاکتور اول، تیمار قارچی در دو سطح تلقیح با قارچ میکوریز و فاقد قارچ میکوریز، فاکتور دوم، تیمار باکتریایی در دو سطح تلقیح با باکتری ریزوبیوم و فاقد باکتری ریزوبیوم و فاکتور سوم، سطوح کود شیمیایی در دو سطح فاقد کود و مصرف بهینه ی کود با توجه به نظر کارشناسان و نتایج تجزیه خاک منطقه (۵۰ کیلوگرم در هکتار اوره قبل از کاشت، ۵۰ کیلوگرم در هکتار اوره و ۲۵ کیلوگرم در هکتار سولفات پتاسیم محتوی کلات روی به صورت سرک در فصل بهار) بود. در کل ۸ تیمار درنظر گرفته شد، با احتساب ۴ تکرار برای هر تیمار، درکل ۳۲ کرت آزمایشی آماده شد. پس از کاشت بذور به صورت دستی، در طول دوره‌ی رشد، عملیات وجین انجام شد، در اردیبهشت ماه نیز کوددهی سرک در کرت‌های دارای تیمار کودی اعمال گردید. پس از اتمام دوره‌ی رشد و برداشت در خرداد ماه، بیومس (وزن دانه به‌همراه کاه و کلش)، تعداد شاخه‌های فرعی در بوته، عملکرد هر کرت و کیفیت بذر نخود (غلظت نیتروژن، فسفر و روی در دانه بر اساس روش‌های استاندارد آزمایشگاهی (Emami, 1996))، اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- نتایج تجزیه خاک

pH	Ec(دسی‌زیمنس بر متر)	OC (درصد)	Zn (میلی‌گرم در کیلوگرم)	Fe (میلی‌گرم در کیلوگرم)	Mn(میلی‌گرم در کیلوگرم)	Cu (میلی‌گرم در کیلوگرم)	B (میلی‌گرم در کیلوگرم)	Ca (میلی‌گرم در کیلوگرم)	Mg (میلی‌گرم در کیلوگرم)	K (میلی‌گرم در کیلوگرم)	P (میلی‌گرم در کیلوگرم)	Total N (میلی‌گرم در کیلوگرم)
۷/۷۸	۰/۶۱	۱/۱۸	۱/۱۲۵	۹/۴	۱۲/۱	۳/۴	۱/۴	۲۵۰/۴	۴۷۰/۹	۲۸۴/۱۳	۹/۰۱	۰/۰۸

تجزیه و تحلیل آماری

اثرات اصلی فاکتورهای آزمایش و برهمکنشآن‌ها از طریقANOVA با استفاده از روش مدل خطی عمومی (GLM) در نرم افزار SAS نسخه‌ی ۹,۴ ارزیابی شد. نرمال بودن باقیمانده‌ها با استفاده ازPROC UNIVARIATE مورد آزمایش قرار گرفت. میانگین‌ها با استفاده از حداقل تفاوت معنی‌دار حفاظت‌شده (LSD محافظت‌شده) در $P\leq$۰/۰۵مقایسه شدند. در فاز دوم آزمایش، به منظور تعیین بهترین ایزوله، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار XLSTST انجام شد.

نتایج و بحث

مرحله‌ی اول تحقیق، تهیه‌ی مایه تلقیح ریزوبیومی

مایه تلقیح ۵۳ جدایه‌ی ریزوبیومی موجود در مؤسسه تحقیقات خاک و آب، به‌منظور استفاده در مراحل بعد فراهم گردید.

مرحله‌ی دوم تحقیق، فاز گلخانه‌ای

فاز اول، بررسی توان گره‌زایی باکتری‌های ریزوبیوم همزیست با گیاه نخود (رقم آنا)

در این آزمایش گلخانه‌ای، پس از گذشت حدود یک ماه، گیاهان برداشت، و وجود و یا عدم وجود گرهک‌ها بر روی ریشه‌ی گیاهچه بررسی شد. ایزوله‌هایی که قادر به ایجاد گرهک برروی سیستم ریشه‌ای نخود بودند (۴۲ ایزوله)، به مرحله‌ی بعد منتقل شدند.

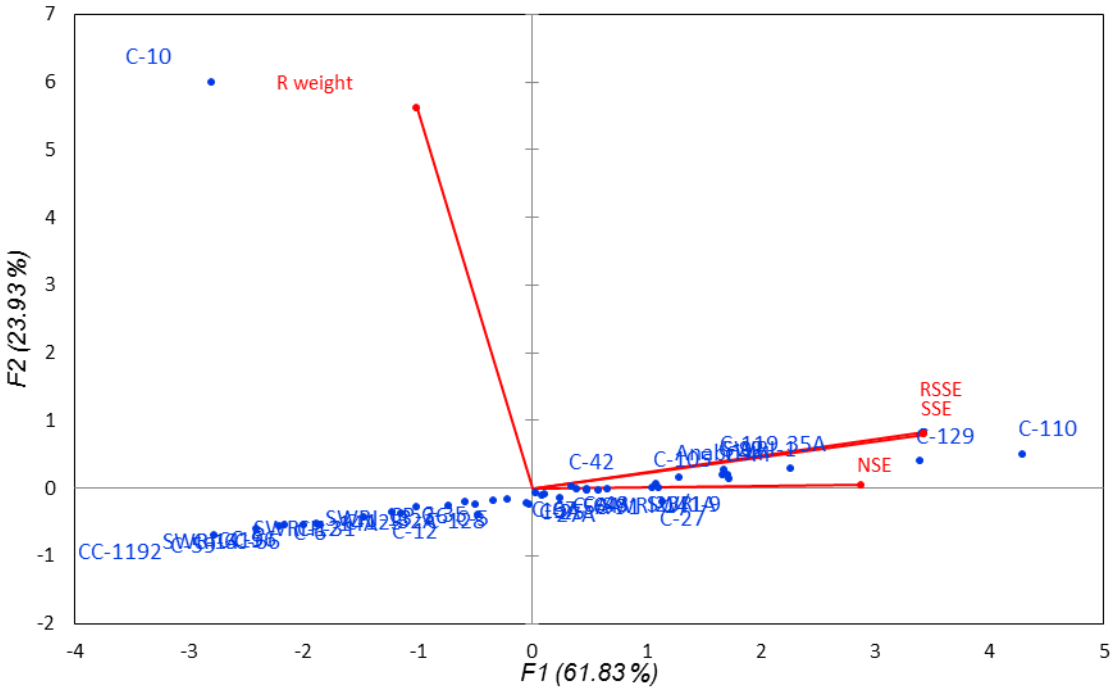
فاز دوم، توان ایزوله‌ها در تثبیت نیتروژن مولکولی

پس از یک ماه مراقبت، گیاهان برداشت شد، وزن تر و خشک اندام هوایی و همچنین میزان نیتروژن به روش کلدال برای محاسبه‌ی میزان کارایی همزیستی اندازه‌گیری شد. بیشترین درصد کارایی همزیستی برحسب وزن ساقه (۱۱۸/۱۰۶٪)، بیشترین درصد کارایی همزیستی برحسب وزن ریشه و ساقه (۱۱۷/۹۷٪) و بیشترین درصد کارایی همزیستی برحسب مقدار نیتروژن (۱۱۴/۵۸٪)، هر سه برای باکتری C-110 محاسبه‌شد. بیشترین میزان احیای استیلن

به اتیلن نیز در جدایه‌ی C-110 و به میزان ۴۳۰/۷۸ نانومول اتیلن در لوله بر ساعت مشاهده‌شد (جدول ۲). با توجه به این نتایج و همچنین بالاتر بودن وزن ریزوبیوم‌های تیمار C-110 نسبت به تیمارهای دیگر، باکتری C-110به عنوان بهترین ایزوله انتخاب شد. (شکل ۲)

جدول ۲- نتایج حاصل از فاز دوم مرحله‌ی دوم تحقیق

نام باکتری	مقدار احیای استیلن به اتیلن (نانومول اتیلن در لوله بر ساعت)	SE (برحسب مقدار نیتروژن)	SE (برحسب وزن ساقه)	SE (برحسب وزن ریشه و ساقه)
C-92	۲۴۸/۱۸	۴۳/۴۸	۸۰/۹۶	۸۳/۰۲
C-91	۲۳۳/۳۶	۳۹/۱۱	۵۴/۷۳	۴۸/۲۴
C-12	۲۷۶/۱۶	۶۲/۴۳	۶/۰۶	۴/۸۴
C-110	۴۳۰/۷۸	۱۱۴/۵۸	۱۱۸/۱۰۶	۱۱۷/۹۷
C-66	۱۸۹/۰۱	۲۶/۴۲	−۱۴/۹۱	−۱۳/۲۱
C-14	۱۱۲/۶۸	۸/۶۷	−۱۲/۷۵	−۱۵/۶۳
C-5	۲۴۹/۶	۴۶/۲۹	۲۹/۱۱	۲۷/۱۷
C-105	۲۴۸/۵۱	۴۶/۶۹	۳۳/۹۵	۹۵/۰۶
C-44	۲۹۱	۶۰/۶۵	۷۵/۹۲	۷۰/۳۱
C-10	۸۸/۴۵	۷/۹۸	۱/۹۵	۴/۶۸۲
C-59	۸۸/۹۶	۷/۹۲	−۱۹/۶۵	−۲۰/۲۳
C-42	۱۳۸/۸۱	۱۴/۳	۵۵/۰۴	۶۵/۶۳
C-6	۱۶۶/۶۸	۱۸/۱۵	−۱۳/۱۶۸	۱۹/۶۴
C-64	۱۷۹/۰۱	۲۵/۴۴	۵۱/۴۴	۵۷/۶۹
C-25	۲۰۸/۵۶	۲۸/۷۷	۴۳/۳۱	۴۳/۰۶
C-128	۲۵۱/۸۵	۵۴/۵	۲۵/۸۲	۲۲/۰۷
C-56	۱۶۳/۷۵	۱۶/۷۷	−۱۰/۳۹	−۸/۱۱
C-119	۱۸۶/۲۸	۲۷/۵۷	۸۲/۷۱	۱۰۳/۰۹
C-48	۱۸۴/۹۶	۲۷/۱۱	۵۷/۵۱	۵۴/۱۸
C-19	۱۳۵/۲۸	۱۵/۱۶	−۱۲/۸۶	−۱۰/۷۸
C-129	۳۳۹/۹۶	۹۰/۹۲	۸۲/۵۱	۱۳۱/۳۵
C-27	۱۷۰/۱۸	۱۰۵/۶۵	۲۷/۶۷	۲۸/۴۲
C-123	۱۶۱/۰۱	۲۰/۹۶	۲۰/۹۸	۲۵/۲۵
C-67	۱۶۰	۱۸/۲۰۷	۴۹/۶۹	۴۵/۹
C-35	۱۷۹/۵۳	۲۵/۴۴	۳۲/۳	۴۰/۱۳
32A	۲۰۵/۲	۳۰/۰۹	۲۲/۸۳	۲۶/۵
35A	۲۵۳/۵۱	۵۶/۱۱	۹۳/۱	۹۱/۴۷
27A	۲۴۶/۷۸	۴۶/۳۵	۳۴/۳۶	۴۰/۳
14A	۱۲۱/۸۵	۹/۹۳	۲۸/۰۶	۱۳/۷۱
5A	۲۳۱/۶۸	۳۲/۹۶	۵۴/۵۶	۵۰/۱۶
19A	۱۹۲/۳۵	۲۶/۷۶	۳۶/۷۲	۵۴/۵۱
23/1A	۲۵۰/۰۶	۵۹/۲۱	۵۳/۴۹	۵۷/۵۲
CC-1192	۱۱۶/۷	۸/۶۷	−۲۹/۷۳	−۳۳/۶۱
CP-36	۱۷۷/۱۱	۲۱/۵۹	۲۷/۵۷	۴۲/۳۹
CP-31	۱۷۲/۵۳	۲۱/۷۱	۹/۷۷	۱۰/۱۱
Anabrish	۲۰۳/۵	۳۵/۷۸	۶۳/۸۸	۸۸/۲۹
SWRI-1	۲۳۶/۲	۴۵/۷۲	۸۰/۶۵	۸۳/۵۲
SWRI-6	۱۲۳/۷۸	۱۰/۴۵	−۱۲/۸۶	−۱۴/۹۶
SWRI-9	۲۵۲/۰۱	۵۶/۶۳	۴۹/۳۸	۶۱/۸۷
SWRI-12	۱۶۵/۲۸	۱۶/۱۴	۱۱/۲۱	۱۱/۱۲
SWRI-13	۱۳۴/۸۵	۱۵/۱۶	۳۲/۰۹	۲۹/۸۴
SWRI-14	۲۳۱/۹۵	۳۹/۲۳	۵۱/۸۵	۵۶/۵۲
N-35	-	۴۲/۲۷	۹۰/۹۴	۹۱/۸
N-70	-	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰



شکل ۲- بای پلات حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روی صفات مختلف نخود (R weight:وزن ریزوبیوم، NSE: کارایی همزیستی بر حسب مقدار نیتروژن، SSE: کارایی همزیستی بر حسب وزن خشک ساقه، RSSE: کارایی همزیستی بر حسب وزن خشک ریشه و ساقه) اندازه‌گیری شده تحت شرایط تلقیح ایزوله‌های مختلف باکتری

همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، اولین مؤلفه‌ی اصلی (F1)، بخش بزرگی از واریانس را توضیح می‌دهد (۶۱/۸۳ درصد). صفاتی که نزدیک به این محور هستند، آنهایی هستند که در بین ایزوله‌های باکتری، بیشترین تفاوت را دارند اما دومین مؤلفه‌ی اصلی (F2)، بخش کوچکتری از واریانس را توضیح می‌دهد (۲۳/۹۳ درصد).و درصدها در اینجا به‌طور قابل ملاحظه‌ای پایین‌تر هستند. در نمودار بای پلات، کسینوس زاویه‌ی بین بردارها بیانگر نوع همبستگی هست. هر چقدر زاویه کمتر از ۹۰ درجه باشد، همبستگی مثبت و هر چقدر از ۹۰ درجه بیشتر باشد، همبستگی منفی می‌باشد. همچنین اگر زاویه ۹۰ درجه باشد همبستگی صفر هست؛ ولی در نمودار بای پلات، طول بردارها و جهت آنها نشان می‌دهد که هر صفت چقدر با اجزای اصلی و با یکدیگر همبستگی دارند و نزدیکی نقاط به بردارهای صفت نشان دهنده‌ی میزان اثر است. به عبارت دیگر، نزدیکی این نقاط به یک صفت خاص، نشان دهنده‌ی ارتباط یا تأثیر بیشتر آن تیمار بر صفت مورد نظر است.کارایی‌های همزیستی بر حسب مقدار نیتروژن، وزن خشک ساقه و ریشه ارتباط نزدیکی با یکدیگر و همچنین همبستگی مثبت زیادی با F1 دارند به این معنی که با افزایش یکی، بقیه نیز تمایل به افزایش دارند و این نشان می‌دهد که افزایش این کارایی‌ها باعث افزایش زیست توده‌ی نخود می‌شوند. با توجه به شکل، از میان ایزوله‌های مورد آزمایش، ایزوله‌ی C-110 بالاترین ضریب مؤلفه‌ی اول را به خود اختصاص داد و نزدیک‌ترین ایزوله به کارایی‌های همزیستی بود. بنابراین این ایزوله شناسایی شده و به فاز بعد منتقل شد.

مرحله‌ی سوم پروژه، بررسی اثر متقابل باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریزآربسکولار (*Rhizophagusintraradices*) در مزرعه

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از فاکتورهای آزمایشی در جدول ۳ارائه شده‌است.

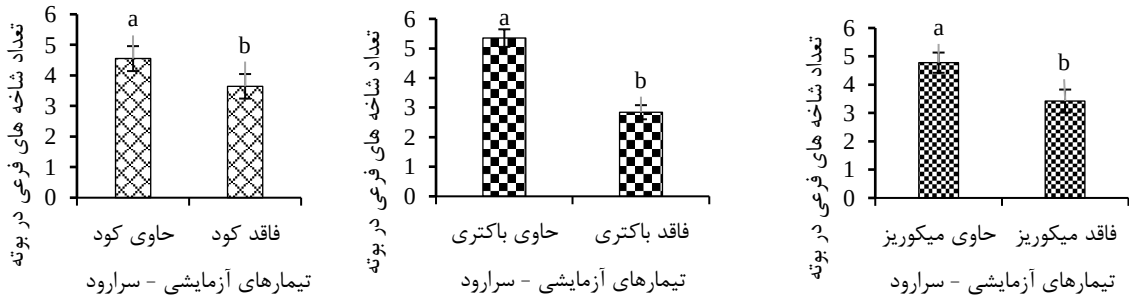
جدول ۳- تجزیه واریانس اثر باکتری، قارچ میکوریز و کود شیمیایی بر تعداد شاخه‌های فرعی در بوته، بیومس، عملکرد دانه و غلظت عناصر غذایی در دانه

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد شاخه‌های فرعی در بوته	بیومس (وزن دانه و کاه و کلش)	عملکرد (وزن دانه)	غلظت نیتروژن دانه	غلظت فسفر دانه	غلظت روی دانه
تکرار	۳	۰/۲۸۵	۶۵۹۵/۸۳	۷۴۴/۸	۰/۴۴	۰/۰۰۰۸	۳۲/۴۷
قارچ میکوریز	۱	۱۴/۷۱**	۳۶۹۳۷۹/۵۸**	۴۴۰۶۳/۳**	۱/۸۴**	۰/۰۱**	۱۴۸۸/۹۴**
باکتری	۱	۵۰/۲۵**	۲۳۷۳۰۴۲/۲۳**	۲۰۳۴۵۰/۰۷**	۵/۵۷**	۰/۰۰۴	۸۵۸/۲۲**
کود	۱	۶/۵۷**	۱۷۵۹۸/۵۶	۱۰۵۲۵/۳۷**	۲/۷۶**	۰/۰۰۰۶	۱۲۶۹/۵۷**
باکتری*قارچ میکوریز	۱	۰/۰۲	۱۰۸۹۸۷/۰۶	۳۹۲۷/۵۷	۰/۰۸	۰/۰۰۰۴	۲۷۹/۶۶**
کود*قارچ میکوریز	۱	۰/۰۱	۱۷۲۳/۹۶	۱۲۴۰/۶۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۰۱	۱۹۰/۳۲**
کود*باکتری	۱	۰/۳	۱۰۹/۵۳	۴۳۷/۸۲	۰/۰۰۷	۰/۰۰۰۰۵	۴/۵۳
کود*باکتری*قارچ میکوریز	۱	۰/۱۶	۱۸۳۷/۹۳	۲۹۱۱/۳۶	۰/۴۸	۰/۰۰۰۰۵	۱۰۲/۹۶**
خطا	۲۱	۰/۵۳	۴۲۵۷/۸۳	۹۳۵/۸۸	۰/۲۱	۰/۰۰۰۳	۱۱/۰۸
ضریب تغییرات (٪)		۱۷/۸۸	۱۷/۱۹	۶/۹۹	۱۵/۷	۱۴/۸۵	۸/۴۴

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد.

تعداد شاخه‌های فرعی در بوته

براساس نتایج تجزیه واریانس، تعداد شاخه‌های فرعی در بوته، تحت اثرات اصلی میکوریز، باکتری و کود معنی دار شد (جدول ۳)، بدین معنی که کاربرد هرکدام از آن‌ها باعث افزایش تعداد شاخه‌های فرعی در بوته‌ی نخود گردید. بیشترین میانگین تعداد شاخه های فرعی به ترتیب در تیمارهایی با مصرف باکتری ریزوبیوم (۵/۳۵)، مایکوریز (۴/۷۷۵) و کود (۴/۵۵) مشاهده شد. با کاربرد باکتری ریزوبیوم، ۸۸/۱۳٪، با کاربرد مایکوریز ۳۹/۷٪ و با کاربرد کود، ۲۴/۸۷٪ تعداد شاخه‌های فرعی در بوته افزایش یافت (شکل ۳). تعداد شاخه فرعی در گیاه در گونه‌های مختلف حبوبات متفاوت است و به‌عنوان یک معیار مهم برای عملکرد دانه محسوب می‌شود. تعداد شاخه‌های جانبی، یک خصوصیت وابسته به واریته بوده و شدیداً تحت تأثیر شرایط محیطی، خصوصیات فیزیکی خاک، شرایط تنش رطوبتی و تغذیه می‌باشد. از آنجایی که غلاف‌ها برروی شاخه‌ی جانبی رشد می‌کنند، بنابراین تعداد شاخه‌ی جانبی نقش بسیار مهمی در عملکرد نهایی دارا می‌باشد. نتایج این تحقیق باتحقیقاتتوگایوهمکاران (۲۰۰۸) مطابقتدارد.

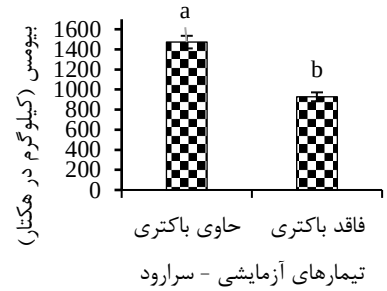


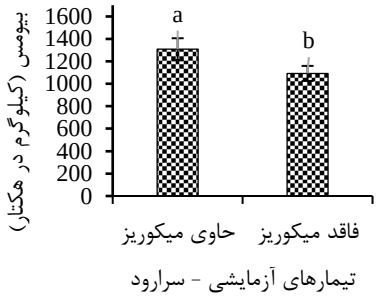
شکل ۳- اثر اصلی قارچمیکوریز، باکتری ریزوبیوم C-110 و کود بر تعداد شاخه‌های فرعی در بوته
برای هرنمودار، تفاوت معنی‌داری در P<0.05، با حروف مختلف لاتین نشان داده‌شده‌است. میله‌های بالای هر نمودار نشان‌دهنده‌ی خطای معیار می‌باشد.

بیومس (وزن دانه و کاه و کلش)

براساس نتایج تجزیه واریانس، بیومس، تحت اثرات اصلی میکوریز و باکتری ریزوبیوم معنی‌دار شد. هرچند تحت اثر متقابل میکوریز، باکتری و کود، میزان بیومس به ۱۶۷۴/۵ کیلوگرم در هکتار رسید و افزایش ۹۶ درصدی نشان داد و بالاترین میزان بیومس تحت اثر متقابل این سه عامل قرار گرفت، اما داده‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار نشد (جدول ۳).

بررسی داده‌ها نشان داد به‌کار بردن باکتری ریزوبیوم به میزان ۵۸/۷۱٪ و استفاده از مایکوریز، ۱۹/۶۷٪ بیومس گیاه را افزایش داده‌است (شکل ۴).





شکل ۴- اثر اصلی قارچ میکوریز، باکتری ریزوبیوم C-110 بر بیومس
برای هرنمودار، تفاوت معنی‌داری در $P<0.05$، با حروف مختلف لاتین نشان داده‌شده‌است. میله‌های بالای هر نمودار نشان‌دهنده‌ی خطای معیار می‌باشد.

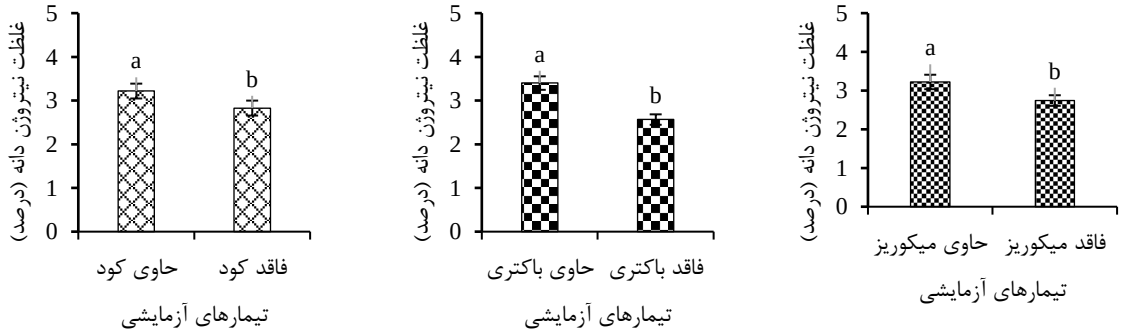
عملکرد دانه (وزن دانه)

براساس تجزیه واریانس، اثرات اصلی قارچ میکوریز، باکتری ریزوبیوم C-110و کود بر عملکرد دانه معنی‌دار بود (جدول ۳). بررسی داده‌ها نشان داد مقدار عملکرد دانه با به‌کار بردن باکتری ریزوبیوم، ۵۱۷/۲۱۲ کیلوگرم در هکتار، با به‌کار بردن قارچ میکوریز، ۴۷۴/۵۸۴ کیلوگرم در هکتار و در نهایت با به‌کار بردن کود، ۴۵۵/۶۱۳ کیلوگرم در هکتار بود. در این حالت، با کاربرد باکتری ریزوبیوم، ۴۴/۵۷٪، با کاربرد قارچ میکوریز، ۱۸/۵۳٪ و با کاربرد کود ۸/۶۴٪ عملکرد دانه نسبت به عدم کاربرد آن‌ها افزایش پیدا کرد (شکل ۵). به‌طور کلی، تلقیح با قارچ میکوریز، منجر به بهبود غلظت فسفر و در نتیجه عملکرد دانه می‌شود. تلقیح با باکتری ریزوبیوم نیز به‌دلیل تأمین نیتروژن بیشتر طی فرآیند تثبیت زیستی و انتقال به بخش هوایی، باعث افزایش سنتز کلروفیل، افزایش فتوسنتز و درنتیجه افزایش عملکرد دانه می‌شود. ارمان و همکاران (Erman et al., 2011)بیان کردند تلقیح قارچ میکوریز آربوسکولار همراه با ریزوبیوم یا به‌تنهایی منجر به افزایش عملکرد دانه، گسترش ریشه و مقدار فسفر دانه و ساقه شد. ارشدی و همکاران (Arshadi et al., 2021) با بررسی نه ژنوتیپ نخود نشان دادند کاربرد قارچ میکوریز و باکتری ریزوبیوم، عملکرد دانه و ماده‌ی خشک نخود را به‌طور قابل توجهی افزایش داد.

شکل ۵- اثر اصلی قارچمیکوریز، باکتری ریزوبیوم C-110 و کود بر عملکرد دانه
برای هرنمودار، تفاوت معنی‌داری در P<0.05، با حروف مختلف لاتین نشان داده‌شده‌است. میله‌های بالای هر نمودار نشان‌دهنده‌ی خطای معیار می‌باشد.

غلظت نیتروژن دانه

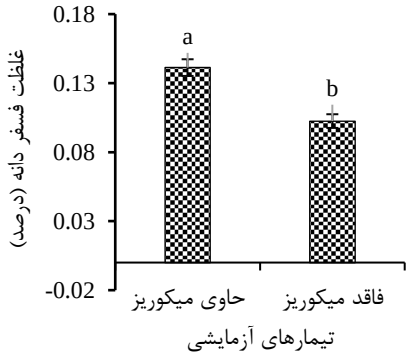
در مزرعه، اثرات اصلی قارچ میکوریز، باکتری C-110و کود بر غلظت نیتروژن دانه معنی‌دار بود (جدول ۳). بررسی داده‌ها نشان داد غلظت نیتروژن دانه با به‌کار بردن باکتری ریزوبیوم ۳/۴٪، با استفاده از قارچ میکوریز ۳/۲۲٪ و با استفاده از کود ۳/۲۱٪ شد. بدین معنی که با استفاده از قارچ میکوریز، ۱۷/۵٪، باکتری ریزوبیوم، ۳۲/۵۵٪ و کود، ۱۰/۹۶٪، غلظت نیتروژن دانه نسبت به عدم کاربرد آن‌ها، افزایش یافت (شکل ۶). گزارش‌های متعددی بیان داشتند که تلقیح لگوم‌ها با باکتری‌های ریزوبیوم به علت تثبیت نیتروژن، باعث افزایش مقدار نیتروژن دانه می‌شود. قارچ های میکوریزی نیز تأثیر عمیقی بر فیزیولوژی ریشه‌ی گیاه گذاشته که سبب فعال ساختن گلوتامین سنتتاز، آرژیناز و اوره‌آز شده و از این طریق غلظت نیتروژن را در گیاهان میزبان افزایش می‌دهند (Mahmoudzadeh et al., 2015). آرژیناز و اوره‌آز از آنزیم‌های کلیدی در انتقال نیتروژن از میسلیوم به داخل ریشه‌ی گیاه میزبان طی فرآیند همزیستی می‌باشند. نیتروژن توسط میسلیوم‌های خارجی به فرم نیترات یا آمونیوم جذب و به‌وسیله گلوتامین سنتتاز به ترکیبات آلی تبدیل می‌گردد (Mahmoudzadeh et al., 2015). همچنین الیویرا و همکاران (Oliveira et al., 2016) بیان کردند که استفاده از باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریز به تنهایی یا توأم با یکدیگر موجب افزایش نیتروژن دانه می‌گردد.



شکل ۶- اثر اصلی قارچ میکوریز، باکتری ریزوبیوم C-110 و کود بر غلظت نیتروژن دانه
برای هرنمودار، تفاوت معنی‌داری در P<0.05، با حروف مختلف نشان داده‌شده‌است. میله‌های بالای هر نمودار نشان‌دهنده‌ی خطای معیار می‌باشد.

غلظت فسفر دانه

براساس تجزیه واریانس، تنها اثر اصلی قارچ میکوریز بر غلظت فسفر دانه معنی دار شد (جدول ۳). طبق نتایج حاصله، کاربرد قارچ میکوریز باعث افزایش غلظت فسفر دانه شد بدین معنی که غلظت فسفر دانه تحت اثر قارچ میکوریز برابر ۰/۱۴۱٪ شد که نسبت به تیمار بدون قارچ ۳۷/۸٪ افزایش داشت (شکل ۷). نتایج محققین روی گیاه نخود نشان داده‌است محتویات فسفر دانه در گیاهان تلقیح شده با قارچ میکوریزبیشتر از گیاهان شاهد بدون تلقیح بوده‌است (Stancheva et al., 2006; Erman et al., 2011). نقش مفید قارچ های میکوریزی به‌ویژه در مورد جذب فسفر و عناصرکم مصرف، مربوط به ناحیه‌ی تخلیه‌ی عناصر در اطراف ریشه می‌باشد و وسعت این ناحیه بستگی به حلالیت و قابل حرکت بودن عناصر در خاک دارد که در مورد نیتروژن زیاد و در مورد فسفر کم است و قارچ‌های میکوریز با گسترش شبکه‌ی ریسه‌ای خود، این محیط را افزایش می‌دهند(Ahmadi et al., 2004).



شکل ۷- اثر اصلی قارچ میکوریز بر غلظت فسفر دانه

برای هرنمودار، تفاوت معنی‌داری در P<0.05، با حروف مختلف نشان داده‌شده‌است. میله‌های بالای هر نمودار نشان‌دهنده‌ی خطای معیار می‌باشد.

غلظت روی دانه

براساس تجزیه واریانس، غلظت روی دانه تحت اثرات اصلی قارچ میکوریز، باکتری C-110، کود و اثرات متقابل قارچ میکوریز و باکتری، همچنین قارچ میکوریز و کود و اثرات متقابل سه‌گانه‌ی قارچ میکوریز، باکتری ریزوبیوم و کود افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد (جدول ۳). بیشترین میزان روی در دانه در تیماری مشاهده گردید که همزمان از این سه عامل برخوردار بود (۵۶/۰۹ میلی‌گرم در کیلوگرم) و کمترین میزان نیز در تیمار فاقد این سه عامل (۲۳/۰۸ میلی‌گرم در کیلوگرم) حاصل شد. با کاربرد قارچ میکوریز، ۴۱/۸۱٪، با کاربرد کود، ۳۸٪ و با کاربرد باکتری ریزوبیوم، ۳۰/۲۲٪، تحت اثرات متقابل قارچ میکوریز و باکتری ریزوبیوم، ۷۸/۹۴٪، تحت اثرات متقابل قارچ میکوریز و کود، ۱۰۹/۸۵٪ و تحت اثرات متقابل میکوریز، باکتری ریزوبیوم و کود، ۱۴۳/۰۲٪ غلظت روی دانه نسبت به عدم کاربرد آن‌ها افزایش پیدا کرد (شکل ۸). بیسواس و همکاران (Biswas et al., 2000)گزارش کردند که مایه تلقیح‌های ریزوبیومی سبب افزایش تعداد ریشه های موئین و ریشههای جانبی شده و در نتیجه سبب افزایش جذب مواد مغذی ازجمله روی می‌شوند. همچنین ماسا و همکاران (Massa et al., 2020) نشان دادند استفاده از باکتری ریزوبیوم همراه با قارچ میکوریز موجب افزایش کیفیت بذر لوبیا گردید و غلظت منیزیم، پتاسیم، روی و پروتئین دانهافزایش یافت به‌نحوی که استفاده از آن‌ها باعث کاهش استفاده از کودهای شیمیایی حاوی این عناصر شد. همچنین خسروجردی و همکاران (Khosrojerdi et al., 2014) بیان کردند کاربرد همزمان باکتری ریزوبیوم و قارچ میکوریز باعث افزایش میزان روی دانه در گیاه نخود شده است.

شکل ۸- اثرمتقابل قارچ میکوریز، باکتری ریزوبیوم C-110 و کود بر غلظت روی دانه
برای هرنمودار، تفاوت معنی‌داری در $P<0.05$، با حروف مختلف نشان داده‌شده‌است. میله‌های بالای هر نمودار نشان‌دهنده‌ی خطای معیار می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، با اندازه‌گیری تعداد شاخه‌های فرعی در بوته، بیومس، عملکرد دانه، نیتروژن دانه و فسفر دانه مشخص گردید میکروارگانیسم‌ها توانسته‌اند مقدار بیشتری از این عناصر را در شرایط دیم و در مقایسه با کود شیمیایی به تنهایی، در اختیار گیاه قراردهند. در رابطه با تعداد شاخه‌های فرعی در بوته، بیومس، غلظت نیتروژن دانه و عملکرد دانه، باکتری ریزوبیوم C-110 به‌کاربرده شده، بیشتر از قارچ میکوریز باعث افزایش فاکتور مورد بررسی شده‌است، بررسی غلظت فسفر دانه نشان داد که قارچ میکوریز بهتر از باکتری ریزوبیوم C-110 عمل کرده‌است. همچنین با بررسی غلظت روی دانه مشخص گردید اثرات متقابل کود، قارچ میکوریز و باکتری ریزوبیوم بیشتر از کاربرد این فاکتورها به تنهایی باعث افزایش غلظت این عنصر شده است که در این حالت نقش کوددهی بهینه را نمی‌توان نادیده گرفت. اگرچه میزان عملکرد نخود در شرایط دیم در این منطقه کمتر از شرایط آبی است، اما با استفاده از ریزجانداران مفید خاکزی (قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های ریزوبیوم) می‌توان عملکرد را افزایش دادو ازآنجایی‌که تغییر اقلیم و برخی از شیوه‌های مدیریت کشاورزی، مانند خاک‌ورزی و استفاده‌ی بیش از حد از کودهای شیمیایی، در تخریب حاصلخیزی خاک نقش داشته‌اند، می‌توان با کاربرد این ریزجانداران مفید سلامت اکوسیستم و افزایش بهره‌وری در کشاورزی را بهبود بخشید. بدیهی است همزیستی قارچ‌های میکوریز و باکتری‌های ریزوبیوم در هر تنش و هر گیاه باید جداگانه بررسی‌شود تا بتوان گونه‌ی مناسب برای آن شرایط را شناسایی کرد تا با کاربرد صحیح این همزیستی سه‌گانه، بتوان به گیاهان کمک نمود. به بیان دیگر، شرط ایجاد همزیستی مؤثر، وجود جدایه‌ی باکتری کاملاً کارآمد و اختصاصی برای گیاه میزبان است که برای حصول حداکثر کارایی، بایستی از مراحل ابتدایی رویشبا جمعیت کافی و با روش بذرمال در مجاورت بذر گیاه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

اجرای این تحقیق با حمایت بخش بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور و همچنین مؤسسه تحقیقات دیم سرارود انجام شد که بدینوسیله از اساتید و کارشناسان این دو مؤسسه کمال تشکر را دارم.

Refrences

1. Ahmadi, A., Ehsanzadeh, P. and Jabbari, F. 2004. An Introduction to Plant Physiology. Tehran University. (in Persian).
2. Ali Ahiaei, M. 1997. Methods of chemical analysis of soil. Soil and Water Research Institute. Publication number 1024.
3. Allosh, G. A. Z., Zeto, S. K. and Clark, R. B. 2000. Phosphorus sources, organic matter, in acid soil. Journal of Plant Nutrition 23: 1351-1369.
4. Arshadi, J., Parsa, M., Lakzian, M. and Kafi, M. 2021. Effects of mycorrhiza symbiosis on seed yield and some physiological responses of chickpea genotypes. Agriculture, Environment & Society 1(1): 31-37.
5. Benami, M., Isack, Y., Grotsky, D., Levy, D. and Kofman, Y. 2020. The economic potential of arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. Grand Challenges in Fungal Biotechnology 239–279.
6. Biswas, J.C., Ladha, J.K. and Dazzo, F.B. 2000. Rhizobial inoculation improves nutritional uptake and growth of lowland rice. Soil Sceince Society of American Journal 64: 1644-1650.
7. Denison, R.F. and Kiers, E.T. 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and mycorrhizal fungi. Current Biology 21:775–785.
8. Emami, A. Plant analysis methods. 1996. Soil and Water Research Institute. Publication number 982.
9. Erman, M., Demir, S., Ocak, E., Tüfenkçi, S., Oğuz, S. and Akköprü, A. 2011. Effects of Rhizobium, arbuscular mycorrhiza and whey applications on some properties in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under irrigated and rainfed conditions 1—Yield, yield components, nodulation and AMF colonization. Field Crops Research. 122(1): 14-24.
10. Ferreira E.M., and Marques J.F. 1992. Selection of Portuguese Rhizobium leguminosarumbv. trifolii strains for production of legume inoculants. Plant Soil. 147: 151–158.
11. Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff, P.L. and Hirsch, A.M. 2006. Investigation of Rhizobium biofilm formation. FEMS Microbiol Ecol. 56(2): 195-206.
12. He, J., Dong, T., Wu, H., Zou, Y., Wu, Q. and Kuča, K. 2019. Mycorrhizas induce diverse responses of root TIP aquaporin gene expression to drought stress in trifoliate orange. Scientia Horticulturae 243:64–69.
13. Khosrojerdi, M., Shahsavani, Sh., Gholipour, M. and Asghari, J. 2014. The effect of inoculation of rhizobium bacteria and mycorrhizal fungi on the absorption of some mineral elements by peas at different levels of iron sulfate fertilizer. Crop Production Journal. 6(3): 71-87. (inpersian).
14. Larimer, A.L., Clay, K. and Bever, J.D. 2014. Synergism and context dependency of interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia with a praire legume. Ecology 95:1045–1054.
15. Mahmoudzadeh, M., RassouliSedghiani, M.H. and AsgariLagayer, M. 2015. The Effect of Rhizobacteria Growth Stimulator and Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Morphological Characteristics and High Contaminated Elements of Peppermint MenthaPiperita L. in Greenhouse Conditions. Science and Technology of Greenhouse Crops 24(6):155-167.
16. Massa, N., Cesaro, P., Todeschini, V., Capraro, J., Scarafoni, A., Cantamessa, S., Copetta, A., Anastasia, F., Gamalero, E., Lingua, G., Berta, G. and Bona, E. 2020. Selected autochthonous rhizobia, applied in combination with AM fungi, improve seed quality of common bean cultivated in reduced fertilization condition. Applied Soil Ecology 148: 202-222.
17. Moradi, S., Besharati. S., Feiziasl, V. and Sheikhi, J. 2018. The effect of drought stress and treatments of arbuscular root fungi and rhizobium on the concentration of nutrients in roots, shoots and soil in chickpea cultivation. Science and Technology of Greenhouse Cultivation. 8(2):13-24. (in Persian).
18. Muangthong A., Youpensuk S., Rerkasem B. 2015. Isolation and characterisation of endophytic nitrogen fixing bacteria in sugarcane. Tropical Life Sciences Research. 26:41-51.
19. Oliveira, R., Carvalho, P., Marques, G., Ferreira, L., Nunes, M., Rocha, I., Ma, Y., Carvalho, F., Vosátka, M. and Freitas, H. 2016. Increased protein content of chickpea (*Cicer arietinum* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen-

fixing bacteria under water deficit conditions. Society of Chemical Industry 65:145-161.
20. Pellegrino, E., Öpik, M., Bonari, E. and Ercoli, L. 2015. Responses of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi: a meta-analysis of field studies from 1975 to 2013. Soil Biology and Biochemistry 84:210–217.
21. Rejali, F. 2018. Familiarity with mycorrhizal fungi and their use in different ecosystems. Soil and Water Research Institute. No 110. (inpersian).
22. Sabaghpour, S.H., Mahmodi A.A., Saeed A., Kamel, M. and Malhotra, R.S. 2006. Study on chickpea drought tolerance lines under dryland condition of Iran. Indian j. Crop Science 1:70-73.
23. Smith, S.E. 2002. Soil microbes and plants-raising interest, mutual gains. New Phytologist 156:142–144.
24. Soumare, A., Diop, T., Manga, A. and Ndoye, I. 2015. Role of arbuscular mycorrhizal fungi and nitrogen fixing bacteria on legume growth under various environmental stresses. International Journal of Biosciences 7(4):31-46.
25. Stancheva, M., Geneva, G., Zehirov, G., Tsvetkova, M., Hristozkova, G. and Georgiev, M. 2006. Effects of combined inoculation of pea plants with Arbuscular Mycorrhizal fungi and Rhizobium on nodule formation and nitrogen fixing activity. Plant Physiology 61-66.
26. Tavassoli, A., Ali asgharzad, N., Salehijozani, Gh. and Asgharzadeh, A. 2017. Study of nutrient uptake in tripartite symbiosis of chickpea with mycorrhizak fungi and rhizobium bacteria. The 6th National Conference on Grains in Iran. (in Persian).
27. Togay, N., Mesut Cimrin, C. and Turan, M. 2008. Effects of rhizobium inoculation, sulfur and phosphorus applications on yield, yield components and nutrient uptakes in chickpea (Cicer arietinum L.). Afr J Biotechnol. 7(6):776-782.
28. Trung, B.Ch. and Yoshida, Sh. 1983. Improvement of Leonard jar assembly for screening of effective rhizobium. Soil Science and Plant Nutrition. 29(1) 97-100.
29. Volpiano, C.G., Lisboa, B.B., Brilhante J.F., Rotta de diveira, A.M., Beneduzi, A., Pereirapassaglia, L.M. and Vargas, L.K. 2018. Rhizobium strains in the biological control of the phytopathogenic fungi Sclerotium (Athelia) rolfsii on the common bean. Plant Soil 432:229-243.
30. Yadav, A.N. 2020. Plant microbiomes for sustainable agriculture: current research and future challenges. Springer Nature 475-482.
31. Yadav, S.S., Redden, R., Chen, W. and Sharma, B. 2007. Chickpea breeding and management. CABI Books (digital library) 1-13.