

اثر تلقیح فرانکیا بر رشد، تغذیه معدنی و تثبیت نیتروژن در توسکای قشلاقی

احسان کهنه^۱، امیر لکزبان^{۲*}؛ علیرضا آستارایی^۳، کاظم خاوازی^۴

۱. دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. استاد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳. دانشیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴. دانشیار، مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۲۳

چکیده

توسکای قشلاقی با اکتینومیست فرانکیا همزیست بوده و قادر به تثبیت زیستی نیتروژن و تأمین نیاز خود است؛ بنابراین شناسایی جدایه‌های کارآمد فرانکیا با توانایی زیاد تثبیت نیتروژن، برای افزایش رشد و بهبود وضعیت تغذیه‌ای توسکای قشلاقی ضروری است. بدین منظور ۲۵ گره ریشه‌ای فرانکیا از ریشه درختان توسکای قشلاقی در نقاط مختلف استان گیلان برداشت شد. سوسپانسیون گره‌ها در شرایط گلخانه‌ای به نهال‌های رشد کرده در شن استریل تلقیح شد. پس از ده هفته گیاهان برداشت شده و خصوصیات رویشی، تغذیه‌ای و مقدار نیتروژن تثبیت شده در آنها اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که بیشتر گره‌های ریشه‌ای سبب بهبود خصوصیات رویشی و تغذیه‌ای نهال‌ها نسبت به شاهد شده‌اند. مقدار نیتروژن تثبیت شده در نهال‌ها از ۰/۰۱۷ تا ۰/۳۳۷ میلی‌گرم نیتروژن در میلی‌گرم گره متغیر بود؛ بیشترین مقدار نیتروژن در نهال‌های تلقیح شده با تیمار *Alnus glutinosa* 6 تثبیت شده است. همبستگی مثبت و معنی‌داری بین وزن گره، زیست توده گیاه و غلظت عناصر غذایی گیاه وجود داشت که بیانگر اثر مثبت تلقیح میکروبی است. با توجه به نتایج می‌توان گفت که برای رشد بهتر و کمک به استقرار نهال‌های توسکا، تلقیح آنها با جدایه یا سویه‌های مناسب فرانکیا ضرورت دارد. بر این اساس تیمار AG6 اثر بهتری بر رشد گیاهان دارد و می‌توان برای تکثیر و مطالعات بعدی از آن استفاده کرد.

واژگان کلیدی: توسکای قشلاقی، فرانکیا، گره ریشه‌ای، نیتروژن تثبیت شده.

مقدمه

به‌نام *Alnus glutinosa* Sp barbat (c.a.m) (Yaltrick, 1967) در جنگل‌های کم‌ارتفاع شمال ایران انتشار دارد. توسکا جزو گونه‌های گیاهی پیشاهنگ است و به‌دلیل توانایی تثبیت نیتروژن به‌عنوان کشت اصلی یا یک گونه همراه و یاور در خاک‌های با حاصلخیزی کم یا اراضی تخریب شده به‌خوبی استقرار می‌یابد [۱] و به تشکیل جوامع گیاهی کمک می‌کند؛ بنابراین با توجه به اهمیت اقتصادی و اکولوژیکی این گونه، شناسایی روش‌های افزایش توان سازگاری و استقرار بهتر و عملکرد بیشتر این گونه برای

توسکای قشلاقی (*Alnus glutinosa* (L.) Gaerth) بومی اروپا و شمال غربی آسیاست و در جلگه‌ها و جنگل‌های کم‌ارتفاع انتشار دارد. ارتفاع ۲۰۰ تا ۳۰۰ متر حد نهایی رویش آن است، بیشتر در بستر رودخانه‌های نیمه‌دائمی، حاشیه و دیواره رودخانه‌ها، مزارع، بیشه‌ها و مناطق نیمه‌باتلاقی و آب‌گرفته رشد می‌کند و یک زیرگونه از آن

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱-۳۸۸۰۵۸۴۴

Email: lakzian@ferdowsi.um.ac.ir

که مقدار تثبیت نیتروژن در خاک جنگل توسط پروکاریوت‌های آزادی حد اکثر ۱ کیلوگرم و برای همیارها حد اکثر ۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در سال گزارش شده است. از دیدگاه اکولوژیکی نیز برهمکنش فرانکیا-توسکا بسیار مهم است، زیرا این همزیستی در سراسر جهان از قطب شمال تا استوا وجود دارد. رابطه همزیستی فرانکیا با توسکای قشلاقی نیز گزارش شده است [۲]. مطالعات متعددی هم در زمینه کارایی سوبه‌های فرانکیای همزیست با توسکا و همچنین درباره اثر کاربرد زادمایه فرانکیا بر رشد توسکای قشلاقی انجام گرفته است [۴، ۶].

تاکنون درباره تأثیر اکتینومایست‌های تثبیت کننده نیتروژن بر درختان جنگلی (نهاندانگان دولپه‌ای غیر لگومینوز) تحقیقی در ایران صورت نگرفته است. بیشترین کارهای تحقیقی در کشور روی باکتری‌های همزیست تثبیت کننده نیتروژن از نوع ریزوبیوم با گیاهان لگومینوز مرتعی و زراعی است. در دیگر نقاط جهان تحقیقات وسیعی درباره اکتینومایست‌های تثبیت کننده نیتروژن همزیست با فرانکیا صورت گرفته است. اثر زادمایه غده خردشده بر رشد نهال اکتینوریزی در مکان تهیه غده مؤثرتر از دیگر مکان‌ها بوده است [۷]. گزارش شده که تلقیح غده‌های خردشده ریشه‌ای فرانکیا روی نهال‌های توسکا در خاک خزانه سبب افزایش تعداد و اندازه گره‌های ریشه‌ای و همچنین افزایش رشد نهال شده است [۶]. تحقیقات نشان داد که تلقیح برخی از گونه‌های توسکا با زادمایه‌های فرانکیای CPI3 و ARI7 در خزانه موجب افزایش تعداد و اندازه غده‌های ریشه‌ای روی تمام گونه‌ها در مقایسه با شاهد شد؛ اما رشد نهال‌های توسکا در خزانه تفاوت معنی دار نداشت، ولی تلقیح سوش‌های فرانکیا به طور مداوم به مدت ۵ سال، موجب بهبود رشد نهال‌های توسکا در شرایط مزرعه شد [۸].

با توجه به اینکه استان گیلان یکی از رویشگاه‌های مهم درختان توسکاست و اکتینومایست‌های تثبیت کننده نیتروژن

حفظ محیط زیست، تولید چوب مورد نیاز صنایع و همچنین استفاده از آن در برنامه‌های حفاظتی بسیار ضروری است. در توده‌های جنگلی نیتروژن از عوامل اصلی محدودکننده رشد درختان است، از این رو در این زیست بوم‌ها، ریزجانداران تثبیت کننده نیتروژن می‌توانند تأثیر مهمی داشته باشند. گیاهان لگومینوز به‌عنوان گیاه میزبان در فرایند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، در خاک جنگل‌ها اهمیتی ندارند و گیاهان اکتینوریزی بسیار مهم‌اند. یکی از مهم‌ترین برهمکنش‌های ریزجانداران با گیاهان همزیستی بین تعدادی از اکتینومایست‌های تثبیت کننده نیتروژن از جنس فرانکیا و گیاهان چوبی غیرلگومی است. برخلاف همزیستی ریزوبیوم- لگومینوز که بیشتر گیاهان میزبان به یک خانواده تعلق دارد، فرانکیا قادر به ایجاد گره‌های ریشه‌ای در همزیستی با گیاهان اکتینوریزی هشت خانواده گیاهی است که بیش از ۲۰۰ گونه نهاندانه را شامل می‌شود [۲]، به‌علاوه گیاهان اکتینوریزی پراکنش جهانی دارند و بیشتر شامل درختان و درختچه‌های چوبی دولپه و چندساله‌اند. حدود ۴۰ میلیون تن یا ۳۱-۲۱ درصد از نیتروژن زیست بوم‌های خشکی را به طریق تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط زیست بوم‌های جنگلی نسبت می‌دهند [۳]. این آمارها قطعی نیست، ولی بر اهمیت و تأثیر تثبیت زیستی در بیلان جهانی نیتروژن در زیست بوم‌های جنگلی تأکید دارد. در توده جنگلی بیشترین مقدار تثبیت بیولوژیکی نیتروژن به همزیستی گیاهان اکتینوریزی نسبت داده می‌شود که از این میان همزیستی فرانکیا با میزبان توسکا اهمیت ویژه‌ای دارد. توسکا از درختانی است که با اکتینومایست‌های جنس فرانکیا همزیستی دارد و در نتیجه این همزیستی، غده‌های ریشه‌ای تشکیل می‌شود. این غده‌ها محل تثبیت نیتروژن مولکولی و تأمین کننده نیتروژن مورد نیاز رشد گیاه است [۴]. مقدار تثبیت نیتروژن ۳۰۰ کیلوگرم در هکتار در سال توسط همزیستی فرانکیا با توسکا گزارش شده است [۵]، درحالی

لوله اپندورف [۱] حاوی مقدار کمی آب مقطر استریل له شد. سپس سوسپانسیون حاصل با محلول ساکارز ۲ درصد به حجم رسانده [۱۲] و به این ترتیب ۲۵ نمونه مایه فرانکیا، برای تلقیح آماده شد.

تهیه بذر و تولید نهال توسکا

بذر از یک تک درخت توسکا جمع آوری شد. بذرها به مدت ده دقیقه با محلول هیپوکلریت سدیم (۱ درصد کلرین فعال) ضد عفونی شدند و سپس در پتری دیش‌هایی با ارتفاع ۳ میلی‌متر حاوی کاغذ صافی مرطوب در ژرمیناتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا جوانه بزنند [۴]. پنج بذر جوانه زده به هر گلدان پلاستیکی با حجم ۳ لیتر و پر شده با شن استریل منتقل شده و به صورت هفتگی تا یک هفته قبل از افزودن زادمایه، با محلول غذایی با غلظت کم نیتروژن (یک چهارم) آبیاری شدند [۱۳]. گیاهان در گلخانه با دمای روزانه ۲۸ و شبانه ۱۴ درجه سانتی‌گراد و روشنایی روزانه ۱۴ ساعت قرار داده شد و پس از دو هفته، نهال‌ها تنک شدند و یک نهال در هر گلدان باقی ماند.

طرح آزمایشی و بررسی اثر زادمایه فرانکیا بر رشد و

تغذیه توسکا

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی عبارت بود از: ۱. ۲۵ زادمایه به همراه یک شاهد؛ بعد از رسیدن نهال‌ها به شش هفتگی، حجم مساوی از سوسپانسیون زادمایه تهیه شده به اطراف ریشه نهال اضافه شد و نهال‌های شاهد نیز حجم مساوی از سوسپانسیون استریل شده دریافت کردند [۱۲]. دو هفته پس از تلقیح و هر هفته تا زمان برداشت، نهال‌ها با محلول غذایی ۱/۴ هوگلدن فاقد نیتروژن آبیاری شدند [۱۳]. طی این مدت شرایط رویشی گیاهان شامل تغییرات ارتفاع و قطر یقه اندازه‌گیری و ثبت شد. غده‌ها، و اندام‌های هوایی و زمینی گیاه بعد از ده هفته در مرحله رویشی برداشت

تأثیر مهمی در تثبیت نیتروژن و رشد درختان توسکا دارند، شناسایی و امکان کشت و تکثیر آنها در شرایط آزمایشگاهی به منظور تلقیح به خاک نهالستان‌های توسکا، روش مناسبی برای تولید نهال‌های قوی و شاداب است. این امر موجب می‌شود که استقرار و رشد نهال‌های توسکا در رویشگاه اصلی نیز اصلاح شود و بهبود یابد. متأسفانه تاکنون پژوهشی در زمینه جداسازی، شناسایی و کاربرد فرانکیای همزیست با توسکا در ایران انجام نگرفته است؛ از این رو این تحقیق، به منظور بررسی کارایی فرانکیای همزیست با توسکای بومی ایران برای توسعه فناوری تولید و کاربرد این ریزجانداران در رشد و تغذیه گیاه میزبان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری گره‌های فرانکیا

به منظور تهیه زادمایه فرانکیا، ۲۵ گره از ریشه‌های توسکای قشلاقی [۹] از استان گیلان جمع آوری شد (جدول ۱). مشخصات جغرافیایی هر منطقه با استفاده از دستگاه GPS ثبت شد. پس از انتخاب مکان مورد نظر، گره‌های جوان و فعال (رنگ روشن پوست) از یک تک درخت در هر مکان برداشت شد. پس از برداشت، غده‌ها در ظروف حاوی دستمال کاغذی مرطوب و در محفظه یخ به آزمایشگاه منتقل شد [۱۰]. در آزمایشگاه، خاک چسبیده به غده‌ها روی الک و زیر شیر آب به خوبی شسته شد و غده‌ها به مدت یک دقیقه با هیپوکلریت سدیم (۱ درصد کلرین فعال) و سپس آب اکسیژنه (۳۰ درصد) ضد عفونی سطحی شده و چندین بار با آب مقطر استریل آبکشی شدند. غده‌ها تا زمان استفاده در کیسه‌های پلی‌اتیلنی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۱].

تهیه زادمایه فرانکیا

مقدار مساوی (وزنی) از پره‌های^۱ هر گره جمع آوری شده (۲۵ عدد) به کمک تیغ جراحی استریل جدا شده و داخل

داشتند (جدول ۲). مقایسه میانگین قطر نهال‌ها نیز نشان داد که ۸۰ درصد از زادمایه نسبت به شاهد موجب افزایش ۳ تا ۴۰ درصدی قطر نهال شده است. بیشترین و کمترین قطر نهال به ترتیب با ۴/۷ و ۲/۹ میلی‌متر در تیمارهای AG4 و AG16 مشاهده شد (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که کاربرد ۱۹ عدد زادمایه نسبت به شاهد سبب افزایش وزن اندام هوایی به مقدار ۴ تا ۱۰۰ درصد شد؛ بیشترین کمترین افزایش وزن اندام هوایی به ترتیب با ۵/۹ و ۲/۱ گرم در تیمار AG6 و AG16 مشاهده شد. دیگر زادمایه‌ها بدون تأثیر بودند یا حداکثر سبب کاهش ۴ درصدی وزن هوایی در مقایسه با تیمار شاهد شدند (جدول ۲). با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که به جز تیمار AG19 که سبب کاهش ۵۵ درصدی وزن ریشه شد، دیگر مایه‌های تلقیح سبب افزایش ۳۶ تا ۳۰۰ درصدی وزن ریشه در مقایسه با شاهد شدند؛ بیشترین وزن ریشه با ۲/۹ گرم مربوط به تیمار AG6 است (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که وزن گره‌های ریشه‌ای با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشت و وزن گره‌ها بین ۰/۳ تا ۰/۹ گرم متغیر بود؛ بیشترین وزن گره در تیمار AG6 و کمترین وزن گره در تیمار AG19 مشاهده شد (جدول ۲).

تلقیح میکروبی اثر افزایشی معنی‌داری بر زی‌توده گیاه و وزن گره نشان داد. نهال‌های *Alnus* و *Alnus nitida* و *maritime* تلقیح‌شده با سوسپانسیون گره‌های خردشده توسکا در مقایسه با نهال‌های شاهد، رویش سریع‌تر و بیشتر و نیتروژن بیشتری داشتند [۷]. با توجه به اینکه ضرایب همبستگی بین خصوصیات رویشی و تغذیه‌ای گیاه مثبت و معنی‌دار است، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش رشد گیاهان تلقیح‌شده، ممکن است به دلیل افزایش کارایی جذب، افزایش قابلیت دسترسی عناصر و کارایی تلقیح میکروبی باشد.

شده و پس از توزین، برای آزمایش‌های بعدی در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شد. وزن خشک اندام هوایی، ریشه و غده، کارایی جذب (معادله ۱) [۱۴]، اثر تلقیح میکروبی [۱۵] (معادله ۲)، و مقدار نیتروژن تثبیت‌شده (معادله ۳) [۱۶] تعیین شد. غلظت نیتروژن کل موجود در نمونه‌های اندام هوایی به روش کج‌لدال اندازه‌گیری شد. برای تعیین غلظت فسفر و پتاسیم پس از هضم خشک نمونه‌ها و عصاره‌گیری با اسیدکلریدریک ۲ نرمال، مقدار فسفر به روش رنگ‌سنجی با وانادات فسفومولیدات با دستگاه اسپکتروفتومتر Apple PD303 و مقدار پتاسیم با قرائت با دستگاه فلیم‌فتومتر فاطرالکترونیک 610G اندازه‌گیری شد [۱۷].

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد؛ سپس تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین‌ها با بهره‌گیری از آزمون توکی در محیط SAS [۱۸] انجام گرفت.

نتایج و بحث

مشخصات جغرافیایی و نشانی مکان‌های جمع‌آوری گره‌های فرانکیای همزیست با توسکای قشلاقی در جدول ۱ ارائه شده است.

خصوصیات رویشی نهال‌ها

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد زادمایه فرانکیا در سطح آماری ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر خصوصیات رویشی نهال‌ها داشته است (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین و کمترین ارتفاع ۳۶/۷ و ۱۸/۳ سانتی‌متر به ترتیب در نهال‌های تلقیح‌شده با مایه AG8 و AG11 وجود دارد که با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند و افزایش حدود ۱۰۰ درصد ثبت شد؛ این تیمارها نسبت به شاهد به ترتیب ۴۷ و ۲۷ درصد افزایش و کاهش ارتفاع

$$(۱) \quad \text{مقدار عنصر در گیاه} = \frac{\text{کارایی جذب عنصر (میکروگرم در میلی گرم ریشه)}}{\text{وزن ریشه}}$$

$$(۲) \quad ۱۰۰ \times \frac{\text{وزن خشک گیاه تلقیح نشده} - \text{وزن خشک گیاه تلقیح شده}}{\text{وزن خشک کل گره‌ها در گیاه}} = \text{اثر تلقیح میکروبی (درصد)}$$

$$(۳) \quad \text{نیتروژن کل در گیاه تلقیح نشده} - \text{نیتروژن کل در گیاه تلقیح شده} = \frac{\text{نیتروژن تثبیت شده (میلی گرم در میلی گرم گره)}}{\text{وزن خشک کل گره‌ها در گیاه}}$$

جدول ۱. مختصات جغرافیایی نقاط نمونه برداری شده

موقعیت جغرافیایی (UTM)		نشانی	شهرستان	کد نمونه
Y	X			
۴۱۰۷۱۵۶	۴۳۱۳۰۱	جاده سلمان-املش	املش	AG4
۴۱۰۶۹۴۹	۴۲۲۹۶۸	جاده اطاقور-روبه روی کارواش آیدین	املش	AG5
۴۱۳۳۲۹۹	۴۰۹۰۳۶	صفرابسته	آستانه	AG6
۴۱۴۱۵۱۸	۴۱۱۳۳۹	بندر کیشهر- امیرکیاسر	آستانه	AG7
۴۱۴۱۷۴۶	۴۰۸۵۵۵	بندر کیشهر-جاده دهکده ساحلی	آستانه	AG8
۴۱۳۰۹۱۴	۴۰۵۵۶۷	نازکسرا- کنار مسجد ابوالفضل	آستانه	AG9
۴۱۳۲۲۱۷	۴۰۵۲۷۵	جاده لشت‌نشا- انبار کود	آستانه	AG10
۴۱۴۲۷۲۲	۴۰۹۷۲۸	بندر کیشهر- طرح سالم‌سازی	آستانه	AG11
۴۱۷۰۲۶۵	۳۳۳۱۴۹	اسالم سپاه بیل	تالش	AG12
۴۰۱۹۱۲۲	۴۶۳۲۳۳	روبه روی پایگاه هلال احمر	چابکسر	AG13
۴۰۹۳۰۷۶	۴۶۱۳۳۸	بعد از پل اصلی	چابکسر	AG14
۴۰۹۵۷۱۵	۴۵۶۰۱۴	روبه روی پل هوایی اول جاده قاسم‌آباد	چابکسر	AG15
۴۰۹۸۱۷۱	۴۵۲۷۸۰	جاده کلاچای-جنب هتل گیل ماز	چابکسر	AG16
۴۰۸۱۴۰۹	۴۷۸۳۶۹	کمربندی-روبه روی قایم کلایه	رامسر	AG17
۴۰۸۹۰۳۳	۴۶۷۴۷۷	جاده چابکسر-قبل از گل نرگس	رامسر	AG18
۴۱۳۹۳۹۴	۴۰۰۴۳۵	لشت‌نشا فخرآباد	رشت	AG19
۴۱۷۱۲۱۱	۳۰۲۵۰۵۸	گیسوم-پیلمبرا	رضوانشهر	AG20
۴۱۱۱۱۵۱	۳۹۴۷۵۸	جاده شاقاجی- کنار دکل مخابرات	سنگر	AG21
۴۱۱۰۶۳۳	۳۸۴۲۶۵	جاده شاقاجی	سنگر	AG22
۴۱۱۰۴۷۶	۴۰۴۵۷۳	جاده ازبرم	سیاهکل	AG23
۴۱۰۹۷۴۰	۴۳۱۱۱۵	جاده سلمان-املش	شلمان	AG24
۴۱۲۰۶۰۲	۳۴۷۷۶۰	جاده ماسوله-روبه روی دانشکده فنی	فومن	AG25
۴۱۲۰۳۵۶	۳۴۶۶۱۹	پیش حصار	فومن	AG26
۴۱۰۶۵۳۹	۴۲۰۶۵۴	اطاقور-جاده خرما	لنگرود	AG27
۴۱۰۹۷۶۰	۴۲۶۰۳۷	جاده مریدان- روبه روی ورودی بام سبز	لنگرود	AG28

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر جدایه‌های مختلف فرانکیا بر برخی خصوصیات رویشی و تغذیه‌ای نهال‌های توسکای قشلاقی

مکان	ارتفاع سانتی‌متر	قطر میلی‌متر	وزن خشک (گرم)			غلظت عناصر (درصد)			کارایی جذب (میکروگرم در میلی‌گرم ریشه)			اثر تلقیح میکروبی (درصد)
			ساقه	ریشه	گره	فسفر	پتاسیم	نیتروژن	فسفر	نیتروژن	پتاسیم	
شاهد	۲۵	۳/۳	۲/۴	۰/۶۶	۰/۰	۱/۶	۰/۴	۱/۲	۴۱/۴	۱۳/۱	۴۳/۶	۰/۰
AG4	۳۷/۳	۴/۷	۴/۱	۱/۷	۰/۷	۳/۲	۰/۸	۲/۲	۷۵/۵	۲۰/۰	۵۵/۱	۴۰/۸
AG5	۲۸	۳/۷	۴/۷	۱/۹	۰/۷	۳/۵	۱/۱	۳/۲	۸۷/۲	۲۸/۹	۸۲/۲	۴۷/۴
AG6	۲۹/۷	۴/۵	۵/۹	۲/۹	۰/۹	۴/۲	۱/۲	۳/۰	۸۵/۴	۲۳/۷	۶۰/۸	۵۹/۴
AG7	۳۱/۷	۴/۴	۳/۸	۰/۹	۰/۶	۳/۵	۰/۷	۱/۹	۱۶۱/۵	۳۱/۳	۸۴/۲	۳۷
AG8	۳۶/۷	۴/۶	۳/۸	۱/۶	۰/۶	۳/۸	۰/۷	۱/۹	۸۹/۴	۱۷/۱	۴۵/۸	۳۷/۷
AG9	۳۲/۷	۴/۴	۴/۱	۱/۶	۰/۷	۴/۰	۰/۸	۲/۲	۱۰۵/۹	۲۲/۰	۵۹/۶	۴۲/۳
AG10	۲۶/۳	۳/۹	۲/۷	۱/۲	۰/۵	۴/۶	۰/۷	۲/۲	۱۰۳/۵	۱۴/۹	۵۰/۳	۱۱/۵
AG11	۱۸/۳	۳/۰	۲/۷	۰/۹	۰/۵	۳/۸	۰/۷	۱/۹	۱۲۳/۸	۲۱/۶	۶۱/۲	۱۲/۴
AG12	۲۲	۳/۵	۳/۳	۰/۹	۰/۵	۴/۱	۰/۸	۲/۱	۱۵۱/۸	۲۹/۰	۷۷/۲	۲۷/۳
AG13	۲۱/۵	۴/۵	۲/۹	۱/۱	۰/۵	۳/۶	۰/۶	۱/۹	۱۰۰/۳	۱۷/۲	۵۴/۳	۱۷/۹
AG14	۲۰/۷	۴/۳	۲/۵	۱/۳	۰/۴	۳/۱	۰/۶	۱/۹	۶۰/۶	۱۰/۹	۳۶/۹	۶
AG15	۱۸/۷	۳/۱	۲/۲	۱/۱	۰/۳	۲/۷	۰/۵	۱/۷	۵۵/۵	۹/۹	۳۵/۶	۶/۷
AG16	۲۲	۲/۹	۲/۲	۱/۲	۰/۳۳	۲/۶	۰/۵	۱/۶	۴۸/۷	۸/۷	۲۹/۹	۹/۵
AG17	۳۲/۷	۳/۷	۲/۴	۰/۹	۰/۴	۲/۹	۰/۵	۱/۷	۸۵/۳	۱۴/۴	۴۹/۰	۳/۳
AG18	۳۰/۷	۴/۲	۳/۱	۰/۹	۰/۵	۳/۶	۰/۶	۱/۹	۱۲۹	۲۱/۶	۶۷/۱	۲۲/۱
AG19	۲۹	۳/۷	۲/۴	۰/۳	۰/۴	۲/۷	۰/۴	۱/۶	۲۱۳/۲	۳۶/۳	۱۲۷/۲	۱/۵
AG20	۲۷/۳	۳/۸	۲/۷	۱/۵	۰/۴	۳/۲	۰/۷	۲/۳	۵۶/۸	۱۱/۷	۴۰/۵	۱۰/۸
AG21	۲۶	۳/۸	۲/۹	۰/۹	۰/۵	۳/۵	۰/۵	۱/۷	۱۱۴/۵	۱۷/۸	۵۴/۶	۱۷/۲
AG22	۲۵	۲/۹	۳/۱	۰/۹	۰/۵	۳/۷	۰/۶	۲/۰	۱۳۴	۲۲/۹	۷۰/۴	۲۱/۷
AG23	۲۲/۵	۳/۸	۴/۷	۱/۰	۰/۳	۳/۷	۰/۵	۱/۸	۶۷/۷	۱۱/۹	۴۲/۱	۴۸/۱
AG24	۲۵	۳/۸	۲/۸	۰/۹	۰/۵	۳/۲	۰/۶	۲/۰	۱۰۰/۴	۱۸/۸	۶۳/۱	۱۴/۹
AG25	۲۶/۳	۴/۱	۲/۶	۱/۶	۰/۷	۲/۷	۰/۷	۲/۲	۹۲	۱۹/۱	۵۶/۲	۸/۶
AG26	۲۶/۳	۳/۸	۳/۸	۱/۸	۰/۶۳	۳/۲	۰/۷	۱/۹	۸۰/۹	۱۴/۵	۳۹/۴	۳۶/۱
AG27	۳۱/۳	۴/۲	۲/۱	۱/۳	۰/۳	۲/۵	۰/۵	۱/۷	۴۰/۳	۷/۳	۲۷/۱	۱۴/۷
AG28	۲۵/۳	۳/۳	۲/۷	۱/۵	۰/۴	۳/۲	۰/۶	۲/۲	۵۴/۳	۱۰/۹	۳۷/۱	۱۲
	P								<۰/۰۰۰۱			
	C.V%	۱۲/۲	۱۰/۸	۱۴/۲	۱۹/۲	۱۵/۰	۱۳/۵	۱۶/۶	۱۳/۲	۲۲/۲	۲۳/۱	۲۹/۹
	LSD	۱۰/۴۷	۱/۳۳	۱/۴۱	۰/۷۶	۰/۲۳	۱/۵	۰/۳۵	۰/۸۵	۶۸/۲	۴۱/۵	۲۰/۴

غلظت و کارایی جذب عناصر غذایی

با تجزیه واریانس مشخص شد که کاربرد زادمایه فرانکیا در سطح آماری ۱ درصد تأثیر معنی‌داری بر مقدار عناصر غذایی نهال‌ها داشته است (جدول ۲). بیشترین و کمترین غلظت نیتروژن به ترتیب با ۴/۶ و ۱/۶ درصد در نهال‌های تلقیح‌شده با مایه AG10 و شاهد وجود داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین‌ها نشان داد که غلظت نیتروژن در همه نهال‌های تلقیح‌شده با ۲/۵ تا ۴/۶ درصد بیشتر از نهال شاهد بود و افزایشی حدود ۵۶/۲ تا ۱۸۷/۵ درصد داشت. مقایسه میانگین

غلظت فسفر هم نشان داد که به‌جز زادمایه AG19، بقیه مایه‌های تلقیح، سبب افزایش ۲۵ تا ۲۰۰ درصدی فسفر گیاه شد (جدول ۲)، به‌طوری‌که تیمار AG6 با ۱/۲ درصد بیشترین مقدار فسفر را داشت. مایه‌های تلقیح فرانکیا سبب بهبود وضعیت پتاسیم در نهال‌ها شد. افزایش غلظت پتاسیم در نهال‌های تلقیح‌شده بین ۳۳ تا ۱۶۷ درصد متغیر بود، به‌طوری‌که بیشترین و کمترین غلظت پتاسیم به ترتیب با مقادیر ۳/۲ و ۱/۲ درصد در نهال‌های تلقیح‌شده با مایه AG5 و شاهد وجود داشت (جدول ۲).

[۱۹]. افزایش غلظت و مقدار تثبیت بیولوژیکی نیتروژن بعد از تلقیح فرانکیا هم می‌تواند بیانگر کارایی جدایه‌های مورد استفاده باشد. افزایش غلظت عناصر غذایی در نهال‌های تلقیح شده می‌تواند به‌عنوان مزیتی برای مقاومت گیاه در برابر تنش‌های محیطی استفاده شود.

اثر تلقیح میکروبی

با تجزیه واریانس داده‌ها مشخص شد که اثر تلقیح میکروبی بین تیمارها تفاوت معنی‌داری دارد، به‌طوری‌که اثر تلقیح میکروبی از ۱/۵ درصد در تیمار AG19 تا ۵۹/۴ درصد در تیمار AG6 افزایش داشت (جدول ۲).

مقدار نیتروژن تثبیت شده

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تلقیح با فرانکیا اثر معنی‌داری بر مقدار تثبیت زیستی نیتروژن دارد. مقدار نیتروژن تثبیت شده در نهال‌ها از ۰/۱۷ تا ۰/۳۳۷ میلی‌گرم نیتروژن در میلی‌گرم گره متغیر بود. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین مقدار نیتروژن در نهال‌های تلقیح شده با تیمار AG6 تثبیت شده است (شکل ۱).

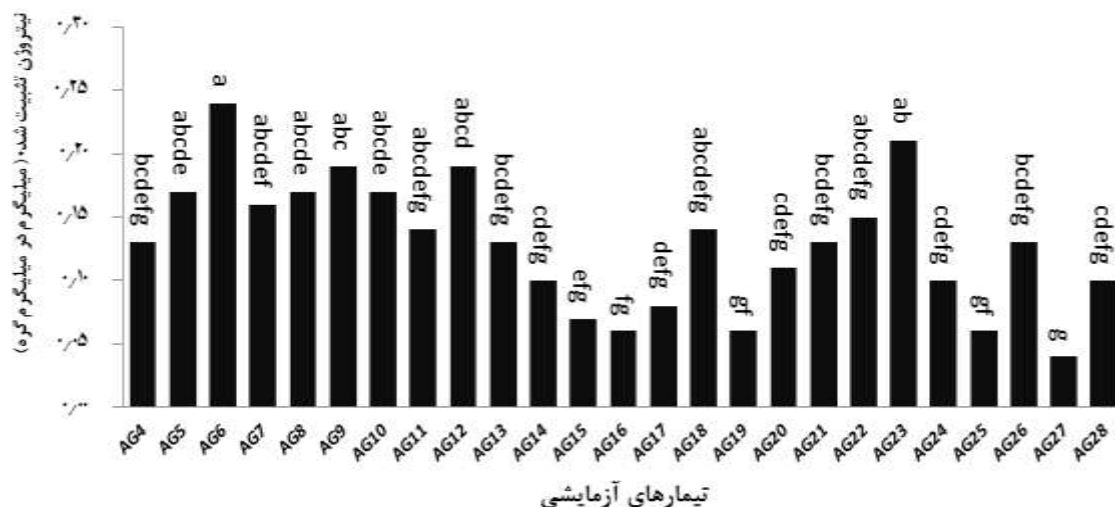
نتایج تجزیه واریانس نشان داد که کاربرد مایه‌های تلقیح فرانکیا اثر معنی‌داری بر کارایی جذب عناصر داشت (جدول ۲). کارایی جذب نیتروژن با کاربرد همه تیمارها به جز AG27 افزایش معنی‌داری داشت، به‌طوری‌که نسبت به شاهد کارایی جذب در نهال‌های تلقیح شده بین ۱۸ تا ۴۱۵ درصد بیشتر بود. کمترین و بیشترین کارایی جذب نیتروژن با مقادیر ۴۰/۳ و ۲۱۲/۳ درصد به ترتیب در تیمارهای AG19 و AG27 مشاهده شد. مقایسه میانگین کارایی جذب فسفر و پتاسیم هم نشان داد که نهال‌های تلقیح شده با AG19 به ترتیب با ۳۶/۳ و ۱۲۷/۲ درصد بیشترین کارایی جذب را داشتند (جدول ۲).

نمونه‌های فرانکیای جمع‌آوری شده از محل‌های مختلف، اثرهای مثبت و مفیدی بر تغذیه و کارایی جذب عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم داشتند. همه نمونه‌های بررسی شده سبب افزایش مقدار تثبیت نیتروژن در نهال‌های توسکا شدند. تلقیح همزمان با جداگانه فرانکیا و قارچ میکوریزی *Glomus intraradices* سبب افزایش معنی‌دار خصوصیات رویشی و وضعیت نیتروژن و فسفر در نهال‌های توسکای قشلاقی شد.

جدول ۳. ضرایب همبستگی بین خصوصیات رویشی و تغذیه‌ای نهال‌های توسکای قشلاقی

	تثبیت زیستی نیتروژن	کارایی جذب			اثر تلقیح	وزن گره پتاسیم	فسفر نیتروژن	وزن ریشه	وزن خشک اندام هوایی	قطر خشک یقه
		پتاسیم	فسفر	نیتروژن						
ارتفاع نهال	۰/۱۶	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۰۵	۰/۲۴	۰/۲۱	۰/۱۱	۰/۱۶	۰/۰۲	۰/۵۵
قطر یقه	۰/۲۸	۰/۱۱	۰/۱۵	۰/۰۴	۰/۱۰	۰/۲۶	۰/۲۲	۰/۲۶	۰/۱۵	۱
وزن خشک اندام هوایی	۰/۸۳	۰/۲۲	۰/۴۷	۰/۱۳	۰/۳۸	۰/۸۸	۰/۶۹	۰/۹۰	۰/۵۷	۱
ریشه وزن خشک	۰/۷۰	-۰/۳۴	-۰/۱۴	-۰/۴۶	۰/۱۴	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۳۶	۱
غلظت نیتروژن	۰/۸۷	۰/۱۳	۰/۳۰	۰/۳۶	۰/۱۳	۰/۶۴	۰/۳۸	۰/۵۴	۱	
غلظت فسفر	۰/۷۸	۰/۲۶	۰/۵۰	۰/۰۷	۰/۳۳	۰/۸۵	۰/۸۷	۱		
غلظت پتاسیم	۰/۶۱	۰/۲۱	۰/۳۱	-۰/۱۱	۰/۳۶	۰/۶۲	۱			
وزن گره	۰/۸۴	۰/۱۶	۰/۴۲	۰/۱۴	۰/۱۹	۱				
اثر تلقیح میکروبی	۰/۲۷	۰/۳۰	۰/۲۹	۰/۱۹	۱					
کارایی جذب نیتروژن	۰/۱۸	۰/۸۶	۰/۸۳	۱						
کارایی جذب فسفر	۰/۳۳	۰/۹۳	۱							
کارایی جذب پتاسیم	۰/۱۰	۱								

*معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد؛ * معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد



شکل ۱. مقایسه میانگین مقدار تثبیت نیتروژن در نهال‌های توسکای قشلاقی تلقیح‌شده با جدایه‌های مختلف فرانکیا (میانگین‌های با حروف مشابه در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند)

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که جدایه‌های مختلف فرانکیا در مجموع اثر مثبتی بر رشد و خصوصیات تغذیه‌ای نهال‌های توسکای قشلاقی دارند و به‌طور میانگین سبب افزایش حدود ۳۰ درصدی رویش قطری و ارتفاعی نهال‌ها شدند. با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت برای رشد بهتر و کمک به استقرار نهال‌های توسکا، تلقیح آنها با جدایه یا سویه‌های مناسب فرانکیا ضرورت دارد. بر این اساس تیمار AG6 اثر بهتری بر رشد گیاهان داشت و برای تکثیر و مطالعات بعدی می‌توان از آن استفاده کرد.

ضرایب همبستگی بین صفات

ضرایب همبستگی پیرسون بین خصوصیات رویشی، تغذیه‌ای و بیولوژیکی نهال‌های توسکای تلقیح‌شده با جدایه‌های مختلف فرانکیا در جدول ۳ ارائه شده است. مشاهده می‌شود که وزن گره و تلقیح میکروبی اثر مثبت معنی‌داری بر مقدار تثبیت زیستی نیتروژن دارند. همبستگی مثبت و معنی‌داری هم بین وزن گره، زی‌توده گیاه و غلظت عناصر غذایی گیاه وجود دارد که بیانگر اثر مثبت تلقیح میکروبی است. وجود همبستگی بیانگر این است که تثبیت نیتروژن به فتوسنتز گیاهی وابسته است [۲۰].

References

- [1]. Benson, D.R. (1982). Isolation of Frankia Strains from Alder Actinorhizal Root Nodules. *Applied Environmental Microbiology*, 44(2): 461-465.
- [2]. Benson, D.R., and Silvestre, W.B. (1993). Biology of Frankia strains, actinomycete symbionts of actinorhizal plants. *Microbiological Reviews*, 57(2): 293-319.
- [3]. Burns, R.C., and Hardy, R.W.F. (1975). Nitrogen fixation in bacteria and higher plants. Springer-Verlag, New York.
- [4]. Wolters, D.J., Akkermans, A.D.L., and Van Dijk, C. (1997). Ineffective Frankia Strains in wet stands of *Alnus Glutinosa* L. Gaertn. In the Netherlands. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(11-12): 1707-1712.
- [5]. Newton, M., El Hassen, B.A., and Zavitkovski, J. (1968). Role of red alder in western Oregon forest succession. In: "Biology of Alder". U.S. Department of Agriculture., Forest Service. Pacific Northwest Forest Range Experiment Station, Portland, Oregon, 73-83.

- [6]. Wheeler, C.T., Hollingsworth, M.K., Hooker, J.E., McNeill, J.D., Mason, W.L., Moffat, A.J. and Sheppard, L.J. (1991). The effect of inoculation with either cultured Frankia or crushed nodules on nodulation and growth of *Alnus rubra* and *Alnus glutinosa* seedlings in forest nurseries. *Forest Ecology and Management*, 43(1-2): 153-166.
- [7]. Schrader, J.A., and Graves, W.R. (2008). Nodulation and Growth of *Alnus nitida* and *Alnus maritima* Inoculated with Species-specific and Non-specific Frankia. *Journal of Environmental Horticulture*, 26(1): 29-34.
- [8]. Moffat, A.J. (2000). Effect of inoculation with Frankia on the growth and nutrition of alder species and interplanted Japanese larch on restored mineral workings. *Forestry*, 73(3): 215-223.
- [9]. Welsh, A.K., Dawson, J.O., Gottfried, G.J. and Hahn, D. (2009). Diversity of Frankia populations in root nodules of geographically isolated Arizona alder trees in central Arizona (United States). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21): 6913-6918.
- [10]. Myrold, D.D. (1994). Frankia and the Actinorhizal Symbiosis. In: *Methods of Soil Analysis, Part 2. Microbiological and Biochemical properties-SSSA Book Series, no.5.*, Soil Science Society of America, Madison.
- [11]. Vásquez, L., Pérez, N.O., and Valdés, M. (2000). Isolation and symbiotic characteristics of Mexican Frankia strains associated with *Casuarina*. *Applied Soil Ecology*, 14(3): 249-255.
- [12]. Reddell, P., Rosbrook, P.A., Bowen, G.D., and Gwaze, D. (1988). Growth response in *casuarina cunninghamiana* plantings to inoculation with Frankia. *Plant and Soil*, 108(1): 76-86.
- [13]. Hoagland, D.R., and Arnon, D.I. (1950). The water culture method for growing plant without soil. *California Agricultural Experiment Station: Circular, California*.
- [14]. Gray, J.T., and Schlesinger, W.H. (1983). Nutrient use by evergreen and deciduous shrubs in southern California. *Journal of Ecology*, 71: 43-56.
- [15]. Muthukumar, T., and Udaiyan, K. (2006). Growth of nursery-grown bamboo inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth promoting rhizobacteria in two soil types with and without fertilizer application. *New Forests*, 31(3): 469-485.
- [16]. NG, B.H. (1987). The effects of salinity on growth, nodulation and nitrogen fixation of *Casuarina equisetifolia*. *Plant and Soil*, 103(1): 123-125.
- [17]. Motsara, M.R. and Roy, R.N. (2008). *Guide to laboratory establishment for plant nutrient analysis*. FAO, Rome, Italy.
- [18]. SAS Institute (2003). *JMP: Statistics and graphics guide, version 5.1*. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- [19]. Oliveira, R.S., Castro, P.M.L., Dodd, J.C., and Vosatka, M. (2005). Synergistic effect of *Glomus intraradices* and Frankia spp. on the growth and stress recovery of *Alnus glutinosa* in an alkaline anthropogenic sediment. *Chemosphere*, 60(10): 1462-1470.
- [20]. Arnone, J.A., and Gordon, J.C. (1990). Effect of nodulation, nitrogen fixation and CO₂ enrichment on the physiology, growth and dry mass allocation of seedlings of *Alnus rubra* Bong. *New Phytologist*, 116: 55-66.

The effect of *Frankia* inoculation on growth, mineral nutrition, and N₂-fixation of *Alnus glutinosa*

E. Kahneh; Ph.D. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. Iran

A. Lakzian*; Prof., Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. Iran

A. Astaraii; Assoc. Prof., Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. Iran

K. Khavazi; Assoc. Prof., Soil and Water Research Institute, AREEO, Karaj, I.R. Iran

(Received: 30 May 2015, Accepted: 14 December 2015)

ABSTRACT

Frankia symbiosis with *Alnus glutinosa* improves the growth and nutrition of the host plant. Therefore, the establishment of high N₂-fixing activities, active nodule-forming populations of *Frankia* in soil is desirable. In this study, seedlings of *A. glutinosa* were inoculated with *Frankia* isolated from twenty-five root nodules of *A. glutinosa* in different sites of Guilan province, northern Iran. The seedlings were grown in pots filled with sterilized sand in a green-house. The seedling growth, N₂-fixation and nodulation were measured 10 weeks after inoculation. The inoculated seedling had higher dry weight of shoots, roots and nodules, and nutrients content compared to control. The N₂-fixing activity varied from 0.017 to 0.337 mg N mg⁻¹ nodules. The greatest N₂-fixing capacity was observed in seedlings inoculated with AG6 *Frankia* crushed nodules compared with other treatments. There was a significant positive correlation coefficient between nodule dry weight, plant biomass and nutrients contents, that resulted of microbial inoculation effects. The results revealed that introduced *Frankia* could improve the growth and N₂-fixation of *A. glutinosa*. Thus, selection true sources of inoculums that have a considerable influence to *A. glutinosa* and optimizing the sustainable production of these inoculums are needed. We concluded that AG6 had a superior effect on *A. glutinosa* seedlings and can be used for future studies.

Keywords: *Alnus glutinosa*, *Frankia*, N₂-fixation, Root nodule.

* Corresponding Author, Email: lakzian@ferdowsi.um.ac.ir, Tel: 05138805844