Archive of SID

مصرف کودهای زیستی حاوی باکتری‌های ریزوبیوم در اراضی زیر کشت لگوم‌ها (روش‌ها، پتانسیل‌ها، مزایا و محدودیت‌ها)

هوشنگ خسروی[1] و هادی اسدی رحمانی

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

hkhosravi@areeo.ac.ir

استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

asadi_1999@yahoo.com

چکیده

از زمان‌های قدیم لگوم‌ها در تناوب با سایر محصولات کشاورزی کاربرد داشته و حبوبات همواره بخش مهمی از سبد غذایی بشر بوده‌اند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های لگوم‌ها قابلیت ایجاد رابطه همزیستی تثبیت‌کنندگی نیتروژن با باکتری‌های ریزوبیوم است. مدیریت این رابطه همزیستی، گامی در جهت کشاورزی پایدار و حفظ سلامت محیط زیست است. حدود ۱۳۰ سال قبل باکتری ریزوبیوم در داخل گره لگوم کشف و جداسازی شد. چند سال بعد اولین کود زیستی حاوی باکتری ریزوبیوم به بازار عرضه شد. ریزوبیوم، اولین کود زیستی مورد استفاده در ایران بود که از دهه ۴۰ شمسی به کشور وارد و در کشت سویا مصرف شد. پژوهش‌ها در دهه‌های گذشته در ایران نشان می‌دهد که تلقیح لگوم‌ها با باکتری‌های ریزوبیوم سبب افزایش عملکرد آن‌ها می‌شوند. از دلایل نیاز به تلقیح باکتری‌های ریزوبیوم می‌توان به فقدان باکتری ریزوبیوم اختصاصی همزیست، جمعیت پایین ریزوبیوم و از بین رفتن باکتری و یا کارایی آن به علت عوامل تنشی اشاره کرد. کودهای زیستی ریزوبیومی به اشکال مایع، پودری و گرانول در حامل‌های معدنی یا آلی تولید و معمولاً به‌صورت تلقیح به بذر مورد استفاده قرار می‌گیرند. از پتانسیل‌های تولید و مصرف کودهای ریزوبیومی در ایران می‌توان به سطح زیر کشت قابل توجه لگوم‌ها، وجود زیرساخت‌های تولید در بخش خصوصی، وجود متخصصین و دانش‌های فنی لازم، افزایش اقبال عمومی به مصرف محصولات ارگانیک و وجود موارد حمایتی در اسناد بالادستی اشاره کرد. از مهم‌ترین محدودیت‌های مصرف کودهای زیستی می‌توان به وفور و زودبازده بودن کودهای شیمیایی، وجود برخی مشکلات در فرآیند تجاری‌سازی و آشنایی ناچیز و اعتماد کم مصرف کنندگان به این محصولات اشاره کرد. از راهکارهای توسعه مصرف کودهای زیستی حاوی باکتری‌های ریزوبیوم موارد زیر پیشنهاد می‌شود: بررسی خاک مناطق مختلف از نظروجود باکتری‌های ریزوبیوم همزیست با لگوم‌ها، بررسی ضرورت تلقیح بذر لگوم‌های مورد نظر با باکتری‌های ریزوبیوم همزیست مؤثر و کارا، بررسی امکان کشت لگوم‌های متناسب با شرایط اقلیمی در مناطقی که سابقه کشت لگوم ندارند، انجام پژوهش‌های بنیادی در رابطه با باکتری‌های بومی و موضوع رقابت با انواع وارد شده به خاک، انجام پژوهش‌های مولکولی به‌منظور افزایش کارآیی همزیستی لگوم‌ها و آموزش و ترویج از طریق رسانه‌های ارتباط جمعی و شبکه‌های اجتماعی در مورد مزایای مصرف کودهای زیستی ریزوبیومی.

واژه‌های کلیدی: مایه تلقیح، حبوبات، تثبیت نیتروژن

[1]- نویسنده مسئول، آدرس :کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی، ص .پ. ۳۱۱-۳۱۷۸۵

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

احتیاج کشورها به غذا، سالیانه در حال افزایش بوده به‌طوریکه که نسبت به قرن گذشته به افزایش ۱۰۰ درصدی تولید محصولات کشاورزی نیاز است. یکی از راه‌های اصلی برطرف کردن نیاز تغذیه‌ای محصولات کشاورزی، مصرف کودهای شیمیایی می‌باشد. گرچه کودهای شیمیایی به‌عنوان پرمصرف‌ترین نهاده‌های کشاورزی، به آسانی و به سرعت عناصر مورد نیاز گیاه را تامین نموده و موجبات رشد آن را فراهم می‌کنند با اینحال، از پتانسیل آلوده‌سازی بالایی برخوردار بوده و مصرف بی‌رویه و نامتعادل آنها موجب آلودگی هوا، آب, خاک، گیاه، دام و انسان می‌شوند. بنابراین ارائه راهکارهای مبتنی بر توسعه پایدار و توجه به حفظ سلامت محیط زیست برای افزایش تولید محصولات کشاورزی امری ضروری است. در اعصار گذشته، کشاورزان برای تقویت زمین‌های کشاورزی، گیاهان لگومینوز نظیر شبدر و باقلا را کشت می‌کردند و بر این باور بودند که با کشت این گیاهان میزان حاصلخیزی خاک افزایش پیدا می‌کند. از طرف دیگر، لگوم‌ها بخش جدایی‌ناپذیر از سبد غذایی هزاران ساله بشر بوده و در همه تمدن‌های قدیم، رژیم غذایی حاوی حبوبات به همراه غلات بخشی از تغذیه متعادل بوده است زیرا این دو گروه مهم گیاهی همه اسیدهای آمینه ضروری انسان و سایر نیازهای غذایی را فراهم می‌کنند. یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های لگوم‌ها، قابلیت ایجاد رابطه همزیستی تثبیت‌کنندگی نیتروژن با باکتری‌های ریزوبیوم است که اهمیت بسزایی در تأمین نیتروژن اکوسیستم‌های کشاورزی و منابع طبیعی دارد. کودهای شیمیایی، به دلایل مختلف از جمله قیمت پایین، نحوه کاربرد و استفاده راحت و همچنین سودآوری بیشتر در کوتاه مدت، مورد استقبال کشاورزان قرارگرفته‌اند. این در حالی است که به مسئله محیط‌زیست و آلودگی منابع آب و خاک و در نتیجه گیاه، دام و انسان در اثر مصرف غیراصولی این کودها توجهی زیادی نمی‌شود. یکی از روش‌های افزایش تولید محصولات کشاورزی استفاده از پتانسیل ریزجانداران مفید خاکزی است. کودهای زیستی فرآورده‌هایی هستند که حاوی تعداد مناسبی از یک یا چند ریزجاندار مفید و یا متابولیت‌های حاصل از فعالیت آنها می‌باشند که قادرند نیاز گیاه به یک و یا چند عنصر را تأمین و یا موجب افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌هایی همانند شوری، خشکی، گرما، سرما و عوامل بیماری‌زای گیاهی شوند. اولین کود زیستی با جداسازی باکتری‌های ریزوبیوم از گره‌های ریشه باقلا در سال ۱۸۹۶ در آمریکا و به شکل کشت آگاری در ظروف شیشه‌ای بسته‌بندی و به بازار عرضه شد. بعد از آمریکا کشورهای روسیه، کانادا و استرالیا نیز به تولید کودهای زیستی با استفاده از ریزجانداران مختلف پرداختند. هم‌اکنون شرکت‌های زیادی وجود دارند که کودهای زیستی تولیدی خود را به سراسر جهان عرضه می‌کنند. امروزه کودهای زیستی در بسیاری از محصولات کشاورزی در دنیا مصرف شده که سبب افزایش محصولی معادل ۲۵-۱۰ درصد می‌شوند بطوری‌که صرفه اقتصادی آن میلیاردها دلار در سال برآورد شده است. سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO)، کودهای زیستی را به عنوان یکی از منابع تأمین-کننده عناصر غذایی گیاهان به رسمیت شناخته است. از مهمترین و شناخته شده‌ترین ریزجانداران کودهای زیستی می‌توان به ریزوبیوم، ازتوباکتر، آزوسپیریلوم، سودوموناس، باسیلوس، تیوباسیلوس و قارچ‌های میکوریزی اشاره کرد.در این مقاله به اهمیت رابطه همزیستی لگوم‌ها و سابقه پژوهش، تولید و کاربرد باکتری‌های ریزوبیوم با تأکید بر روش‌ها، مزایا و محدودیت‌های مصرف آن‌ها به‌عنوان مایه تلقیح پرداخته می‌شود. درنهایت، راهکارهای پیشنهادی برای توسعه مصرف این فرآورده‌های زیستی ارائه خواهد شد.

جایگاه لگوم‌ها در زراعت در ایران

لگوم‌ها به علت دارا بودن ریشه عمیق، باعث افزایش نفوذپذیری خاک می‌شوند. این گیاهان سبب افزایش نیتروژن خاک شده و لذا برگرداندن آن‌ها به خاک فواید

www.SID.ir

Archive of SID

زیادی از نظر حاصلخیزی خاک دارد. لگوم‌ها را می‌توان به سه گروه دانه‌ای (حبوبات)، علوفه‌ای و درختی تقسیم بندی کرد. مجموع سطح زیر کشت لگوم‌های دانه‌ای و علوفه‌ای در ایران حدود ۱/۵ میلیون هکتار برآورد شده که حدود ۸۰۰ هزار هکتار آن (با تولید ۷۰۰ هزار تن در سال) به حبوبات اختصاص‌یافته و تقریباً نصف آن به‌صورت کشت آبی و نصف دیگر به‌صورت کشت دیم می‌باشد. بیشترین مقدار سطح زیر کشت لگوم‌ها در ایران به ترتیب متعلق به یونجه، نخود، عدس، لوبیا، شبدر و سویا می‌باشند. بیشترین سطح زیر کشت حبوبات با حدود ۶۳ درصد متعلق به نخود است. ازنظر میزان تولید، نخود با ۴۰ و لوبیا با ۳۵ درصد سهم در رتبه‌های اول و دوم هستند. لگوم‌های علوفه‌ای نیز غنی از پروتئین بوده و هضم پذیری خوبی برای دام‌ها دارند. سطح برداشت گیاهان علوفه‌ای در ایران حدود یک میلیون هکتار است. از کل سطح برداشت گیاهان علوفه‌ای، سهم یونجه و شبدر حدود ۷۰ درصد است (وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۹).

تناوب کشت با لگوم‌ها

تناوب کشت با لگوم‌ها فواید زیادی از جمله بهبود وضعیت فیزیکی خاک، بهره‌مندی محصول بعدی از نیتروژن باقی‌مانده لگوم و مدیریت بهتر بیماری‌ها، آفات و علف‌های هرز دارد. آزمایشات در مورد تناوب ذرت، ارزن، سورگوم با بادام‌زمینی و لوبیا چشم‌بلبلی در مناطق مختلف غرب آفریقا نشان داد که تناوب با بادام‌زمینی موجب افزایش ۲۶ تا ۸۵ درصدی وزن خشک کل در غلات مذکور شده است (بورکرت و همکاران، ۲۰۰۱). پژوهش‌های دانشگاه وندای آفریقای جنوبی در مورد اثر تناوب کود سبز و لگوم‌های بومی بر عملکرد ذرت نشان داد که افزایش عملکرد اندام هوایی ذرت بین ۰/۸ تا ۱۳/۸ و افزایش عملکرد دانه ۲/۶ تا ۱۰/۶ تن در هکتار بود ضمن اینکه میزان علف‌های هرز نیز در اثر تناوب با لگوم‌ها به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت (اودهیامبو و همکاران، ۲۰۱۰).

در پژوهشی سورگوم، ارزن و یولاف از خانواده گرامینه، شبدر سفید، شبدر قرمز، شبدر برسیم، اسپرس، ماشک و گاودانه از خانواده لگومینوز و منداب از خانواده براسیکاسه به عنوان کود سبز، بررسی و فرآیند تغییرات عناصر غذایی خاک بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان نیتروژن کل خاک مربوط به شبدر سفید و پنج ماه بعد از برگشت بقایای آن به دست آمد. در این پژوهش، گیاه شبدر سفید به دلیل نسبت کربن به نیتروژن پایین، افزایش میزان نیتروژن کل و معدنی قابل استفاده برای گیاه بعدی، به‌عنوان بهترین کود سبز در بین گیاهان مورد مطالعه معرفی شد (عبدی و همکاران، ۱۳۹۱).

فلاح و همکاران (۱۳۷۹) گزارش دادند که برگرداندن شبدر برسیم به خاک در تناوب با برنج موجب تأمین ۵۰ تا ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن مورد نیاز گیاه برنج شد. برآورد شده که افزایش عملکرد ناشی از محصولی که بعد از لگوم کشت می‌شود به‌طور کلی معادل افزایش ناشی از مصرف ۳۰ تا ۸۰ کیلوگرم N در هکتار کود شیمیایی نیتروژنی است.

ارتباط همزیستی تثبیت‌کنندگی نیتروژن بین باکتری‌های ریزوبیوم و لگوم‌ها

نیتروژن، عنصری ضروری و حیاتی و یکی از عناصر پرنیاز و مهم برای رشد گیاهان می‌باشد. بیش از ۷۸ درصد ترکیب گازی جو زمین را نیتروژن مولکولی (N_2) تشکیل می‌دهد که البته به این شکل برای گیاهان قابلیت استفاده ندارد. تثبیت زیستی نیتروژن فقط توسط انواعی از پروکاریوت‌ها انجام می‌شود که توانائی تولید آنزیم نیتروژناز را دارند. نیتروژناز، نقش یک کاتالیزور در احیای N_2 به NH_3 را بر عهده داشته و در دما و فشار معمولی عمل تثبیت را انجام می‌دهد (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). عمل تثبیت نیتروژن، به سه حالت آزادزی، همیار و همزیست انجام می‌شود. در حالت آزادزی، تثبیت نیتروژن، به طور مستقل یعنی بدون همکاری یک گیاه میزبان انجام می‌شود. در حالت همیاری، باکتری تثبیت‌کننده، تماس فیزیکی ساده با گیاه برقرار نموده ولی

www.SID.ir

Archive of SID

انـدام زیسـتی مشـترک و قابـل‌مشـاهده بـا گیـاه تشـکیل نمی‌دهد. در حالت همزیستی، باکتری در ارتبـاط نزدیکـی با گیاه بوده و با تولید اندام زیستی مشترک با گیاه قادر بـه تثبیت N_2 می‌باشد.

هر گونه ریزوبیوم قادر است فقط یـک یـا چنـد گونه لگوم خاص را آلوده نماید. گزارش‌شده کـه اسـتثنائاً بـاکتری *Sinorhizobium sp.* strain NGR234 قـادر است در ۱۱۲ جنس از لگوم‌ها ایجاد گره نماید (پوئپـک و بروگتـون، ۱۹۹۹). نـوع و تعـداد گونـه‌هـا و سـویه‌هـای ریزوبیوم که در لگوم‌های مختلف دارای توان ایجاد رابطـه همزیستی هسـتند مرتـب در حـال تغییـر اسـت (کلـوآ و همکاران، ۲۰۱۸؛ کویکندال، ۲۰۱۵).

از عوامل محدودکننده تثبیت نیتـروژن و ارتبـاط همزیستی می‌توان به رقابت باکتری‌های بومی خاک با نوع وارد شده برای ایجاد رابطه همزیستی با گیاه، تـوان ایجـاد آلودگی در میزان شوری، اسیدیته، دما، رطوبت، نیتـرات و آمونیوم خاک، کمبود یا سمیت عناصر و سموم کشاورزی، عدم وجود فتوسنتز کافی، بیماری گیاه میزبان، چرای دام‌ها و عدم وجود عناصری همانند کبالت اشاره نمود (زهـران، ۱۹۹۹).

سالانه حدود ۱۳۹ تا ۱۷۵ میلیون تن نیتروژن (N) توسط ریزجانداران دارای آنزیم نیتروژناز تثبیت می‌شود که حدود ۳۵ تا ۴۴ میلیون تن آن، مربوط به سیستم همزیستی است. مقدار تثبیت نیتروژن توسط سیستم ریزوبیوم- لگوم بین ۲۰۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم N در هکتار در سال است. مقدار تثبیت و ارزش اقتصادی آن در لگوم‌های مختلف در جدول ۱ با اندکی تغییرات آورده شده است (اسپانک و همکاران، ۱۹۹۸). در گزارش دیگری، مقدار سالیانه تثبیت نیتروژن در لگوم‌های زراعی و مرتعی به ترتیب با سطح ۱۸۵ و ۱۵۰ میلیون هکتار، ۴۰ میلیون تن تخمین زده شده است. این مقدار در استرالیا حدود سه میلیون تن در سال تخمین زده‌شده است (درو و همکاران، ۲۰۱۲). مقدار تثبیت نیتروژن در مقایسه با کل نیتروژن جذب‌شده در لگوم‌های مختلف در اروپا در جدول ۲ ارائه‌شده است (بادیلی و همکاران، ۲۰۱۴). در جدول ۳ مقدار نیتروژن جذب‌شده از اتمسفر در بررسی‌های آزمایشگاهی و مزارع کشاورزان نشان داده‌شده است (هریج و همکاران، ۲۰۰۸).

جدول ۱- نوع لگوم و مقدار تثبیت نیتروژن (با تغییراتی، اسپانک و همکاران، ۱۹۹۸)

نوع لگوم	میانگین N_2 تثبیت شده در هر فصل زراعی	میانگین نیتروژن بدست آمده از اتمسفر	ارزش اقتصادی ثبیت نیتروژن معادل قیمت کود نیتروژنی
	کیلوگرم در هکتار	درصد	دلار
لوبیا (*Phaseolus volgaris*)	۶۵	۴۰	۴۵
عدس (*Lens culinaris*)	۱۰۰	۶۳	۷۰
باقلا (*Vicia faba*)	۱۵۱	۸۰	۱۰۵
نخود فرنگی (*Pisum sativum*)	۷۲	۳۵	۵۰
سویا (*Glycine max*)	۱۲۰	۵۳	۸۴
بادام‌زمینی (*Arachis hypogaea*)	۱۱۴	۵۷	۷۹
شبدر قرمز (*Trifolium pretense*)	۱۷۰	۵۹	۱۱۹
شبدر سفید (*Trifolium repens*)	۱۷۲	۷۵	۱۲۰
یونجه (*Medicago sativa*)	۱۸۰	۷۰	۱۲۶
ماشک (*Vicia sativa*)	۱۳۰	۷۰	۹۱

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- مقدار تثبیت نیتروژن در مقایسه با کل نیتروژن جذب‌شده در لگوم‌ها در اروپا (بادیلی و همکاران، ۲۰۱۴)

	لوبیا	باقلا	نخود	عدس	باقلامصری	نخودفرنگی	سویا	ماش	سایر لگوم‌های دانه‌ای
	کیلوگرم N در ۱۰۰۰ کیلوگرم محصول تولیدی								
کل نیتروژن جذب‌شده	۶۴/۲	۸۹/۲	۸۹/۸	۹۰/۶	۸۴/۰	۶۳/۶	۱۰۶/۹	۹۴/۵	۸۲/۲
نیتروژن تثبیت‌شده	۲۸/۴	۶۸/۷	۴۴/۹	۶۳/۴	۶۸/۹	۴۴/۵	۵۵/۶	۶۸/۰	۵۳/۸
بالانس نیتروژن	-۹/۴	۲۳/۹	۱۱/۴	۱۹/۲	۱۴/۱	۶/۱	-۵/۶	۲۳/۵	۷/۷

جدول ۳- درصد نیتروژن حاصله از تثبیت زیستی در حبوبات مختلف (هریج و همکاران، ۲۰۰۸)

نوع حبوبات	در طرح‌های آماری	در مزارع کشاورزان
باقلا	۷۵	۶۸
سویا، بادام‌زمینی	۶۸	۵۸
نخود، عدس، ماش، نخودفرنگی، لوبیا چشم‌بلبلی	۶۳	۶۵
لوبیا	۴۰	۳۶

جدول ۴- طبقه‌بندی باکتری‌های ریزوبیوم بر اساس سیستم برگی[2] تا سطح جنس (کویکندال، ۲۰۱۵)

ارکان طبقه‌بندی	جایگاه ریزوبیوم طبقه‌بندی	جنس (Genus)
قلمرو (Domain)	Bacteria	
سلسله (Kingdom)	Bacteria	
شاخه (Phylum)	Proteobacteria	
رده (Class)	Alpha-proteobacteria	
راسته (Order)	Rhizobiales	
خانواده (Family)	Bradyrhizibiacea	Bradyrhizobium
	Hyphomicrobiaceae	Azorhizobium
	Phyllobacreiaceae	Mesorhizobium
	Rhizobiaceae	Rhizobium Allorhizobium Sinorhizobium

[2] - Bergy

www.SID.ir

Archive of SID

خصوصیات باکتری‌های ریزوبیوم و جایگاه طبقه‌بندی آن‌ها

باکتری‌های ریزوبیوم، میله‌ای شکل و گرم منفی بوده و معمولاً تحت شرایط رشدی مختلف دارای حالت-های پلی‌مورفیک هستند. این باکتری‌ها شیمیوارگانوتروف بوده و محدوده وسیعی از کربوهیدرات‌ها را به‌عنوان منبع کربن استفاده می‌کنند. دمای بهینه برای رشد باکتری‌های ریزوبیوم ۳۰-۲۵ درجه سانتیگراد و pH مناسب برای آن‌ها شش تا هفت است. ریزوبیوم‌ها هوازی بوده بطوری که اکسیژن در آن‌ها به‌عنوان پذیرنده نهایی الکترون عمل می‌کند. کلنی‌ها، دایره‌ای، محدب، برآمده و لعابی لزج است که معمولاً بعد از سه تا پنج روز در انواع تند رشد و شش تا هشت روز در انواع کند رشد قابلیت مشاهده شدن را دارند. ریزوبیوم‌ها با طیف وسیعی از گیاهان خانواده لگومینوز همزیستی اختصاصی دارند و عمدتاً در ریشه و در برخی لگوم‌ها در برگ یا ساقه آن‌ها تشکیل گره می‌دهند. باکتری در داخل گره فعال، حالت باکتروئید[3] دارد که می‌تواند نیتروژن را به شکل آمونیوم تثبیت نموده و در اختیار گیاه میزبان قرار دهد. باکتروئید به اشکال گرز مانند، گلابی و یا Y شکل دیده می‌شود (کویکندال، ۲۰۱۵). گره‌های فعال، گره‌هایی هستند که در درون آن‌ها یک پروتئین به رنگ صورتی به نام لگ-هموگلوبین تشکیل می‌شود (شکل ۱) که نشان از فعال بودن باکتری در درون گره است. گره‌های غیرفعال، مرده و پیر، معمولاً درونی سبز خاکستری یا قهوه‌ای رنگ دارند (پومرش و هانسن، ۲۰۱۷). از نظر تاکسونومیک، ریزوبیوم‌ها متعلق به سلسله باکتری‌ها، شاخه پروتئوباکتری‌ها، رده آلفاپروتئوباکتری‌ها و راسته ریزوبیال می‌باشند. راسته ریزوبیال مشتمل بر ۱۰ خانواده است که جنس‌های باکتری ریزوبیوم متعلق به چهار خانواده می‌باشند. طبقه-بندی فیلوژنی باکتری ریزوبیوم تا سطح جنس در جدول ۴ آورده شده است (کویکندال، ۲۰۱۵).

شکل ۱- گره فعال ریزوبیومی در ریشه سویا (پومرش و هانسن، ۲۰۱۷)

سابقه پژوهش، تولید و مصرف باکتری‌های ریزوبیوم به‌عنوان مایه تلقیح در کشت لگوم‌ها

در سال ۱۸۸۷ هلریگل و ولفارث در آزمایشات خود مشاهده کردند که در گره‌های موجود بر روی ریشه لگوم‌ها، تثبیت نیتروژن صورت می‌گیرد. ایشان، علت این موضوع را یک عامل عفونی، عنوان کردند. یک سال بعد یعنی در سال ۱۸۸۸ باکتری ریزوبیوم برای اولین بار توسط بیجرینک از گره ریشه‌ای جداسازی و کشف شد. اولین کود زیستی ریزوبیومی با جداسازی باکتری‌های ریزوبیوم از گره ریشه‌ای باقلا در سال ۱۸۹۵ توسط ناب و هیلتنر در آمریکا و به شکل کشت آگاری در ظروف شیشه‌ای بسته‌بندی و به بازار عرضه شد (لوپوایی و همکاران، ۲۰۰۸).

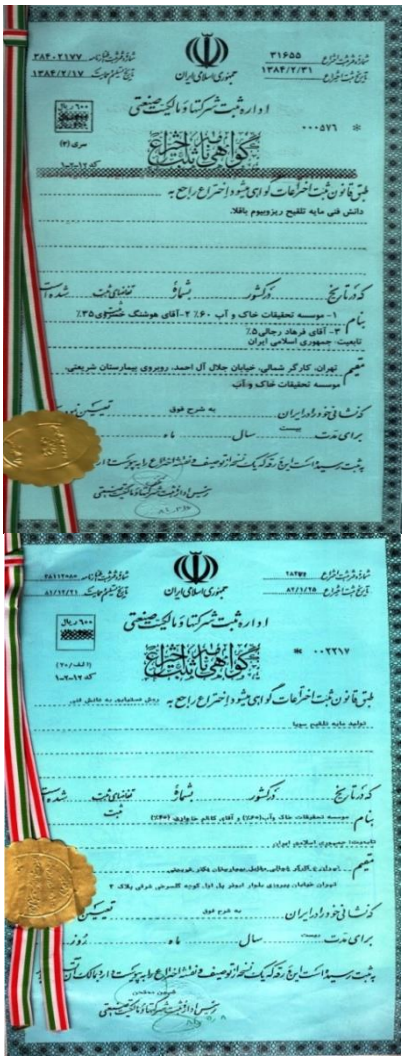
کودهای زیستی ریزوبیومی به‌عنوان اولین کودهای زیستی مورد استفاده در ایران هستند که بنام تجاری نیتراژین از سال ۱۳۴۰ به کشور وارد و در کشت سویا مصرف شدند. پژوهش ها در زمینه کودهای زیستی در ایران از دهه ۱۳۵۰ در مؤسسه تحقیقات خاک و آب آغاز شد. در آزمایشی سه ساله بر رشد سویا اثر چند سویه خارجی و بومی بررسی و گزارش شد که بیشترین عملکرد معنی‌دار از مصرف یک نوع مایه تلقیح وارداتی به دست آمد (سیستانی، ۱۳۷۱). گزارش‌شده در تناوب شبدر- برنج در خاک‌هایی که جمعیت باکتری‌های ریزوبیوم مناسب است علیرغم افت جمعیت در دوره

[3]- Bacteroid

www.SID.ir

Archive of SID

غرقاب، جمعیت در دوره غیرغرقاب جبران می‌شود و فقط در خاک‌های با جمعیت بسیار کم تلقیح جواب مثبتی می‌دهد (رجالی و صالح راستین، ۱۳۷۵). در سال ۱۳۷۵ با ایجاد بخش مستقل تحقیقات بیولوژی خاک در مؤسسه مذکور گام موثری در راه پژوهش ها کودهای زیستی در کشور برداشته شد که منجر به جداسازی، شناسایی و ارزیابی کارایی باکتری‌های یزوبیومی همزیست سویا، نخود، لوبیا، باقلا و یونجه شد. سویه‌های کارآمد ریزوبیوم طی آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای مطالعه و نتایج آنها در قالب دانش‌های فنی برای تولید انبوه به بخش خصوصی واگذار شدند (اسدی رحمانی، ۱۳۸۹). در شکل ۲ نمونه‌هایی از دانش‌های فنی ثبت شده مربوط به کودهای زیستی ریزوبیوم در ایران ارائه شده است.



شکل ۲- ثبت دانش فنی کود زیستی ریزوبیوم سویا و باقلا

مایه تلقیح سویا اولین کود زیستی ایرانی بود که در سال ۱۳۷۹ تولید و موجب قطع واردات مشابه خارجی آن شد. اثر چند نوع مایه تلقیح حاوی باکتری ریزوبیوم همزیست باقلا در خوزستان و مازندران نشان داد که تلقیح سبب افزایش عملکرد ۳۵ تا ۶۹ درصدی نسبت به شاهد شد (خسروی و همکاران، ۱۳۸۰؛ خسروی و رمضان‌پور، ۱۳۸۳). تلقیح لوبیا با سویه‌های ریزوبیوم بومی در ۱۲ استان ایران سبب نتیجه افزایش عملکرد دانه و سایر شاخص‌های رشد گردید (اسدی رحمانی، ۱۳۸۴). اثر تلقیح برادی ریزوبیوم، اوره و اثر وجین علف هرز بر سویا تاثیر قابل توجهی بر عملکرد و درصد پروتئین دانه داشت (راعی و همکاران، ۱۳۸۷). اثر دو نوع مایه تلقیح ریزوبیوم باقلا در مزارع کشاورزان در استان گلستان (جدول ۵) باعث افزایش عملکرد دانه شد (خسروی و همکاران، ۱۳۹۴).

تلقیح دو رقم لوبیا چیتی امیدبخش و لوبیا قرمز اختر و درخشان با ریزوبیوم نشان داد که صفات رشدی به‌ویژه در رقم چیتی بیشتر تحت تأثیر قرار گرفت و بیشترین افزایش عملکرد دانه نسبت به شاهد، ۶۰ درصد گزارش شد (طاهرخانی و همکاران، ۱۳۸۸). تلقیح دو رقم لوبیای سفید و قرمز با چهار سویه ریزوبیوم نشان داد که عملکرد دانه و برخی دیگر از خصوصیات رشد به‌طور معنی‌داری با شاهد بدون تلقیح اختلاف نشان دادند (انصاری و همکاران، ۱۳۸۸).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- اثر دو نوع مایه تلقیح انتخابی در مزارع کشاورزان در استان گلستان (خسروی و همکاران، ۱۳۹۴)

وضعیت تلقیح	عملکرد دانه	افزایش عملکرد دانه	عملکرد کلش	افزایش عملکرد کلش	جذب نیتروژن کلش	افزایش جذب نیتروژن کلش
	کیلوگرم در هکتار	درصد	کیلوگرم در هکتار	درصد	کیلوگرم در هکتار	درصد
تلقیح با سویه ۱	۲۶۵۵	۱۰/۵	۲۴۳۸	۱۶/۵	۱۶۱	۵۸
بدون تلقیح	۲۴۰۲	–	۲۰۹۲	–	۱۰۳	–
تلقیح با سویه ۲	۲۲۳۶	۲۹	۲۵۱۴	۶۵	۱۶۶	۶۵
بدون تلقیح	۱۷۳۳	۱۵۲۳	–	۴/۰۲.	۶۱	–

روش بررسی کیفیت و کارایی کود زیستی حاوی باکتری‌های ریزوبیوم

در کشورهایی همانند فرانسه، کانادا، برزیل و اروگوئه برای ارزیابی و کنترل کیفی مایه تلقیح‌های ریزوبیومی سیستم‌های نظارتی ایجاد شده است. در استرالیا، آفریقای جنوبی و نیوزلند با ایجاد ساختارهای بر اساس مشارکت داوطلبانه توسط تولیدکنندگان، کار ارزیابی و کنترل کیفی مایه‌تلقیح‌های ریزوبیومی انجام می‌شود. در آمریکا و انگلیس موضوع کنترل کیفیت مایه تلقیح‌های تولیدی به خود تولیدکنندگان واگذارشده است (دیکر و همکاران، ۲۰۰۴). مسئولیت ارزیابی انواع کودها از جمله ریزوبیومی در ایران، بر عهده دفتر ثبت مواد کودی و کنترل کیفی است.

تعداد و جمعیت باکتری ریزوبیوم، اولین خصوصیتی است که در بررسی کیفیت یک کود زیستی ریزوبیومی لازم در نظر گرفته شود. در استرالیا استانداردهای حداقلی و مقادیر توصیه‌شده در هنگام کاشت لگوم‌های دانه‌ای برای انواع دانه‌درشت مانند باقلا، نخود و لوبیا 10^5، انواع دانه‌ریز مانند ماش و عدس، 10^4، لگوم‌های مرتعی دانه‌متوسط مانند شبدر و یونجه 10^3 و برای لگوم‌های مرتعی دانه‌ریز مثل شبدر سفید 5×10^2 سلول باکتری ریزوبیوم به ازای هر بذر است (جدول ۶).

در کانادا برای انواع دانه بذور درشت، متوسط و ریز به ترتیب، 10^5، 10^4 و 10^3 سلول باکتری ریزوبیوم به ازای هر بذر توصیه شده است. در ایران، استاندارد کودهای ریزوبیومی در سازمان ملی استاندارد به شماره ۲۲۳۰۲ به ثبت رسیده است. در این استاندارد، تعداد سلول باکتری ریزوبیوم ، 1×10^7 سلول باکتری در میلی‌لیتر برای انواع مایع و 5×10^7 در گرم برای انواع جامد در نظر گرفته شده است. بر اساس این استاندارد ویژگی‌های کودهای زیستی ریزوبیومی در فرمولاسیون‌های جامد و مایع باید مطابق با جدول ۷ باشد (سازمان ملی استاندارد، ۱۳۹۶).

برای تعیین تراکم جمعیت باکتری در مایه تلقیح‌های ریزوبیومی از روش شمارش کلنی در محیط کشت اختصاصی YEMA[4] حاوی قرمز کنگو استفاده می‌شود. باکتری‌های ریزوبیوم به دلیل جذب بسیار جزئی رنگ قرمز کنگو، کلنی‌های صورتی تا سفید و لعابی تشکیل می‌دهند، که حاشیه صاف دارند درحالی‌که سایر باکتری‌ها شدیداً رنگ قرمز کنگو را جذب می‌کنند و این مشخصه به تمایز اولیه ریزوبیوم از دیگر باکتری‌ها کمک می‌نمایند. مواد تشکیل دهنده محیط کشت YEMA حاوی قرمز کنگو[5] به‌صورت جدول ۸ است. تعداد سلول‌های قابل رشد باکتری‌های ریزوبیومی برحسب CFU/ml یا CFU/g کود تعیین و گزارش می‌شود. همچنین در ارزیابی مایه تلقیح‌های ریزوبیومی، ضروری است توانایی برقراری رابطه همزیستی باکتری و ایجاد گره در ریشه با گیاه لگوم بررسی شود. برای این منظور، درجه‌بندی گره از طریق تعداد گره‌های فعال ایجاد شده در گیاه هدف نسبت به شاهد تعیین و مشخص می‌شود. در جدول ۹ روش درجه‌بندی گره‌ها ارائه‌شده است.

4- Yeast Extract Mannitol Agar
5- Yeast Extract Mannitol Agar + Congo Red (YEMA)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۶- استاندارد حداقلی برای مایه تلقیح‌های ریزوبیومی در استرالیا (درو و همکاران، ۲۰۱۲)

ردیف	نوع مایه تلقیح	شمارش بلافاصله بعد از تولید	شمارش در طی دوره ماندگاری	انقضاء
۱.	پیت (CFU/g*)	$\geq ۱\times ۱۰^{۹}$	$\geq ۱\times ۱۰^{۸}$	۱×۱۰*
۲.	مایع (CFU/ml)	$\geq ۵\times ۱۰^{۹}$	$\geq ۱\times ۱۰^{۹}$	۶
۳.	گرانول (CFU/g)	$\geq ۱\times ۱۰^{۱۰}$	$\geq ۱\times ۱۰^{۱۰}$	۶
۴.	فریز-خشک (CFU/vial)	$\geq ۱\times ۱۰^{۱۲}$	$\geq ۵\times ۱۰^{۱۱}$	۶

CFU :Colony Forming Unit

جدول ۷- ویژگی‌کودهای زیستی ریزوبیومی بر اساس استاندارد ایران

ردیف	ویژگی		حد قابل‌قبول
۱	تعداد	جامد (در گرم)	حداقل ۵×۱۰^{۷}
		مایع (در میلی‌لیتر)	حداقل ۱×۱۰^{۷}
۲	کارایی		ایجاد گره‌های فعال تثبیت‌کننده نیتروژن
۳	آلودگی میکروبی*		در رقت $۱۰^{-۵}$ هیچ آلودگی مشاهده نشود

* بر روی محیط کشت گلوگز پپتون آگار

جدول ۸- محیط کشت YEMA

نام مواد*	مقدار
هیدروژن دی پتاسیم	۰/۵ گرم
منیزیم سولفات ۷ آبه[۷]	۰/۲ گرم
سدیم کلراید[۸]	۰/۱ گرم
عصاره مخمر[۹]	۰/۵ گرم
مانیتول[۱۰]	۱۰ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب مقطر	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

*۰/۱ ± ۶/۸= pH در ۲۵ °C

جدول ۹- روش درجه‌بندی گره‌ها برای لگوم‌ها (بک و همکاران، ۱۹۹۳)

درجه گروه‌بندی	توزیع و تعداد گره‌های مؤثر	
	در ناحیه تاج ریشه*	در سایر قسمت‌های ریشه
۰	۰	۰
۱	<۵	۰
۲	۵-۱۰	۰
۳	>۱۰	۰
۴	>۱۰	<۵
۵	>۱۰	>۱۰

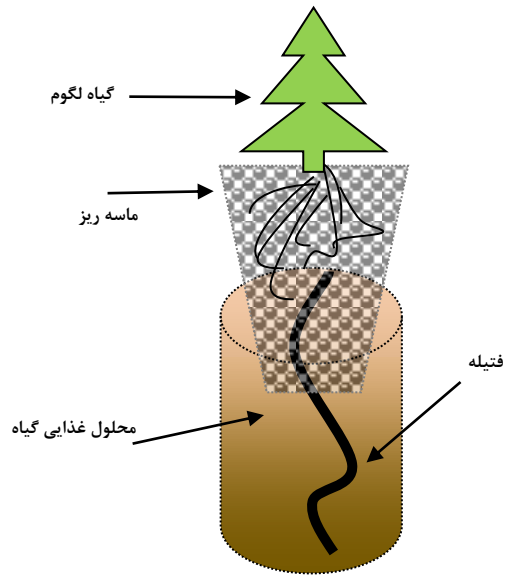
*تاج ریشه عبارت است از پنج سانتیمتر بالایی ابتدای ریشه

6- K_2HPO_4
7- $MgSO_4.7H_2O$
8- NaCl
9- Yeast Extract
10- Mannitol

www.SID.ir

Archive of SID

برای انجام آزمون گره‌زایی از ظرف لئونارد[11] استفاده می‌شود. در قسمت پایین ظرف لئونارد، محلول غذایی فاقد نیتروژن و در قسمت بالا، ماسه اسید شویی شده ریخته و انتهای آن با پنبه مسدود می‌شود. ارتباط این دو قسمت با استفاده از فتیله مناسب برقرار و سپس به مدت یک ساعت در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ °C استریل می‌شود. در شکل ۳ طرح شماتیکی از ظرف لئونارد نشان داده‌شده است. بذور گیاه لگوم موردنظر با ریزوبیوم تلقیح می‌شود. برای کنترل کیفی هر کود ریزوبیومی، ۱۰ عدد ظرف لئونارد در نظر گرفته می‌شود. همچنین ۱۰ عدد ظرف لئونارد نیز به‌عنوان شاهد (کشت بذر گیاه لگوم بدون تلقیح) در نظر گرفته می‌شود. ظروف لئونارد در گلخانه با نور مناسب ۱۶ ساعت روز و هشت ساعت شب و دمای ۲۸–۱۸ °C به مدت چهار تا شش هفته نگهداری و در پایان، وجود و یا عدم وجود گره بر روی ریشه بررسی می‌شود. وجود گره در ریشه گیاهان تلقیح شده حاکی از کارایی کود زیستی موردنظر در ایجاد گره می‌باشد. در این آزمایش، ظرف لئونارد شاهد، می‌بایستی فاقد گره باشد (سازمان ملی استاندارد، ۱۳۹۶).



شکل ۳- تصویر شماتیک ظرف لئونارد

مهم‌ترین موضوع در بحث کنترل کیفی مایه تلقیح‌های ریزوبیومی تعیین کارایی تثبیت نیتروژن است. برای این‌منظور، وزن خشک اندام هوایی در گیاهان تلقیح شده و شاهد اندازه‌گیری می‌شود. اگر وزن خشک گیاهان تلقیح شده در سطح پنج درصد آماری بیشتر از شاهد باشد، ریزوبیوم دارای کارایی مناسبی از نظر تثبیت نیتروژن می‌باشد. روش‌های دیگر تعیین تثبیت زیستی نیتروژن، استفاده از روش احیای استیلن و به‌طور دقیق‌تر روش نیتروژن ایزوتوپی است.

برای تعیین آلودگی میکروبی اعم از باکتریایی و یا قارچی در مایه تلقیح‌های ریزوبیومی از روش شمارش کلنی در محیط کشت گلوکز-پپتون-آگار[12] (GPA) استفاده می‌شود. باکتری‌های ریزوبیوم در این محیط کشت، قادر به رشد نبوده و بنابراین، هر ریزجانداری که در این محیط کشت رشد کند به‌عنوان آلودگی محسوب می‌شود. برای تعیین وجود آلودگی، از رقت 10^{-5}، ۰/۱ میلی‌لیتر روی سطح محیط کشت GPA ریخته شده و با استفاده از میله شیشه‌ای L شکل بر سطح محیط کشت پخش می‌شود. پلیت‌ها در دمای ۳۵ °C ±۲ °C به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شوند. پس از پایان مدت گرمخانه‌گذاری، حتی یک کلنی نباید بر روی محیط کشت GPA مشاهده شود (سازمان ملی استاندارد، ۱۳۹۶).

دلایل نیاز به تلقیح ریزوبیومی

ضرورت تلقیح لگوم با ریزوبیوم فقط با آزمایشات دقیق قابل اثبات است. با این‌حال از دلایل نیاز به تلقیح ریزوبیومی برای یک لگوم خاص می‌توان به نبود باکتری‌های ریزوبیوم اختصاصی در خاک، جمعیت کم، عدم کارایی باکتری‌های بومی در ایجاد رابطه همزیستی، از بین رفتن باکتری یا کارایی آن در اثر عوامل همچون شوری و خشکی‌های طولانی‌مدت و یا باکتریوفاژها و یک لگوم یا واریته جدید که قبلاً در آن مکان سابقه کشت نداشته اشاره کرد. گزارش شده که اگر جمعیت باکتری

11 - Leonard Jar

12- Glucose Pepton Agar (GPA)

www.SID.ir

Archive of SID

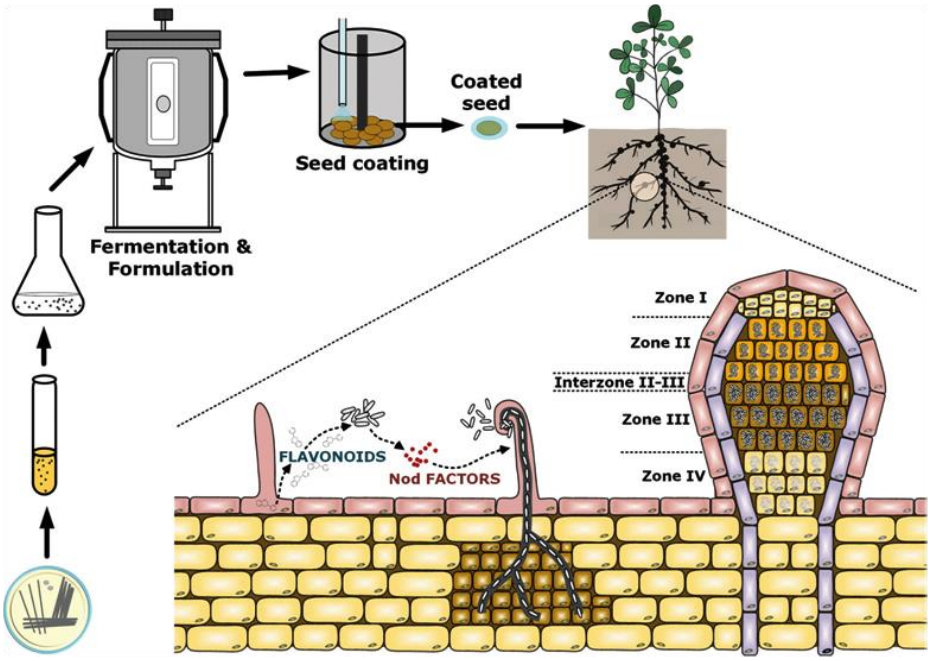
ریزوبیوم کمتر از ۱۰۰ سلول باکتری در گرم خاک باشد تلقیح می‌تواند مفید باشد (کاتروکس و همکاران، ۲۰۰۱). تلقیح هشت نوع لگوم در خاک‌های با ۱۰ تا ۱۰۰ سلول بر گرم خاک، مثبت و مؤثر گزارش شده است. به‌هرحال توصیه‌شده که برای موفقیت تلقیح باکتری‌های مؤثر و کارا با جمعیت بالا مورد نیاز است تا امکان رقابت با انواع غیر مؤثر بومی فراهم شود (دیکر و همکاران، ۲۰۰۴). در هنگام مصرف ممکن است مایه تلقیح به قطعات ماشین-های کارنده چسبیده شود که در اینجا نقش مواد چسباننده قوی روشن می‌شود (دیکر و همکاران، ۲۰۰۴). در خاک-های با pH اسیدی و یا در مواقعی که کود سوپرفسفات مصرف می‌شود برای محافظت از باکتری، پوشاندن سطح بذر تلقیح شده با کربنات کلسیم خیلی ریز توصیه شده است. کاتروکس و همکاران (۲۰۰۱) در یک مقاله مروری با عنوان روند تولید مایه تلقیح‌های ریزوبیومی و کاربرد آن گزارش دادند که به علت کیفیت نسبی پایین مایه تلقیح‌های تولیدی، ۹۰ درصد تلقیح‌های صورت گرفته هیچ تأثیری بر بهره‌وری لگوم‌های تلقیح شده نداشته است. حتی اگر مایه‌تلقیح هم کیفیت مطلوبی داشته باشد ولی باکتری ریزوبیوم عامل محدودیت نباشد باز هم تلقیح تأثیر نخواهد داشت. گزارش‌شده که در طی مدت ۱۰۰ سال از کشت لگوم‌ها در استرالیا هم‌اکنون خاک‌ها، حاوی جمعیت قابل‌توجهی از باکتری‌های ریزوبیوم هستند که قادرند در لگوم‌های کشت‌شده، گره ریزوبیومی تشکیل دهند. درهرحال در مناطقی که باکتری‌های ریزوبیوم توسط انواع بومی خاک تأمین می‌شود علیرغم اینکه ممکن است دارای تنوع زیادی باشند ولی به‌مرور زمان احتمال غیر مؤثر شدن آن‌ها وجود دارد (درو و همکاران، ۲۰۱۲).

حامل‌های مناسب برای تهیه کودهای زیستی ریزوبیومی

حامل، عبارت است از ترکیبی که قادر باشد ریزجاندار مورد نظر در مایه تلقیح یا کود زیستی را در یک جمعیت معین تا زمان مصرف نگهداری نماید. برای این منظور، یک حامل مناسب می‌بایستی دارای ظرفیت نگهداری رطوبت بالا و همچنین توان تأمین اکسیژن، ظرفیت بافری برای تنظیم اسیدیته، ظرفیت تبادل کاتیونی یا آنیونی، غیر سمی بودن برای باکتری ریزوبیوم، قابلیت استریل شدن آسان توسط اتوکلاو یا اشعه گاما، قابلیت دسترسی آسان، قیمت کم و قابلیت چسبیدن به سطح بذر را داشته باشد. رطوبت مناسب برای حامل در حدود ۶۰-۴۰ درصد است. برای هوادهی کافی، استفاده از نایلون-های پلی‌اتیلنی با ضخامت ۰/۵-۰/۲ میلی‌متر مناسب است. تورب ماده مناسبی برای تهیه حامل‌ها می‌باشد اما به دلیل فقدان تورب مناسب در غالب کشورها ازجمله ایران، مواد گوناگونی خاک اره، برگ و الیاف خرما، ملاس نیشکر، چوب بلال ذرت، سبوس و کاه و کلش گندم و برنج، آرد حبوبات؛ مواد معدنی همانند ورمی‌کولیت، پرلیت، بنتونیت، ماسه و گچ و مواد کربنی همچون زغال چوب، زغال سنگ و لیگنیت مورد آزمایش قرارگرفته‌اند. در ایران،پرلیت به علت وفور و قیمت پایین، به‌عنوان حامل برای تهیه مایه تلقیح پودری توصیه شده و مورد مصرف دارد. در شکل شماتیک ۴، چرخه زندگی باکتری ریزوبیوم از خاک تا تلقیح به گیاه ارائه شده است (دیکنزو و همکاران، ۲۰۱۸).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴- چرخه زندگی باکتری ریزوبیوم از خاک تا تلقیح به گیاه (دیکنزو و همکاران، ۲۰۱۸)

روش‌های مصرف و نکات لازم در به‌کارگیری کودهای زیستی ریزوبیومی

کودهای زیستی ریزوبیومی به اشکال مایع، پودری، گرانول، چیپس یا پودرهای فریز-خشک، فرموله شده و معمولاً به‌صورت آغشته کردن با بذر و در مواردی به‌صورت تلقیح خاکی هم مصرف می‌شوند. در طرح‌های پژوهشی جمعیت باکتری‌ها معمولاً به‌صورت تعداد باکتری در میلی‌لیتر یا گرم مایه تلقیح به ازای هر بذر گزارش می‌شود. در انواع تجاری برحسب کیلوگرم یا گرم برای انواع مایه تلقیح جامد و میلی‌لیتر یا لیتر برای انواع مایع توصیه می‌شود. نحوه مصرف کودهای زیستی در گزارشات مختلف، متفاوت است. همچنین کشاورزان در کشورهای مختلف، روش‌های مختلفی را بکار می‌برند که البته اثربخشی آن نیز متفاوت است. در مایه تلقیح‌های بر اساس حامل پیت در انواع مایه تلقیح به شکل جامد و پودری که چسبندگی به سطح بذر کم است (همانند پرلیت) نیاز است که قبل از تلقیح، سطح بذر با محلول یا ماده چسباننده مناسب آغشته و سپس مایه تلقیح به آن اضافه می‌شود. مواد چسباننده مورداستفاده شامل صمغ عربی[13] کربوکسیل-متیل سلولز، سلوفاز A (متیل سلولز)، پلی وینیل پیرووییدون[14]، روغن‌های گیاهی و محلول شکر ۲۰ درصد باشد (مینا و همکاران، ۲۰۱۷؛ دیکر و همکاران، ۲۰۰۴). در انواع مایه تلقیح به شکل مایع معمولاً به ماده چسباننده نیازی نیست. اختلاط، بذرها با مایه‌تلقیح، در سایه و دور از نور خورشید انجام می‌شود، زیرا نور خورشید باعث از بین رفتن باکتری ریزوبیوم می‌شود. نحوه اختلاط بذر، ماده چسباننده و مایه تلقیح با توجه به سطح کشت و یا مقدار بذر مورد نظر متفاوت خواهد بود. در حدود یک تا دو هکتار را می‌توان به روش تلقیح دستی و در پلاستیک‌های خیاری انجام داد بدین شکل که ابتدا بذر و ماده چسباننده با هم مخلوط و پس از به‌هم زدن کافی، مایه تلقیح نیز اضافه خواهد شد. پس از اختلاط کامل، بذور تلقیح شده قبل از کاشت، در سایه پهن شده و حدود یک ساعت هوادهی انجام می‌شود. در صورتی‌که سطح زیر کشت بیش از دو هکتار باشد به علت حجم زیاد بذور می‌توان از کارنده‌ها استفاده کرد و مایه تلقیح، محلول چسباننده و بذور را در مخازن

13 - Arabic gum
14 - Polyvinylpyrollidone

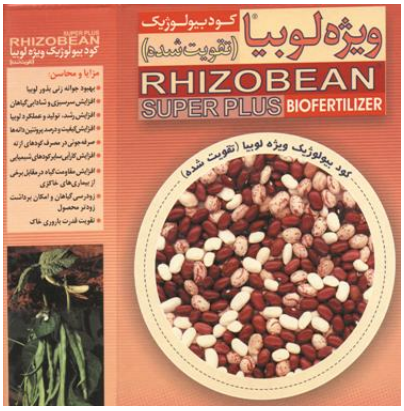
www.SID.ir

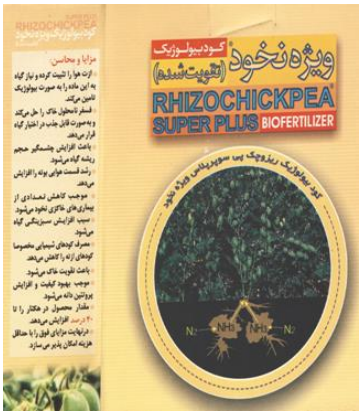
Archive of SID

مخصوص ریخته تا پس از اختلاط، عملیات کاشت انجام شود. در مواردی بذرها توسط مایه تلقیح، پیش تلقیح شده و با یک ماده پوشاننده سطح بذر تلقیح شده پوشانده می-شود. در هنگام تلقیح و یا انتقال و نگهداری مایه تلقیح، از قرار دادن آن در محیط گرم و یا مقابل نور خورشید خودداری شود. همچنین از اختلاط مایه تلقیح با هرگونه مواد و کودهای شیمیایی می‌بایستی خودداری شود.

جمعیت استاندارد مایه تلقیح ریزوبیوم در استرالیا ۱۰۹ سلول در گرم یا میلی‌لیتر مایه تلقیح است. مقدار مایه تلقیح ریزوبیوم توصیه‌شده در استرالیا به ازای حداکثر ۱۰۰ کیلوگرم بذر برای لگوم‌های با بذر ریز مانند یونجه و شبدر یک کیلوگرم و برای لگوم‌های با بذر متوسط همانند عدس، ماش، ماشک و خلر ۴۰۰ و برای انواع بذر درشت همانند باقلا، نخود، بادام‌زمینی و لوبیا، ۲۰۰ کیلوگرم مایه تلقیح توصیه شده است.

در ایران مقادیر مایه تلقیح ریزوبیوم برای لگوم-های مختلف دو کیلوگرم در هکتار توصیه‌شده است. در شکل ۵ دو نمونه کود زیستی ریزوبیوم تولید ایران و تحت لیسانس مؤسسه تحقیقات خاک و آب نشان داده شده است.





شکل ۵- مایه تلقیح ریزوبیوم ویژه لوبیا و نخود تولید ایران تحت لیسانس مؤسسه تحقیقات خاک و آب

محدودیت‌های تولید و مصرف کودهای زیستی ریزوبیومی در ایران

محدودیت‌های تولید و مصرف کودهای زیستی ریزوبیومی در ایران به شرح زیر است:

۱. وفور و قیمت کم کودهای شیمیایی.
۲. سابقه طولانی‌مدت مصرف کودهای شیمیایی و اعتماد بیشتر کشاورزان به اثرگذاری مثبت و معنی‌دار این کودها.
۳. سابقه کم‌مصرف کودهای زیستی و در نتیجه توان رقابت ضعیف با کودهای شیمیایی.
۴. عدم ارتباط مناسب بین بخش پژوهش، تولید و ترویج کشاورزی.
۵. وجود مشکلات در تجاری‌سازی از جمله نیاز به تجهیزات و ملاحظات خاص و هزینه بالای ایجاد آن.
۶. کاهش تعداد ریزوبیوم‌ها در حین انتقال و ذخیره‌سازی به دلایل حساسیت به شرایط محیطی از جمله دما.
۷. خشک شدن مایه تلقیح در سطح بذر.
۸. تماس با کودها و سموم، در هنگام استفاده بر روی بذر.
۹. عدم رعایت نکات فنی در فرآیند، توزیع و نگهداری محصول تولیدی از طرف برخی تولیدکنندگان و در نتیجه کیفیت پایین کود زیستی به دلایل مختلف.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰. عدم قطعیت، کارایی و اثربخشی مایه تلقیح‌ها به دلایل مختلف.

پتانسیل‌ها، فرصت‌ها و چشم‌انداز تولید و مصرف کودهای زیستی ریزوبیومی در ایران

سطح زیر کشت ۱/۵ میلیون هکتاری لگوم‌ها در ایران، پتانسیل خوبی برای تولید و مصرف کودهای زیستی حاوی باکتری‌های ریزوبیومی می‌باشد. وجود زیرساخت‌های لازم در بخش خصوصی برای تولید کودهای زیستی ریزوبیومی، وجود متخصصین مربوطه و دانش‌های فنی در این زمینه نیز فرصت و پتانسیل خوبی است. خوشبختانه مسئولین و دست اندرکاران امر به اهمیت تولید محصول سالم و همچنین لزوم حفظ محیط‌زیست واقف بوده بطوریکه چشم‌انداز این موضوع را امیدوارکننده‌تر می‌نماید. همچنین فرهنگ مصرف محصولات ارگانیک در بین مردم در حال افزایش است و این مسئله در اسناد ملی و بالادستی نیز منعکس‌شده است. در سند چشم‌انداز ۲۰ ساله جمهوری اسلامی ایران نیز کسب فناوری زیستی و تأمین امنیت غذایی کشور با تأکید بر تولید از منابع داخلی و خودکفایی در محصولات اساسی کشاورزی اشاره شده است.

راهکارهای پیشنهادی برای توسعه پژوهش، تولید و مصرف کودهای زیستی حاوی باکتری‌های ریزوبیومی

برای توسعه پژوهش، تولید و مصرف کودهای زیستی حاوی باکتری‌های ریزوبیومی راهکارهای زیر پیشنهاد می‌شود:

۱. بررسی وضعیت باکتری‌های ریزوبیوم همزیست با لگوم‌های قابل کشت در مناطق مختلف از نظر وجود و یا عدم وجود در خاک مزارع مورد نظر.
۲. بررسی امکان کشت لگوم‌های متناسب با شرایط اقلیمی در مناطقی که سابقه کشت لگوم ندارند و اقدام به تلقیح با سویه‌های مؤثر باکترهای ریزوبیوم.
۳. انجام پژوهش‌ها بنیادی در رابطه با باکتری‌های بومی و بررسی موضوع رقابت با انواع وارد شده به خاک.
۴. انجام پژوهش در زمینه بیوتکنولوژی ریزجانداران به منظور افزایش کارآیی همزیستی ریزوبیوم–لگوم.
۵. تأکید رسانه‌های ارتباط‌جمعی بر مزایای مصرف کودهای زیستی ریزوبیومی.

پیشنهادهای ترویجی

سطح قابل‌توجهی از زمین‌های کشاورزی ایران زیر کشت لگوم‌ها بوده و همچنین سطح بسیار بیشتری نیز استعداد کشت لگوم‌ها را داشته و پتانسیل مناسبی برای بهره‌مندی از مزایای این محصولات مهم چه از نظر تأمین پروتئین و چه از نظر استفاده به‌عنوان کود سبز و تناوب با سایر محصولات وجود دارد. مدیریت تثبیت همزیستی ریزوبیوم–لگوم به‌عنوان یک فرآیند مهم می‌تواند قدمی در راستای کشاورزی ارگانیک باشد. استفاده از مایه تلقیح-های حاوی سویه‌های باکتری ریزوبیوم مؤثر و برتر از نظر توان تثبیت زیستی نیتروژن در کشت لگوم‌ها موجب کاهش یا عدم مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی خواهد شد که حاصل آن، حفظ سلامت خاک، آب، گیاه، دام و در نتیجه سلامت انسان خواهد بود؛ بنابراین عملیاتی نمودن راهکارهای ارائه‌شده در این مقاله به همراه آموزش و ترویج در این زمینه برای آگاهی دادن در جهت فواید و کشت لگوم و از طرف دیگر اهمیت حبوبات در تغذیه مردم و از طرف دیگر استفاده از کود زیستی ریزوبیومی به‌عنوان تأمین‌کننده نیتروژن طبیعی برای لگوم‌ها، رهیافتی مهم می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

فهرست منابع

۱. اسدی رحمانی، ه. ۱۳۸۴. کاهش مصرف کودهای ازتی از طریق افزایش پتانسیل تثبیت زیستی ازت در مناطق زیر کشت لوبیا. گزارش نهایی طرح پژوهشی، نشریه شماره ۱۲۲۷، مؤسسه تحقیقات خاک و آب.

۲. اسدی رحمانی، ه. ۱۳۸۹. کودهای زیستی در ایران: فرصت ها و چالش ها. اولین کنگره چالش های کود در ایران: نیم قرن مصرف کود.هتل المپیک. تهران.

۳. انصاری، م.ح.، ح.ح. شریف آزاد، ه. اسدی رحمانی، ع. حسینی. ۱۳۸۸. بررسی تاثیر کاربرد سویه‌های همزیست لوبیا بر رشد و عملکرد دو رقم لوبیا در منطقه کرج. پژوهش‌های زراعت در پژوهش و سازندگی، ۸۲: ۱۰-۱.

۴. خسروی ه.، میرزاشاهی ک.، رمضانپور م.، کلهر م.، میررسولی ا.، ۱۳۹۴. بررسی اثربخشی برخی از جدایه‌های باکتری های ریزوبیومی بومی بر عملکرد باقلا در ایران. نشریه زیست شناسی خاک، ۳(۱):۹۱-۸۳.

۵. خسروی، ه. و م.ر. رمضانپور. ۱۳۸۳. بررسی کارایی چند مایه تلقیح باکتری های ریزوبیومی بر رشد باقلا در مازندران. مجله علوم خاک و آب، ۱۸(۲): ۱۶۷-۱۶۱.

۶. خسروی، ه.، ک. خاوازی و ک. میرزا شاهی. ۱۳۸۰. استفاده از مایه تلقیح باقلا به جای کود شیمیایی اوره در منطقه صفی آباد دزفول. مجله خاک و آب، ۱۲: ۱۶۲ـ ۱۴۶.

۷. راعی، ی.، م. صدقی، ر. سید شریفی. ۱۳۸۷. آثار تلقیح برادی ریزوبیوم، کاربرد اوره و وجین علف هرز بر روند رشد و سرعت پر شدن دانه سویا. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۴۳ (الف): ۹۱-۸۱.

۸. رجالی، ف. و ن. صالح راستین. ۱۳۷۵. بررسی تغییرات جمعیت باکتری های ریزوبیومی تریفولی و نیاز به تلقیح آن در چند ایستگاه زیر تناوب برنج-شبدر در استان مازندران. پنجمین کنگره علوم خاک ایران، ۱۳-۱۰ شهوریور ۱۳۷۵ کرج، ایران.

۹. سازمان ملی استاندارد، ۱۳۹۶. کودهای بیولوژیک حاوی باکتری‌های ریزوبیوم- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد شماره ۲۲۳۰۲.

۱۰. سیستانی، ه. ۱۳۷۱. طرح بررسی تاثیر باکتری باکتری های ریزوبیومی ملیلوتی بر روی عملکرد محصول یونجه. نشریه شماره ۸۴۸، مؤسسه تحقیقات خاک و آب. ۲۳ صفحه.

۱۱. طاهرخانی، م.، ق. نور محمدی، م.ج. میرهادی، ح. شریف آباد، ا. شیرانی راد. ۱۳۸۸. ارزیابی تاثیر تلقیح سویه-های مختلف باکتری *Rhizobium leguminosarum*bv. *Phaseoli* در تثبیت نیتروژن در ارقام مختلف لوبیا. مجله دانش نوین کشاورزی، ۱۴: ۳۶-۲۳.

۱۲. عبدی، س. م. تاجبخش. ب. عبدالهی مند ولکانی، م.ح. رسولی صدقیانی.۱۳۹۱. بررسی اثرکود سبز بر میزان ماده آلی و نیتروژن خاک. مجله دانش زراعت، سال پنجم، شماره ۷: ۱۴۴-۱۲۷.

۱۳. فلاح، ا.، م. مظاهری، ع. گرامی. ۱۳۷۹. مقایسه شبدر برسیم و کود ازت در عملکرد برنج. دومین همایش ملی استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی، بهمن ۱۳۷۹- کرج.

۱۴. وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۹۹. آمارنامه کشاورزی؛ جلد اول: محصولات زراعی.

15. Baddeley, J.A., S. Jones, C.F.E. Topp, C.A. Watson, J. Helming, F.L. Stoddard. 2014. Biological nitrogen fixation (BNF) in Europe. Legume Futures Report1.5. Available from www.legumefutures.de.

16. Beck, D.P., Materon, L.A. and Afandi, F. 1993. Practical Rhizobium- legume technology manual. ICARDA. Technical Manual No. 19.

www.SID.ir

Archive of SID

17. Burkert, A., M. Bagayoko, S. Alvey and A. Bationo.2001. Causes of legume-rotation effects in increasing cereal yields across the Sudanian, Sahelian and Guinean zone of West Africa.W. J. Horst et al. (Eds), Plant nutrition. Food security and sustainability of agro-ecosystems. Pp. 972~973.
18. Catroux G., Hartmann A., C. Revellin. 2001. Trends in rhizobial inoculant production and use. Plant and Soil, 230: 21–30.
19. Clúa J., Carla Roda, María Eugenia Zanetti ID and Flavio A. Blanco. 2018. Compatibility between Legumes and Rhizobia for the Establishment of a Successful Nitrogen-Fixing Symbiosis. Genes, 9, 125; doi: 10.3390/genes9030125.
20. Deaker R., R.J. Roughley, I.R. Kennedy. 2004. Legume seed inoculation technology—a review. Soil Biology & Biochemistry 36 () 1275–1288
21. diCenzo G. C., Maryam Zamani, Alice Checcucci, Marco Fondi, Joel S. Griffitts, 2019. Turlough M. Finan, and Alessio Mengoni. 2018. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium–legume symbioses. Can. J. Microbiol., 65: 1-33.
22. Drew E., David Herridge, Ross Ballard, Graham O'Hara, Rosalind Deaker, Matthew Denton, Ron Yates, Greg Gemell, Elizabeth Hartley, Lori Phillips, Nikki Seymour, John Howieson and Neil Ballard. 2012. Inoculating Legumes: A Practical Guide. Grains Research and Development Corporation, Australia, 77 pages.
23. Herridge D.F., M.B Peoples, D.F. Robert and M. Boddey. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil, 311:1–18.
24. Kuykendall, L.D. 2015. Rhizobilaes. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, Published by John Wiley & Sons, Inc, in Association with Bergey's Manual Trust.17:1-33.
25. Liu Y., Lianhai Wu, J.A. Baddeley, C.A. Watson. 2011. Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. Agron. Sustain. Dev. 31:155–172.
26. Lupwayi N. Z., George W. Clayton & Wendall A. Rice. 2008. Rhizobial Inoculants for Legume Crops. Journal of Crop Improvement. 15:2, 289-321
27. Meena V. S., Mishra P. K., Bisht J.K. and Pattanayak A. 2017. Agriculturally Important Microbes for Sustainable AgricultureSpringer Nature Singapore Pte Ltd. 374 pages.
28. Odhiambo, J.J.O., B.O. John Ogola and T. Madzivhandila. 2010. Effect of green manure legume legume - maize rotation onmaize grain yield and weed infestation levels. African Journal of Agricultural Research, 5(8): 618-625.
29. Pommeresche & Hansen (2017): Examining root nodule activity on legumes. FertilCrop Technical Note. Download at www.fertilcrop.net.
30. Pueppke, S.G. and W.J. Broughton. 1999. Rhizobium sp. strain NGR234 and R. fredii USDA257 share exceptionally broad host ranges. Mol. Plant Microbe Interact. 12: 293–318.
31. Spaink H.P., A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas. 1998. The Rhizobiaceae (Molecular biology of model plant- associated bacteria). Kluwer academic publishers. Netherlands, 566 p.
32. Zahran, H.H. (1999). Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63(4): 968-989.

www.SID.ir

Archive of SID

Application of rhizobium containing biofertilizers to legume farms (Techniques, potentials, advantages, and limitations)

H. Khosravi[1] and H. Asadi Rahmani

Research Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. **hkhosravi@areeo.ac.ir**

Professor, Soil and Water Research Institute; Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran**. asadi_1999@yahoo.com**

Abstract

Legumes, as the main components of human diet, have of long been planted in rotation with other crops. An important characteristic of legumes is their capacity to establish a symbiotic relationship with rhizobium bacteria to fix nitrogen. Proper management of this relationship in soil is a major step toward sustainable agriculture and environmental protection. The discovery and isolation of rhizobium dates back to 130 years ago and it was only a few years later that the first rhizobium containing biofertilizer was made available to the market. In Iran, the biofertilizer was first imported in the 60s for application to soya farms. The abundance of research over the past few decades indicates enhanced performance of legumes as a result inoculating them with rhizobia. The need for rhizobium inoculation may be explained by the lack of especially symbiotic rhizobium bacteria in soils, their low soil populations, and their death or degraded efficiency through time due to environmental stresses. Rhizobium-enriched biofertilizers come in the different forms of liquid, powder, and granules contained in mineral or organic carriers used for seed inoculation. The vast area under legume cultivation, availability of the infrastructure required for biofertilizer production, availability of professionals and technical know-how, public acceptance of organic agricultural crops, and the support mechanisms and incentives provisioned in national macro-policy documents may be claimed as potential motivations for the production and consumption of rhizobium biofertilizers in Iran. However, abundance and rapid productivity of chemical fertilizers, current challenges facing the commercialization of such products, and low consumer awareness and confidence may be claimed as the limitations of such biofertilizers. The following procedures may be recommended for the consumption of rhizobium-containing biofertilizers: conducting surveys of soils from different regions to determine the presence of rhizobia that might be symbiotic with legume crops, investigating the inoculation of target legume seeds with efficient and symbiotic rhizobia, investigating the possibility of cultivating legumes in favorable regions with no history of legume cropping, conducting basic research on indigenous soil bacteria and their competition with rhizobium strains introduced into soils, carrying out molecular research to enhance the symbiotic capacity of legumes, and education and extension activities through both mass and social media to raise public awareness of the advantages of rhizobium biofertilizers.

Keywords: *Inoculation, Legumes, Nitrogen fixation*

[1]- Corresponding author: Soil Biology Department, Soil and Water Research, POBox: 31785-311, Karaj, Iran.

www.SID.ir