نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، ص. ۵۴۵- ۵۳۶

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 15, No. 3, Fall. 2017, p. 536-545

ارزیابی کارایی فعالیت *Sinorhizobium meliloti* و خصوصیات کیفی یونجه تحت تأثیر کاربرد مولیبدن

فاطمه احمدی دانا[۱]- محمدنبی غیبی[۲*]- محمدرضا اردکانی[۳]- فرزاد پاکنژاد[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۱/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۸

چکیده

کشاورزی به مقدار زیادی وابسته به نیتروژنی است که طی همزیستی بین ریزوبیوم‌ها و گیاه لگوم میزبان آن‌ها و در گره‌های ریشه‌ای این گیاهان تثبیت می‌شود. فرآیند تثبیت نیتروژن با کمک آنزیمی به نام نیتروژناز انجام می‌گیرد و عنصر مولیبدن از عناصر مهم در تشکیل ترکیب نیتروژناز است. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر مقادیر مختلف مولیبدن و باکتری سینوریزوبیوم بر عملکرد یونجه، انجام شد. آزمایش به‌صورت طرح کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی، شامل کاربرد باکتری سینوریزوبیوم در دو سطح (تلقیح با باکتری سینوریزوبیوم و بدون تلقیح) در کرت‌های اصلی و مقادیر مختلف مولیبدن در سه سطح (صفر، ۵ و ۱۰ کیلوگرم در هکتار) در کرت‌های فرعی با سه تکرار در سال ۱۳۹۲ در مزرعه موسسه تحقیقات خاک و آب واقع در کرج انجام گرفت. نیتروژن تنها در یک مرحله و در هنگام آبیاری دوم و به میزان ۵۰ کیلوگرم اوره در هکتار به خاک اضافه شد. نتایج نشان دادند که تأثیر سطوح مختلف مولیبدن و باکتری ریزوبیوم بر عملکرد ماده خشک، غلظت مولیبدن در اندام هوایی و ریشه و تعداد گره‌های ریشه معنی‌دار گردید. همچنین بالاترین عملکرد ماده خشک مربوط به تیمار کاربرد توام باکتری ریزوبیوم و مولیبدن به میزان ۵ کیلوگرم در هکتار با عملکرد ۲۰/۲۱ تن در هکتار بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری با شاهد با عملکرد ۱۴/۲۷ تن در هکتار داشت. کاربرد مولیبدن، سبب افزایش تعداد گره در ریشه شد که نسبت به عدم تلقیح تفاوت معنی‌دار نشان داد. غلظت مولیبدن در اندام هوایی و ریشه با افزایش سطوح مولیبدن بیشتر شد، این افزایش در تیمارهای تلقیح شده با باکتری سینوریزوبیوم نسبت به تیمارهای تلقیح نشده بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: تثبیت نیتروژن، عملکرد، لگوم‌ها، نیتروژناز

مقدمه

یونجه (*Medicago Sativa*) در مقیاس جهانی قدیمی‌ترین و رایج‌ترین گیاه علوفه‌ای مورد کشت بشر می‌باشد و قادر است با همزیستی باکتری ریزوبیوم تثبیت بیولوژیکی نیتروژن را انجام دهد. تثبیت بیولوژیک نیتروژن یک فرآیند ضروری است و همزیستی‌های ریزوبیوم- لگوم بی‌شک با اهمیت‌ترین سیستم همزیستی تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی در جهان به‌شمار می‌روند. عنصر مولیبدن از جمله عناصر تأثیرگذار در فرآیند تثبیت نیتروژن توسط باکتری‌های ریزوبیومی می‌باشد. این عنصر به‌واسطه نقشی که در آنزیم نیتروژناز دارد می‌تواند در تثبیت نیتروژن در گیاهان خانواده لگومینوز حائز اهمیت باشد. از طرف دیگر داشتن اطلاعات لازم در مورد میزان تجمع این عنصر در گیاهان علوفه ضروری است زیرا وجود بیش از ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مولیبدن در یونجه برای تغذیه دام خطرناک است و پیامد آن ظهور عارضه مولیبدنوسیس می‌باشد (Marschner, 1995). مولیبدنوسیس یک بیماری گاوی است که در نتیجه عدم تعادل مولیبدن و مس در جیره غذایی نشخوارکنندگان ایجاد می‌شود. در این بیماری مسمومیت ناشی مولیبدن باعث توقف رشد و تغییر شکل استخوان‌های دام می‌شود.

نقش بیوشیمیایی مولیبدن اولین بار در سال ۱۹۳۰ مشخص شد و

۱- کارشناسی ارشد رشته اگرواکولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: mngheibi@yahoo.com)
۳- استاد، اکولوژی کشاورزی (با تخصص کشاورزی ارگانیک)، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۴- دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
DOI: 10.22067/gsc.v15i3.45990

نشان داد که این عنصر در تثبیت نیتروژن توسط ازتوباکتر مؤثر است و آزمایشاتی که روی گیاهان نخود (*Cicer arietinum*)، سویا (*Glycine max*) و شبدر قرمز (*Trifolium Pratenes*) کشت شده در محیط شن انجام شد معلوم کرد که افزودن مولیبدن به محلول کشت سبب افزایش تثبیت نیتروژن شد (Bortels, 1930). غلظت مولیبدن در اندام‌های مختلف گیاهان به‌طور قابل ملاحظه‌ای متفاوت است و در دانه و گره‌های تثبیت نیتروژن بالاترین غلظت را دارد (Gupta and lispet, 1981).

در تحقیق انجام شده توسط ویوریا و همکارانش (Vieira *et al.*,1998) مشخص گردید که محلول‌پاشی لوبیا (*Phasaeolus vulgaris* L.) با ۴۰ گرم مولیبدن در هر هکتار تا حد زیادی فعالیت آنزیم نیتروژناز در گیاه را افزایش داد. این عنصر نقش به‌سزایی در تثبیت نیتروژن در گیاهان خانواده بقولات دارد و افزودن این عنصر در محیط رشد گیاه باعث افزایش تثبیت نیتروژن از طریق افزایش کارایی آنزیم نیتروژناز در ساختار گره‌ها شده و باعث افزایش عملکرد و بالا رفتن کیفیت یونجه می‌شود (Kaiser *et al.*, 2005).

همچنین با افزایش فعالیت آنزیم نیتروژناز غلظت بالای مولیبدن در گیاه آشکار نمی‌گردد که این امر به علت تجمع مولیبدن در گره‌های فعال ریشه می‌باشد (Brodrick and Giler, 1991). البته لگوم‌ها به دلیل وابسته بودن به N_2 اغلب نیاز به مولیبدن بیشتری نسبت به دیگر گیاهان دارند (Marschner, 1995).

در گیاهان دچار کمبود مولیبدن، مناطق نکروزه در حاشیه برگ‌ها دیده می‌شود که همراه با کاهش در رشد کلی گیاهان می‌باشد (Chtterjee and Nautiyal, 2001; Chatterjee *et al.*,1985). مولیبدن در افزایش وزن هزار دانه، تعداد شاخه‌های‌بارور و افزایش تعداد ساقه نقش به‌سزایی دارد (Wen Hua Du *et al.*, 2009).

بنابراین اثرات منفی کمبود مولیبدن در فعالیت‌های آنزیمی مربوط به ساخت نیتروژن می‌باشد که در نهایت باعث کاهش رشد گیاه می‌شود (Hristozkova *et al.*, 2009) و در نهایت در صورت برطرف شدن نیاز گیاهان خانواده بقولات به مولیبدن و استفاده از کودهای نیتروژنی به مقدار کم آن هم در مراحل اولیه رشد و جوانه‌زنی، رشد گیاه به بالاترین حد خود می‌رسد و باعث افزایش فعالیت گره‌ها در ریشه، افزایش تعداد گره در ریشه، افزایش وزن و در نهایت افزایش عملکرد خواهد شد (Nadia Gad, 2012). تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر مقادیر مختلف مولیبدن و تأثیر کاربرد باکتری سینوریزوبیوم بر عملکرد گیاه یونجه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت کرت‌های خرد شده با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی، شامل کاربرد باکتری سینوریزوبیوم در دو سطح (تلقیح با باکتری سینوریزوبیوم و بدون تلقیح) در کرت‌های اصلی و مقادیر مختلف مولیبدن در سه سطح (صفر، ۵ و۱۰ کیلوگرم در هکتار) در کرت‌های فرعی با سه تکرار در سال ۱۳۹۲ در مزرعه موسسه تحقیقات خاک و آب واقع در کرج انجام گرفت. ابتدا به‌منظور تعیین میزان عناصر، خاک مورد استفاده در این آزمون تجزیه شیمیایی گردید (جدول ۱). بر اساس آزمون خاک، ۱۵۰ کیلوگرم در هکتارسولفات پتاسیم، ۱۰۰کیلوگرم در هکتار سوپر فسفات تریپل، ۴۰ کیلوگرم در هکتار سولفات‌روی و ۵۰ کیلوگرم در هکتار سولفات‌آهن به خاک مزرعه افزوده شد.

به‌منظور آماده‌سازی کشت خالص باکتری، از غده‌های ریشه‌ای یونجه، نمونه‌برداری انجام گرفته و باکتری سینوریزوبیوم ملیلوتی موجود در داخل غده‌های فعال، بعد از کشت روی محیط Yeast Extract Mannitol Agar(YMA) به‌صورت کلنی‌های شیری رنگ متمایل به صورتی بر روی محیط کشت ظاهر گردیدند، سپس به میزان ۵ گرم به‌ازای یک کیلوگرم بذر روی بذرها ریخته شد (با در نظر گرفتن تعداد باکتری در واحد حجم، تعداد باکتری در واحد وزن محاسبه گردید.) نیمی از بذرها توسط مایه تلقیح حاوی باکتری *S. meliloti* که باکتری همزیست با یونجه می‌باشد، تلقیح شدند. ۳ سطح مولیبدن از منبع مولیبدات آمونیوم (ماده شیمیایی مرک آلمان، حاوی ۵۴٪ مولیبدن) توزین و به خاک اضافه شد. سپس براساس نقشه طرح، بذور تلقیح شده و تلقیح نشده به‌صورت ردیفی با فواصل نیم متری (ابعاد کرت‌ها ۵×۴) در دوم خرداد ماه کاشته شدند. بعد از کاشت سریعاً اقدام به آبیاری (به دلیل زنده نگه داشتن باکتری‌ها) شد. جهت تأمین نیتروژن اولیه به‌منظور استقرار گیاه از کود اوره به مقدار ۵۰ کیلوگرم در هکتار در دو مرحله در آبیاری دوم (یک هفته پس از کاشت) و یک هفته پس از آن استفاده گردید. در طول فصل رشد مراقبت‌های زراعی از قبیل مبارزه با علف‌های هرز و آفات گیاهی انجام شد. آبیاری به‌صورت هفته‌ای یک بار انجام شد. پس از رسیدن ۱۰٪ از گیاهان به مرحله گلدهی در تاریخ ۹۲/۵/۶ اولین چین به‌صورت برداشت ریشه و اندام هوایی انجام شد. جهت بیرون آوردن ریشه گیاهان ابتدا با بیل گیاهان را همراه با خاک اطراف ریشه به‌آرامی بیرون آورده شدند، سپس گیاه به همراه خاک، درون تشت آب قرار داده شد و ریشه‌ها به‌آرامی و سالم از خاک شسته شدند و اقدام به شمارش گره‌های ریشه گردید. بعد از برداشت نمونه‌های ریشه، اقدام به برداشت اندام هوایی هر تیمار به اندازه ۳ متر مربع به‌منظور اندازه‌گیری میزان عملکرد ماده خشک شد. جهت خشک کردن نمونه‌ها ابتدا گیاهان با آب مقطر شسته شدند تا خاک و گرد و غبار روی گیاهان به‌طور کامل خارج گردد. آنگاه نمونه‌های اندام‌هوایی و ریشه به‌طور جداگانه به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد درون آون قرار داده شدند و سپس وزن خشک نمونه‌ها

اندازه‌گیری شد. نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب برقی مخصوص پودر شدند و در نهایت بر روی نمونه‌های پودر شده تجزیه‌های شمیایی شامل اندازه‌گیری مولیبدن اندام‌هوایی و ریشه انجام گردید. برای تهیه عصاره گیاهی جهت اندازه‌گیری غلظت مولیبدن از هضم به روش سوزاندن خشک و حل در HCl استفاده و توسط دستگاه ICP اندازه‌گیری شد. گیاه یونجه در ۴ چین در ۶ مرداد، ۱۰ شهریور، ۱۰مهر و ۱۹ آبان ماه برداشت شد. در نهایت تجزیه واریانس کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SASVer.9.1.3 صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

جدول ۱- برخی خصوصیات شیمیایی خاک زمین محل انجام آزمایش در عمق ۳۰ سانتی‌متری

Table 1- Physical properties of experimental field soil before planting

کربن آلی OC %	نیتروژن کل N. tot %	مولیبدن قابل جذب Mo. ava	فسفر قابل جذب P. ava	پتاسیم قابل جذب K. ava	آهن قابل جذب Fe. ava	منگنز قابل جذب Mn. ava	روی قابل جذب Zn. ava	مس قابل جذب Cu. ava
					($mg\ kg^{-1}$)			
0.53	0.05	0.1	6.66	204	4.1	13.94	0.54	1.12

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) سطوح مختلف مولیبدن و باکتری بر عملکرد و غلظت مولیبدن در ریشه و اندام هوایی و تعداد گره‌های ریشه

Table 2- Analysis of variance (mean of squares) for the effect of molybdenum and rhizobium on yield, concentration of molybdenum in the root and shoot and root nodules

		میانگین مربعات (MS)			
منابع تغییرات s.o.v	درجه آزادی d.f	مولیبدن اندام هوایی shoot mo	عملکرد خشک Dry Matter Yield	تعداد گره های ریشه The number of root nodule	مولیبدن ریشه Root mo
تکرار Rep	2	0.019ns	2.55*	0.32ns	0.056ns
تلقیح باکتری (I) Inoculant (I)	1	3.10*	27.54*	1.89ns	8.17**
خطا (I) Error (I)	2	0.082	0.9	0.14	0.082
سطوح مختلف مولیبدن (Mo) Molybdenum (Mo)	2	62.91**	21.43**	2.34**	155.37**
Mo × I	2	0.43**	1.81*	0.39**	0.87**
خطا Error	8	0.028	0.29	0.24	0.08
ضریب تغییرات CV%	-	3.78	3.25	4.62	4.87

ns، * و** به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

ns, * and ** nonsignificant, significant at 0.05 and 0.01 level of probability, respectively.

جدول ۳- اثرات اصلی باکتری ریزوبیوم بر عملکرد خشک، غلظت مولیبدن در اندام هوایی و ریشه و تعداد گره‌های ریشه

Table 3- Simple effects of rhizobium bacteria on dry yield, concentration of molybdenum in root and shoot and root nodules

صفت Treat	تعداد گره‌های ریشه The number of root nodule	مولیبدن ریشه root mo (ppm)	مولیبدن اندام هوایی shoot mo (ppm)	عملکرد خشک Dry Matter Yield ($ton\ ha^{-1}$)
تلقیح با باکتری(I1)	3.7a	6.52a	4.88a	17.99a
عدم تلقیح با باکتری(I0)	3.07a	5.17b	4.05b	15.51b

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد ندارند

*In each column, means followed similar letters are not significantly different ($p \leq 0.05$).

نتایج و بحث

عملکرد ماده خشک

جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد که تأثیر باکتری بر وزن خشک اندام هوایی یونجه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. تیمار استفاده از باکتری با عملکرد ۱۸ تن در هکتار با تیمار عدم استفاده از باکتری، با عملکرد ۱۵/۵ تن در هکتار تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۳). جدول ۱ نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد بین سطوح مختلف استفاده از مولیبدن بر میزان عملکرد خشک است به این صورت که تیمار استفاده از ۵ کیلوگرم بر هکتار مولیبدن با ایجاد عملکرد ۱۸/۶۵ تن در هکتار بیشترین تأثیر را بر عملکرد خشک یونجه داشت. همچنین اثرات متقابل باکتری ریزوبیوم و مولیبدن بر مقدار عملکرد خشک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار نشان داد به نحوی که در تیمار بدون کاربرد مولیبدن، کاربرد و عدم کاربرد باکتری تأثیری نداشته است ولی در سطح مولیبدن ۵ کیلوگرم بر هکتار، باکتری تأثیرگذار بوده است که نسبت به سطح مولیبدن ۱۰kg/ha، ۱۰ درصد افزایش داشت (شکل ۱). تیمار استفاده توام از باکتری ریزوبیوم و ۵ کیلوگرم بر هکتار مولیبدن ۲۰/۲۱ تن در هکتار بیشترین عملکرد را به خود اختصاص داد. با کاربرد بیشتر مولیبدن در استفاده از ۱۰ کیلوگرم بر هکتار در تیمار تلقیح شده با ریزوبیوم، عملکرد خشک نسبت به استفاده از مولیبدن ۵ کیلوگرم بر هکتار کاهش عملکرد نشان داد ولی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌دار داشت (شکل ۱). افزایش در عملکرد تیمارهای با کاربرد مولیبدن، حاصل تثبیت زیستی نیتروژن که منجر به تبدیل نیتروژن مولکولی (N_2) موجود در اتمسفر به آمونیم (NH_3) درگرهک‌های موجود در ریشه گیاهان می‌شود می‌باشد. این فرآیند، فرآیندی انرژی‌خواه بوده که حاصل ایجاد همزیستی بین باکتری‌های تثبیت‌کننده و ریشه گیاهان و ایجاد گرهک‌هاست. آنزیم مسئول این واکنش که موسوم به نیتروژناز می‌باشد دارای دو بخش است: بخش اول که موسوم به پروتئین آهن (Fe) است دارای دو زیرواحد مشابه بوده، هر واحد شامل یک خوشه Fe-S (آهن-گوگرد) بوده و از طریق تبدیل احیاء فردوکسین به فردوکسین اکسید شده و همچنین تبدیل ATP به ADP در واکنش‌های اکسایش-کاهش دخالت می‌کند.

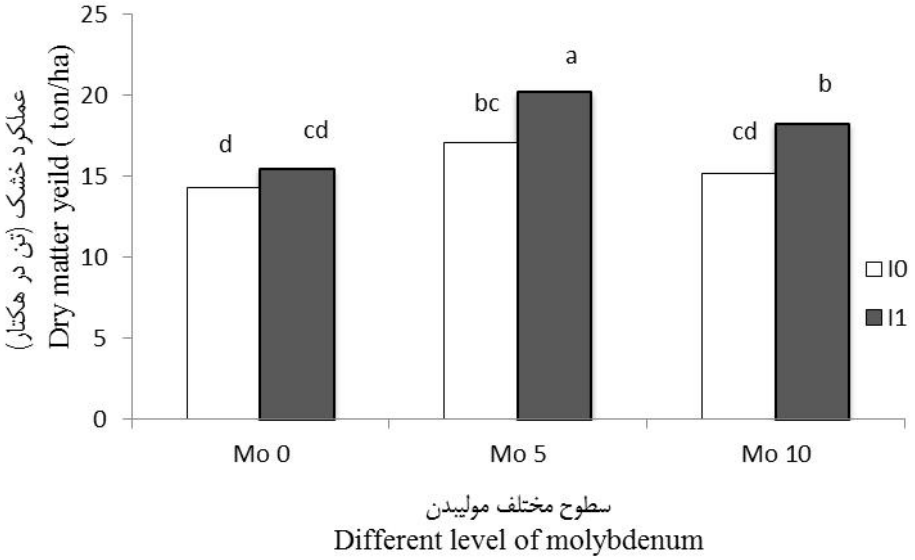
بخش دوم که موسوم به پروتئین مولیبدن-آهن است دارای چهار زیرواحد بوده و هر زیرواحد شامل ۲ خوشه Mo-Fe-S (مولیبدن-آهن-گوگرد) است و با انجام یک سری واکنش‌های اکسایش-کاهش منجر به تبدیل نیتروژن به آمونیم می‌شود. پس عنصر مولیبدن در ساختار آنزیم نیتروژناز شرکت دارد. گاز نیتروژن به مولیبدن می‌چسبد و الکترون، مرحله به مرحله به آن داده می‌شود و به‌تدریج با افزوده شدن پروتون، پیوند میان دو نیتروژن ضعیف شده تا اینکه دو مولکول آمونیوم آزاد می‌شود. در نتیجه وجود مولیبدن برای سوخت و ساز نیتروژن و فعال کردن ریزوبیوم‌های همزیست با بقولات الزامی است.

نکته مهم در این فرآیند این است که، آنزیم نیتروژناز نسبت به اکسیژن حساس بوده و به‌طور برگشت‌ناپذیری غیرفعال می‌گردد. از این رو باکتری‌های تثبیت‌کننده غیرهوازی بوده و یا از مکانیسم‌هایی جهت غیرهوازی کردن بخش‌های مسئول در این فرآیند استفاده می‌نمایند (مثل ایجاد پروتئین لگ‌هموگلوبین که تمایل بالایی نسبت به جذب اکسیژن و در نتیجه غیرهوازی کردن محیط (Taiz and Zeiger, 2002) دارد. وقتی نیاز نیتروژناز به مولیبدن برطرف و توسط ریزوبیوم از سطح اکسیژن موجود در محیط اطراف آنزیم نیتروژناز کاسته شد این آنزیم فعال و باعث تبدیل نیتروژن اتمسفری به آمونیوم می‌شود سپس ساخت RNA، DNA و پروتئین بیشتر شده که در نهایت می‌تواند باعث عملکرد بیشتر در این تیمارها شده باشد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که مولیبدن نقش به‌سزایی در تثبیت نیتروژن در گیاهان خانواده بقولات دارد و افزودن این عنصر در محیط رشد گیاه باعث افزایش تثبیت نیتروژن از طریق افزایش کارایی آنزیم نیتروژناز در ساختار گره‌ها می‌شود که در نهایت باعث افزایش عملکرد و بالا رفتن کیفیت یونجه می‌شود (Kaiser *et al.*, 2005). بدین ترتیب، مولیبدن در افزایش تعداد شاخه‌های بارور و افزایش تعداد ساقه و برگ نقش به‌سزایی دارد (WenHua Du *et al.*, 2009).

غلظت مولیبدن در اندام هوایی

غلظت مولیبدن در اندام هوایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است چراکه غلظت بیشتر ۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک در علوفه مورد استفاده نشخوارکنندگان باعث بروز بیماری مولیبدنوسیس در دام می‌شود (Marschner, 1995). غلظت مولیبدن در اندام‌هوایی در تیمارهای استفاده و عدم استفاده از باکتری در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌دار نشان داد (جدول ۲)، به‌طوری‌که بیشترین غلظت مولیبدن در اندام‌هوایی، در تیمار استفاده از باکتری ریزوبیوم با غلظت ۴/۸۸ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک بود (جدول ۳) و در بین سطوح مختلف مولیبدن، غلظت مولیبدن در کاربرد ۱۰ کیلوگرم بر هکتار به میزان ۸/۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک بیشترین غلظت را نشان داد (جدول ۴). مقایسه میانگین اثرات متقابل بر تجمع مولیبدن در اندام‌هوایی، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد را نشان داد به‌طوری‌که در سطح بدون کاربرد مولیبدن، کاربرد و عدم کاربرد باکتری تأثیری نداشته است ولی در سطح مولیبدن ۵ کیلوگرم بر هکتار، باکتری تأثیرگذار بوده است و در سطح مولیبدن ۱۰ کیلوگرم بر هکتار، کاربرد و عدم کاربرد باکتری تأثیری بر تجمع مولیبدن در اندام هوایی نداشته است (شکل ۲). بیشترین جذب و انتقال مولیبدن در کاربرد توام باکتری ریزوبیوم و ۱۰ کیلوگرم بر هکتار مولیبدن غلظت

۸/۶۹ میلی‌گرم در کیلوگرم اتفاق افتاده است و در مقابل کمترین غلظت مربوط به تیمار شاهد با ۱/۷۹ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک بود. در صورت عدم استفاده از مولیبدن، تجمع مولیبدن در تیمار تلقیح شده بیشتر بوده ولی تفاوت معنی‌داری نسبت به عدم تلقیح نشان نداد، این افزایش کم به دلیل استفاده باکتری از مولیبدن ذاتی خاک می‌باشد (شکل ۲).

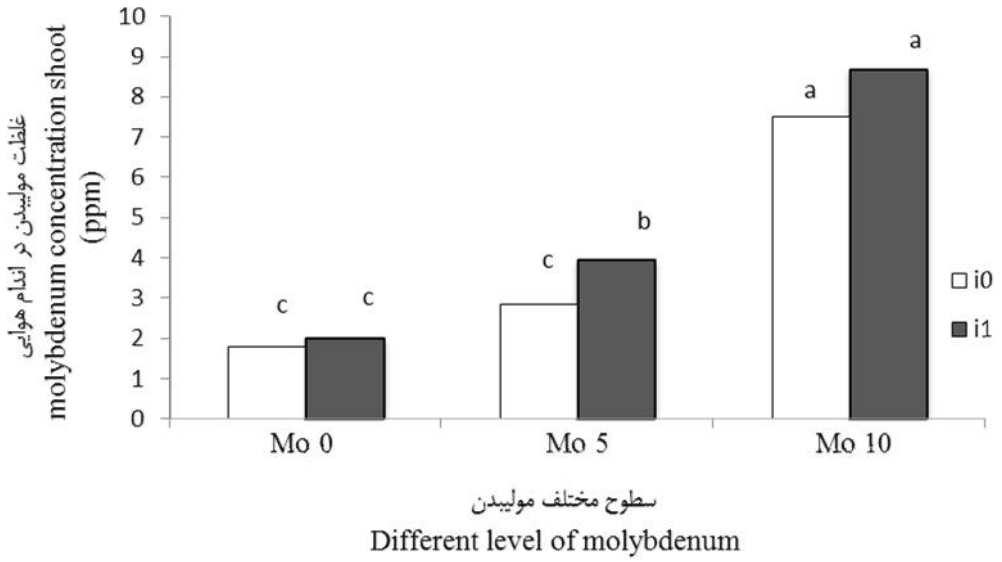


شکل ۱- اثرات متقابل مولیبدن و باکتری ریزوبیوم بر عملکرد خشک گیاه یونجه

Figure 1- Effects of molybdenum concentration and seeds inoculation on dry matter yield on alfalfa

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با آزمون دانکن ندارند.

*In each column, means followed similar letters according to Duncan test at 5% difference are not significant.

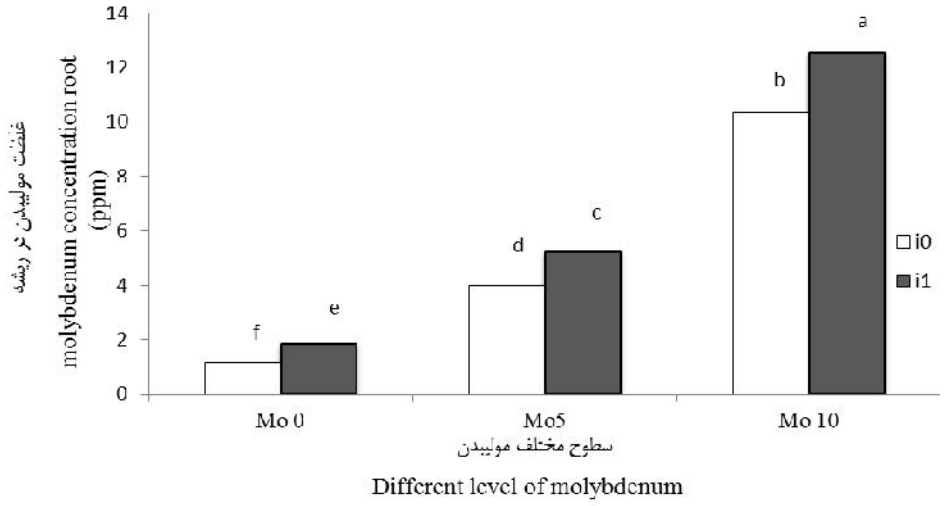


شکل ۲- اثرات متقابل مولیبدن و باکتری ریزوبیوم بر غلظت مولیبدن در اندام هوایی گیاه یونجه

Figure 2- Effects of molybdenum in concentration and seeds inoculation on concentration of molybdenum in shoot on alfalfa

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با آزمون دانکن ندارند

*In each column, means followed similar letters according to Duncan test at 5% difference are not significant.

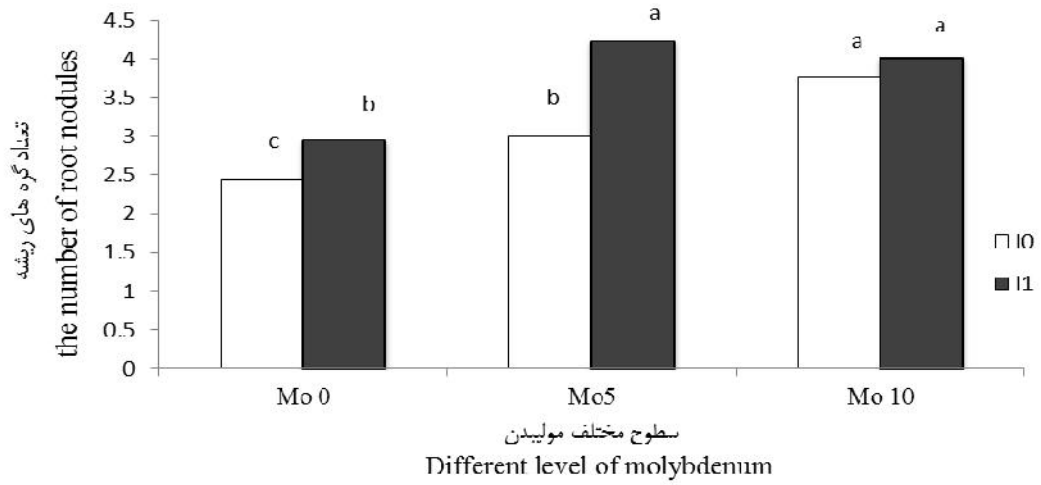


شکل ۳- اثرات متقابل مولیبدن و باکتری ریزوبیوم بر غلظت مولیبدن در ریشه گیاه یونجه

Figure 3- Effects of molybdenum in **concentration and seeds inoculation on concentration of molybdenum in alfalfa root**

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با آزمون دانکن ندارند

*In each column, means followed similar letters according to Duncan test at 5% difference are not significant.



شکل ٤- اثرات متقابل مولیبدن و باکتری ریزوبیوم بر تعداد گره‌های ریشه در گیاه یونجه

Figure 4- Effects of molybdenum in **concentration and seeds inoculation on concentration of the number of root nodule in alfalfa**

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با آزمون دانکن ندارند

*In each column, means followed similar letters according to Duncan test at 5% difference are not significant.

از نتایج حاصل می‌توان دریافت که کاشت بذور تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم، منجر به تجمع مولیبدن در ساقه و برگ‌های یونجه شده است. این موضوع حاکی از آن است که در تیمارهای تلقیح شده با ریزوبیوم انتقال مولیبدن از ریشه به اندام‌هوایی بیشتر اتفاق افتاده است. در تمامی تیمارها میزان افزایش مولیبدن در تیمارهای تلقیح شده نسبت به تلقیح نشده حدوداً به میزان ppm ۱ بوده است ولی این افزایش در کلیه تیمارها پایین‌تر از حدی است که باعث بیماری مولیبدنوسیس در دام شود.

غلظت مولیبدن در ریشه

تجزیه واریانس غلظت مولیبدن در ریشه در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۲، اثر استفاده یا عدم استفاده از باکتری

ریزوبیوم بر غلظت مولیبدن در ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد و در این میان، استفاده از باکتری ریزوبیوم با غلظت ۶/۵۲ میلی‌گرم در کیلوگرم ماده خشک، بیشترین غلظت مولیبدن را به خود اختصاص داد (جدول ۳). به نظر می‌رسد که با کاسته شدن از سطح اکسیژن در محیط اطراف ریشه توسط ریزوبیوم و برطرف شدن نیاز آنزیم نیتروژناز به مولیبدن و در نتیجه فعال شدن آنزیم نیتروژناز، و از طرفی افزایش نیاز نیتروژناز به مولیبدن در جهت تثبیت نیتروژن، غلظت مولیبدن در ریشه و گره‌های تثبیت نیتروژن بالا رفته است، لذا افزایش غلظت مولیبدن در ریشه تیمارهای تلقیح شده قابل توجیه می‌باشد (Allen, 1999). در مقادیر مختلف مولیبدن جدول تجزیه واریانس، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد (جدول ۲). در بین سطوح مختلف مولیبدن، استفاده از ۱۰ مولیبدن غلظت ۱۱/۴۴ میلی‌گرم در کیلوگرم را در ریشه ایجاد کرد که بالاترین غلظت مربوط به همین تیمار است (جدول ۴). همچنین اثر متقابل باکتری ریزوبیوم و مولیبدن در سطح آماری ۱درصد معنی‌دار شد که نشان‌دهنده روند متفاوت تأثیر باکتری ریزوبیوم در سطوح مختلف مولیبدن می‌باشد به نحوی که با افزایش کاربرد مولیبدن، تجمع مولیبدن در ریشه تحت‌تأثیر باکتری بیشتر شده است. بیشترین غلظت مربوط به تیمار استفاده از باکتری ریزوبیوم و ۱۰ کیلوگرم بر هکتار مولیبدن با غلظت ۱۲/۵۳ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌باشد (شکل ۳). از نتایج می‌توان دریافت تیمارهای تلقیح شده با باکتری باعث تجمع بیشتر مولیبدن در ریشه یونجه شده است. این موضوع حاکی از آن است که تیمارهای تلقیح شده با ریزوبیوم، استفاده از مولیبدن بیشتر اتفاق افتاده است.

تعداد گره در ریشه

تعداد گره‌ها در ریشه در تیمارهای استفاده و عدم استفاده از باکتری ریزوبیوم تفاوت معنی‌دار نشان نداد. مصرف مقادیر مختلف مولیبدن اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد نشان داد به‌طوری‌که بیشترین تعداد گره به‌ترتیب مربوط به استفاده از ۱۰ کیلوگرم بر هکتارمولیبدن و ۵ کیلوگرم بر هکتار مولیبدن بود (جدول ۴). همان‌گونه که در جدول تجزیه واریانس مشاهده می‌شود (جدول ۲) اثرات متقابل باکتری ریزوبیوم و مولیبدن بر تعداد گره‌های ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود به نحوی که در سطح ۵ کیلوگرم بر هکتار و بدون کاربرد مولیبدن، باکتری باعث افزایش در تعداد گره‌های ریشه شده ولی در سطح ۱۰ کیلوگرم بر هکتار مولیبدن، کاربرد و عدم کاربرد باکتری تأثیری بر تعداد گره‌های ریشه نداشت (شکل ۴). مقایسه میانگین نشان داد که بیشترین تعداد گره در ریشه در ترکیب تیمار باکتری ریزوبیوم و ۵ کیلوگرم بر هکتار مولیبدن به‌دست آمد و تیمار استفاده از ۱۰کیلوگرم بر هکتار مولیبدن در تعداد گره‌های ریشه بعد از این تیمار قرار گرفت. کمترین تعداد در تیمار شاهد (عدم کاربرد باکتری و مولیبدن) به‌دست آمد. لگوم‌ها به دلیل وابسته بودن به N_2اغلب نیاز به مولیبدن بیشتری نسبت به دیگر گیاهان دارند (Marschner, 1995) و معمولاً در کمبود مولیبدن دچار کم شدن وزن و مقدار گره در ریشه و توقف در رشد می‌شوند.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش نشان داد که عملکرد ماده خشک، غلظت مولیبدن در اندام‌هوایی و ریشه و تعداد گره‌های به‌وجود آمده در ریشه تحت تأثیر تیمارهای مولیبدن و باکتری ریزوبیوم قرار گرفتند. استفاده از مولیبدن و باکتری ریزوبیوم باعث افزایش ۱۴درصدی در میزان عملکرد ماده خشک تولید شده در هکتار و همچنین تعداد گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن گردید (Kaiser *et al.*, 2005).

جدول ٤- اثرات اصلی مقادیر مختلف مولیبدن بر عملکرد خشک، غلظت مولیبدن در اندام هوایی و ریشه و تعداد گره‌های ریشه

Table 4- Simple effects of molybdenum in **on dry yield, concentration of molybdenum in root and shoot and root nodules**

صفت Treat	تعداد گره‌های ریشه The number of root nodule	مولیبدن ریشه root mo (ppm)	مولیبدن اندام هوایی shoot mo (ppm)	عملکرد خشک Dry Matter Yield (ton ha^{-1})
شاهد (Mo0)	2.69c	1.49c	1.89c	14.87c
استفاده ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک (Mo5)	3.61b	4.61b	3.39b	18.65a
استفاده۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک (Mo10)	3.88a	11.44a	8.10a	16.73b

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون، اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد با آزمون دانکن ندارند

*In each column, means followed similar letters are not significantly different ($p\leq0.05$).

افزایش در عملکرد تیمارهای با کـاربرد مولیبـدن بیشـتر، حاصـل تثبیت زیستی نیتروژن که منجر بـه تبـدیل نیتـروژن مولکـولی (N_2) موجود در اتمسفر به آمونیم (NH_3) درگرهک‌هـای موجـود در ریشـه گیاهان می‌شود می‌باشد، بنابراین با توجه به جذب کمتـر مولیبـدن در اندام‌هوایی و بیشترین عملکرد به‌دست آمده از تیمار با بذور تلقیح شده در سطح اول مولیبدن، مقدار ۵ کیلوگرم در هکتار مولیبدن برای رشـد یونجه مناسب است.

نکته حائز اهمیت این است که بـرای بـه‌دسـت آوردن بیشـترین عملکرد، فقط در یک مرحله (قبل از دو هفته اول رشد) بـرای تـأمین نیتروژن مورد نیاز گیاه برای شروع رشد، کود نیتـروژن از منبـع اوره و به میزان ۵۰ کیلوگرم در هکتار به خاک اضافه شود، مصـرف بـیش از حد کودهای نیتروژن باعث اختلال در فعالیت باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در گرهک‌ها شده و باعث وابستگی گیاه به نیترات شـیمیایی مـی‌شـود در نتیجـه افـزایش در عملکـرد (Nadia Gad, 2012) رخ نخواهد داد.

References

1. Agarwala, S. C., Sharma, C. P., Farooq. S., and Chatterjee, C. 1978. Effect of molybdenum deficiency on the growth and metabolism of cornplants raised in sand culture. Canadian Journal of Botany 56: 1905-1909.
2. Allen, R. M., Roll, J. T., Rangaraj, P., Shah, V. K., Roberts, G. P., and Ludden, P. W. 1999. Incorporation of molybdenum into the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. The Journal of Biological Chemistry 274: 15869-15874.
3. Bortels, H. 1930. Molybdänals Katalysatorbei der biologischen Stickstoffbindung. Archives of Microbiology 1: 333-342.
4. Brodrick, S. J., and Giller, K. E. 1991. Root nodules of Phaseolus: efficient scavengers of molybdenum for N2-fixation. Journal of Experimental Botany 42: 679-686.
5. Chatterjee, C., Nautiyal, N., and Agarwala, S. C. 1985. Metabolic changes in mustard plants associated with molybdenum deficiency. New Phytologist Journal 100: 511-518.
6. Chatterjee, C., and Nautiyal, N. 2001. Molybdenum stress affects viability and vigour of wheat seeds. Journal of Plant Nutrition 24: 1377-1386.
7. Emami, A. 1996. Methods of plant analysis, Volume I, Technical Publication No. 982, Soil and Water Research Institute, Tehran.
8. Gupta, U. C., and Lipsett, J. 1981. Molybdenum in soils, plants, and animals. Advances in Agronomy 34: 73-115.
9. Hagstrom, G. R., and Berger, K. C. 1965. Molybdenum status of three Wisconsin soils and its effect on four legume crops. Agronomy Journal 55: 399-401.
10. Kaiser, B. N., Gridley, K., Brady, J. N., Philips, T., and Tyerman, S. D. 2005. The role of molybdenum in agricultural plant production. Annals of Botany 96: 745-754.
11. Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed. New York: Academic Press, pp. 369-379.
12. Marieta, H., Maria, G., and Ira, S. 2009. Effect of foliar feeding on nitrogen assimilation in alfalfa plants at insufficient molybdenum supply. Journal of Acta Biologica Hungarica 2: 211-219.
13. Pasricha, N. S., Nayyar, V. K., Randhawa, N. S., and Sinha, M. K. 1977. Influence of sulphur fertilization on suppression of molybdenum uptake by berseem (*Trifoliumalexandrium*) and oats (*Avena sativa*) grown on a molybdenum-toxic soil. Plant Soil 46: 245-250.
14. Nadia, G. 2012. Influence of Molybdenum on Groundnut Production under Different Nitrogen Levels. World Journal of Chemistry 7 (2): 64-70.
15. Taiz, L., and Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. 3 edition.p 270-273.
16. Vieira, R. F., Vieira, C., Cardoso, E. J. B. N., and Mosquim, P. R. 1998. Foliar application of molybdenum in common bean. II. Nitrogenase and nitrate reductase activities in a soil of low fertility. Journal of Plant Nutrition 21: 2141-2151
17. Wen, H. D., Xin, H. T., Zhi, Z. C., and Alan, H. 2009. Effects of Micronutrients on Seed Yield and Yield Components of Alfalfa. Journal of Plant Nutrition 5: 809-820.

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 15, No. 3, Fall. 2017, p. 536-545

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶، ص. ۵۴۵-۵۳۶

Evaluation of *SinoRhizobium meliloti* Efficiency and Qualitative Traits of Alfalfa under Application of Molybdenum

F. Ahmadi Dana[1]- M. N. Gheibi[2*]- M. R. Ardakani[3]- F. Paknejad[4]

Received: 19-04-2015
Accepted: 08-08-2016

Introduction

Agriculture depends heavily on nitrogen which is biologically fixed through the symbiotic association between rhizobia and legume plants in nodules located on plant roots. Alfalfa is a legume that should fix most of its own N requirement if it is sufficiently nodulated by viable *Rhizobium meliloti* inoculums. The process of nitrogen fixation is done by the help of an enzyme called nitrogenase and molybdenum which is an important element in the formation of this compound. Molybdenum is required by plants for protein synthesis and is especially important for legumes as it is needed for nitrogen fixation by rhizobia. Therefore the following research was done aimed on studying the effect of different amount of molybdenum and *S. rhizobium* bacteria on alfalfa's yield.

Material and Methods

Alfalfa (*Medicago sativa*) were grown in a field. The experiment was conducted at Karaj in 2013 in split plot arrangement based on completely randomized block design (RCBD), including 2 caring *S. rhizobium* inoculated seed and non-inoculated (as the main plot factor)and 3 levels of Molybdenum (0,5,10 kg ha^{-1}) from ammonium molybdate (as the sub plot factor) in three replications. *Sinorhizobium meliloti* bacteria were cultured on plates. Then half of the seeds were inoculated by *Sinorhizobium meliloti*. Nitrogen fertilizer was added only in one stage before planting up to 50 kg per hectare. Plants were grown until flowering. The data were analyzed by the SAS (9.1) software and mean comparisons were done by Duncan's MRT at the 1% and 5% probability level.

Results and Discussion

The results showed the effect of different levels of molybdenum and *S. Rhizobium* bacteria on dry matter yield, molybdenum concentrations in shoots and roots and the number of root nodules was significant. This treatment was significant in comparison to the control treatment with the14.27 ton per hectare.

Increasing of molybdenum application, led to increasing of root nodules and showed a meaningful difference from non-inoculated. Concentration of molybdenum in shoot and root increased, this increase in *S. Rhizobium* inoculated case was more than non-inoculated cases.

1- MSc student in Agroecology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran
2- Assistant Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
3- Professor of Ecological Agriculture (organic farming expertise), Islamic Azad University, Karaj
4- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran
(*- Corresponding Author Email: mngheibi@yahoo.com)

Conclusions

The use of molybdenum and *Rhizobium* bacteria increase the production yield and also nitrogen-fixing nodules. The increase in the use of treatments with molybdenum, resulting biological nitrogen fixation leading to conversion of molecular nitrogen (N_2) in the atmosphere into ammonium (NH_3) in nodules on the roots of plants. Studies have showed that molybdenum important role in nitrogen fixation in legume family of plants, and adding this element increased growth by increasing the efficiency of nitrogen fixation and nitrogenase enzyme in the node structure, which ultimately will lead to increased yield and higher quality in alfalfa. Thus, molybdenum increased the number of branches of the fertile and increase the number of stem and leaf.

Molybdenum is essential to plant growth as a component of the enzymes nitrogenase. Legumes need more molybdenum than other crops, such as grass or corn, because the symbiotic bacteria living in the root nodules of legumes require molybdenum for the fixation of atmospheric nitrogen. If sufficient molybdenum is not available, nodulation will be retarded and the amount of nitrogen fixed by the plant will be limited. If other factors are not limiting, the amount of molybdenum will determine the amount of nitrogen fixed by the plant. Increasingly vigorous plant growth, higher protein contents and greater buildup of nitrogen in the plant and soil accompany nodulation and symbiotic microbial activity. Therefore, due to less absorption of molybdenum in the shoot and the highest yield obtained from treated seeds inoculated with the first level of molybdenum, the amount kg ha^{-1}. Molybdenum is suitable for growing of alfalfa. It is important to obtain maximum yield in just one stage (before the first two weeks of growth) for the supply of nitrogen for growth, nitrogen from urea at the rate of 50 kg ha^{-1}added to soil, excessive consumption of nitrogen fertilizers can impair the activity of the nitrogen-fixing bacteria in nodules, and plant dependence to nitrate chemical, then the yield will not increase.

Keywords: Legume, Nitrogenase, Nitrogen Fixation, Yield