

تأثیر میزان و نوع کود نیتروژن بر تثبیت بیولوژیک نیتروژن در گیاه یونجه (*Medicago sativa L.*)

مرتضی قلی‌زاده^۱، * سرا... گالشی^۲، ناصر لطیفی^۳ و ابراهیم زینلی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زراعت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۲ دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۳ مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۴ تاریخ دریافت: ۸۴/۹/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۲۱

چکیده

تثبیت بیولوژیک نیتروژن در گیاه یونجه تحت تأثیر عوامل مختلف قرار می‌گیرد، میزان نیتروژن در خاک و نوع کود نیتروژن که به صورت نیترات یا آمونیوم وجود دارد نیز ممکن است تأثیر متفاوت بر تثبیت بیولوژیک نیتروژن داشته باشد. برای بررسی تأثیر میزان و نوع کود نیتروژن بر روی تثبیت بیولوژیک نیتروژن در گیاه یونجه آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در سال ۸۳-۱۳۸۲ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل دو رقم یونجه (همدانی و یزدی)، دو سطح تلقیح و عدم تلقیح و تیمار کود نیتروژن (شاهد، ۱ میلی‌مول نیترات پتاسیم، ۳ میلی‌مول نیترات پتاسیم، ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم و ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم) بودند. بذور یونجه در گلدان‌هایی حاوی شن در گلخانه کشت شد و روزانه با محلول هوگلند بدون نیتروژن همراه با اعمال تیمارهای مورد نظر آبیاری شدند و بوته‌های که تیمار تلقیح داشتند با سوسپانسیون یکنواختی از باکتری تلقیح شدند. بوته‌های یونجه در مرحله ۱۰ درصد گلدهی برداشت و میزان سطح برگ، گره‌زایی، ماده خشک اندام‌های مختلف گیاه و درصد و عملکرد نیتروژن و عملکرد فلورسانس اندازه‌گیری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. کمترین تعداد گره در تیمارهای ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم و ۳ میلی‌مول نیترات پتاسیم به دست آمد. در تیمار ۳ میلی‌مول نیترات پتاسیم که اختلاف معنی‌داری را با شاهد نداشت، کمترین وزن گره حاصل گردید. بالاترین سطح برگ در تیمار ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم و بیشترین وزن خشک کل گیاه، درصد نیتروژن و عملکرد نیتروژن در تیمارهای کودی ۳ میلی‌مول از فسفات آمونیوم و نیترات پتاسیم به دست آمد و از نظر عملکرد فلورسانس نیز تیمار شاهد دارای کمترین عملکرد فلورسانس یا بالاترین بازدارندگی نوری بود. وجود بالاترین وزن گره و تعداد گره در روی ریشه یونجه‌هایی که با محلول غذایی محتوی ۱ میلی‌مول نیترات پتاسیم و ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم رشد نمودند نیاز گیاه یونجه را به مقدار کمی از مکمل نیتروژن معدنی در اوایل رشد گیاه تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تثبیت بیولوژیک نیتروژن، کود نیتروژن، یونجه.

مقدمه

می‌دهند. شواهدی وجود دارد که آمونیوم اثر بازدارندگی کمتری در مقایسه با نیترات دارد (استریتز، ۱۹۸۸). در ارقام مختلف لگوم‌ها اثر بازدارندگی نیترات در گره‌زایی یا تثبیت نیتروژن در مقایسه با آمونیوم در غلظت‌های پایین صورت می‌گیرد یا در مقادیر مشابه از نیترات و آمونیوم اثرات بازدارندگی نیترات در مقایسه با آمونیوم شدیدتر می‌باشد (سیلسبوری و همکاران، ۱۹۸۶).

بسیاری از مطالعات نشان داده است که کاهش دسترسی به نیتروژن عملکرد کوانتومی انتقال الکترون فتوسیستم ۲ (PSII) و حداکثر کارایی آن را می‌کاهد، همچنین کمبود نیتروژن باعث تخریب PSII می‌شود (کانگ مینگ و زانگ، ۱۹۹۹). فجری (۲۰۰۲) بیان کرد که میانگین مقدار ماده خشک ریشه و اندام هوایی یونجه در سطح ۰/۵ میلی‌مول (نیتروژن شروع کننده) نسبت به شاهد بدون نیتروژن افزایش داشت. در مقایسه با استفاده از ۰/۵ میلی‌مول نیتروژن افزایش استفاده از نیتروژن معدنی تا ۵ میلی‌مول موجب کاهش تعداد گره‌های فعال روی ریشه تمام ارقام یونجه‌ها گردید. گیاه یونجه در اوایل دروه رشد به دلیل عدم ثبت نیتروژن رد مراحل اولیه نیاز به کودهای نیتروژن دارد، همچنین نوع کود نیتروژن مورد مصرف می‌تواند بر روی قدرت تثبیت نیتروژن گیاه تأثیر بگذارد. از این رو، اهداف این تحقیق بررسی تأثیر نوع کود نیتروژن (نیترات یا آمونیوم) بر تثبیت بیولوژیک نیتروژن در شرایط تلقیح با باکتری *Sinorhizobium meliolioti* در گیاه یونجه و بررسی واکنش دو رقم یونجه به میزان کود نیتروژن در شرایط تلقیح و عدم تلقیح با باکتری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق به منظور بررسی تأثیر نوع و میزان نیتروژن بر روی رشد و تثبیت بیولوژیک نیتروژن ارقام یونجه در سال ۸۳-۱۳۸۲ در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، انجام شد.

نیتروژن یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید محصولات زراعی است. میانگین مقدار نیتروژن در ماده خشک گیاهان ۱-۲ درصد و گاهی به ۶-۴ درصد نیز می‌رسد. نیتروژن در بین ۱۶ عنصر مورد نیاز گیاهان از نظر اهمیت در جای چهارم قرار دارد. می‌توان گفت هیچ جایی نیست که در آن کمبود نیتروژن وجود نداشته باشد (سرمدنیا و کوچکی، ۱۳۸۲). به جز در مورد گیاهان لگومینوز عکس‌العمل گیاهان نسبت به کودهای نیتروژنه بیش از هر ماده غذایی است. نیتروژن از جمله مواد غذایی است که تخلیه آن از خاک به خوبی مشهود است. گیاه نیتروژن مورد نیاز خود را به صورت نیترات (NO_3^-) و آمونیوم (NH_4^+) از خاک دریافت می‌دارد. نیتروژن جزء اساسی مولکول‌های کلروفیل را تشکیل می‌دهد.

محققان نشان دادند که افزودن کودهای نیتروژنه تأثیری بر عملکرد علوفه یونجه نداشت، زیرا نیتروژن در گیاه به مقدار کافی تثبیت می‌شود. تحقیقات نشان داده است که تثبیت نیتروژن حتی با مقدار زیاد کود نیتروژنه که در سطح مزرعه توزیع شده است، صورت می‌گیرد (بلومتال و راسل، ۱۹۹۶).

افزودن مقدار زیاد نیتروژن باعث کاهش نفوذ باکتری به تارهای کشنده ریشه، کاهش تعداد وتوده گره، و کاهش فعالیت تثبیت نیتروژن ریشه‌های گره‌دار و مقدار نیتروژن کل تثبیت شده در سویا و لپه هندی می‌گردد. اما درجه بازدارندگی به فرم ترکیبات نیتروژنه، جنس، رقم، سوش باکتری ریزوبیوم، فصل، شدت نور، درجه حرارت و شرایط تغذیه گره‌ها بستگی دارد (آگلیشام و همکاران، ۱۹۸۳).

تانگ و همکاران (۲۰۰۱) اظهار کردند که استفاده از نیتروژن و فسفر در اوایل دوره رشد (۰ روز پس از سبز شدن) در مقادیر کم به همراه تلقیح می‌تواند گره‌زایی را تحریک کرده و باعث تثبیت بالای نیتروژن گردد.

مطالعات نشان می‌دهد که شکل‌های مختلف نیتروژن همزیستی لگوم-ریزوبیوم به طور متفاوت تحت تأثیر قرار

۱- کشت و خالص سازی باکتری: برای تهیه باکتری *Sinorhizobium meliloti* مورد نیاز برای تلقیح، بوته‌های یونجه‌ای که دارای گره بودند، از مزارع شهرستان سراب واقع در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری گردید و در آزمایشگاه، گره‌های دارای باکتری از بوته‌های یونجه جداسازی و در محیط ۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم ضد عفونی شد. برای خالص‌سازی باکتری از محیط کشت ¹Y.M.A که شامل KH_2PO_4 به مقدار ۰/۵ گرم، MgSO_4 و $7\text{H}_2\text{O}$ به مقدار ۰/۲ گرم، NaCl به مقدار ۰/۱ گرم، D- Manitol به مقدار ۱۰ گرم، Yeast Extract به مقدار ۰/۸ گرم و آگار به مقدار ۱۵ گرم در لیتر با $\text{pH} = 6.7$ بود، استفاده شد. پس از سه مرحله کشت و خالص‌سازی ۲۵ عدد پتری دیش حاوی باکتری خالص شده به دست آمد که جهت تلقیح استفاده گردید.

۲-۲- آزمایش گلخانه‌ای: آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از دو رقم یونجه (همدانی و یزدی) که از مرکز تحقیقات کشاورزی تبریز تهیه شده بود در دو سطح تلقیح و عدم تلقیح با باکتری ریزوبیوم ملیوتی، دو نوع کود نیتروژن (نترات پتاسیم و فسفات آمونیوم) از هر کدام به میزان ۱ و ۳ میلی‌مول و تیمار شاهد (عدم استفاده از کود نیتروژن)، که در پنج تکرار انجام شد. برای انجام این آزمایش از محیط کشت شنی استفاده گردید و آبیاری به وسیله محلول غذایی هوگلند^۲ بدون نیتروژن (هاردارسون و دانسون، ۱۹۹۳) که شامل MgSO_4 و $7\text{H}_2\text{O}$ به مقدار ۲۴/۶۳ گرم، KH_2PO_2 به مقدار ۱۳/۶ گرم، NaMoO_4 و $2\text{H}_2\text{O}$ به مقدار ۰/۶ گرم، CuSO_4 و $2\text{H}_2\text{O}$ به مقدار ۰/۴ گرم، ZnSO_4 و $7\text{H}_2\text{O}$ به مقدار ۰/۱۱ گرم، $2\text{H}_2\text{O}$ و MnCl_2 به مقدار ۰/۹ گرم، H_3Bo_4 به مقدار ۱/۴۳ گرم، EDTA به مقدار ۳ گرم، FeSO_4 و $7\text{H}_2\text{O}$ به مقدار ۲/۴۹ گرم، K_2SO_4 به مقدار ۲۱/۷۷ گرم و $2\text{H}_2\text{O}$

و CaSO_4 به مقدار ۴۳ گرم در ۱۰۰ لیتر محلول بود، انجام شد.

گلدان‌ها با شن کاملاً شسته شده و عاری از مواد آلی پرگردیدند، بذور ارقام یونجه پس از ضد عفونی و شستشو با آب مقطر در ظرف پتری با آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت خیسانده شدند تا جوانه بزنند. سپس به تعداد ۱۵ بذر در هر گلدان کشت گردید.

پنج روز پس از کاشت گیاهچه‌های مورد نظر با ۲۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون یکنواخت شده باکتری که قبلاً در محیط Y.M.A خالص‌سازی شده بودند، تلقیح گردیدند. برای آبیاری گلدان‌ها، تا زمان سبز شدن از آب مقطر استفاده گردید، اما بعد از مرحله سبز شدن، گلدان‌ها روزانه با محلول غذایی هوگلند بدون نیتروژن همراه با تیمارها نترات پتاسیم و سولفات آمونیوم آبیاری شدند. جهت اعمال تیمارهای نیتروژن مقادیر صفر، ۱ و ۳ میلی‌مول از نترات پتاسیم و فسفات آمونیوم به‌طور جداگانه به هر لیتر محلول غذایی هوگلند اضافه شد، هر هفته یکبار گلدان‌ها با آب مقطر شستشو شدند تا از تجمع بیش از حد نترات و آمونیوم جلوگیری شود. گیاهان رشد کرده در اوایل مرحله گلدهی (هنگامی که حدود ۱۰ درصد گل‌ها باز شده بودند) برداشت و صفات طول ساقه، تعداد و وزن گره در هر بوته، سطح برگ (با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج)، وزن خشک اندام‌های گیاه، درصد نیتروژن با روش میکرو کج‌لدال (نلسون و سامر، ۱۹۷۳) و عملکرد نیتروژن و عملکرد فلورسانس (با استفاده از فلورومتر) اندازه‌گیری شدند. برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار آماری SAS سلطانی (۱۹۹۹) استفاده گردید و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

تعداد گره و وزن گره: بین تیمارهای نوع و میزان کود نیتروژن و سطوح تلقیح از نظر تعداد و وزن گره اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده گردید (جدول

1- Yeast Manitol Agar
2- Hogland

۱). اثر متقابل کود با تلقیح معنی‌دار شد. با توجه به مقایسه میانگین (جدول ۲) تیمارها نوع و میزان کود نیتروژن در سطوح تلقیح، کمترین تعداد گره در تیمارهای ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم و ۳ میلی‌مول نیترات پتاسیم به ترتیب به تعداد ۲۱/۷ و ۲۵ گره به دست آمد. کاهش تعداد گره در تیمار ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم نسبت به تیمار ۱ میلی‌مول نیترات پتاسیم، ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم و شاهد به ترتیب ۵۳ درصد، ۵۰/۷ درصد و ۴۶ درصد بود. نتایج نشان می‌دهد که کودهای آمونیومی تعداد گره را بیشتر از کودهای نیترات تحت تأثیر خود قرار داد. با توجه به جدول مقایسه میانگین (جدول ۲) کمترین وزن گره در تیمار ۳ میلی‌مول نیترات پتاسیم به دست آمد. بین تیمارهای ۳ میلی‌مول نیترات پتاسیم و ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. در تیمار ۱ میلی‌مول نیترات پتاسیم بیشترین وزن گره به دست آمد. این در حالی است که اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ۱ میلی‌مول نیترات پتاسیم و ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم و تیمار شاهد وجود نداشت و همچنین بین سطوح مختلف کود آمونیوم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد.

کاهش تعدادگره با افزایش کودهای نیتروژن در لگوم‌هایی که تثبیت بیولوژیک دارند، مشاهده شده است. هارپر و گیسون (۱۹۸۴) بیان کردند که افزایش غلظت نیترات یکی از عوامل مهم در کاهش تعداد گره‌ها در گیاهچه‌ها یونجه یکساله است که این کاهش در غلظت ۱ میلی‌مول مشاهده شد، همچنین در این غلظت گره‌بندی به تأخیر افتاد درحالی‌که در غلظت ۴ میلی‌مول نیترات پتاسیم به‌طور کلی از گره‌بندی ممانعت شد. لیند و انسون (۱۹۹۰) اعلام نمودند که در غلظت‌های کم، نیتروژن از طریق تحریک تشکیل گره، تحریک فعالیت نیتروژناز و افزایش رشد گیاه بر تثبیت نیتروژن اثر تشدیدکنندگی داشت. با توجه به نتایج (جدول‌های ۲ و ۳) مشاهده می‌شود که تیمارهای کودی نیترات بدلیل ایجاد سطح برگ بیشتر، که

می‌تواند مواد کربوهیدرات بیشتری را در اختیار گیاه قراردهد، نسبت به حالت شاهد روند افزایشی در وزن گره ایجاد می‌کند، البته این روند تا محدوده مشخصی از میزان کود نیترات است، زیرا از این محدوده به بعد وزن گره روند کاهش داشته تا آنجا به‌طوری‌که، وزن گره ایجاد شده به پایین‌تر از مقدار وزن گره به دست آمده در حالت شاهد کاهش می‌یابد. چنین روند تغییراتی در مورد مصرف کود آمونیوم نیز دیده شده اما روند تغییرات در تیمارهای کود آمونیوم، کندتر بود.

سطح برگ: نتایج حاصل از تجزیه واریانس سطح برگ (جدول ۱) نشان داد که بین نوع و میزان کودهای نیترات پتاسیم و فسفات آمونیوم از نظر سطح برگ در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد. با توجه به جدول مقایسه میانگین (جدول ۳) بین تیمارهای نوع و مقادیر کودهای نیتروژن از نظر میانگین سطح برگ اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به‌طوری‌که در تیمار ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم بیشترین سطح برگ و در حالت شاهد کمترین سطح برگ حاصل شد که به ترتیب برابر با ۲۳۲/۸۶ و ۱۴۱/۹۵ سانتی‌متر مربع بر بوته بود در حالی‌که تیمارهای ۱ و ۳ میلی‌مول نیترات پتاسیم و ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. میزان متوسط سطح برگ در تیمار ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم نسبت به تیمار شاهد بدون نیتروژن ۶۴ درصد افزایش داشت (جدول ۳).

با افزایش میزان کود نیتروژن سطح برگ افزایش یافت ولی البته این افزایش تا محدوده مشخصی از کود نیتروژن دیده می‌شود. این نتیجه‌گیری با نتایج گالشی و حیدری (۲۰۰۲) در گیاه شبدر زیرزمینی که حداکثر سطح برگ در حضور ۲/۵ میلی‌مول نیترات پتاسیم بدست آمده (۱ و ۵ میلی‌مول نیترات پتاسیم) بود و همچنین با نتایج فجری (۲۰۰۲) در یونجه مطابقت دارد.

جدول ۱- تجزیه واریانس صفات، تعداد گره، وزن گره، درصد نیتروژن، سطح برگ، وزن خشک کل گیاه، عملکرد نیتروژن و عملکرد فلورسانس در ارقام یونجه.

منابع تغییر	درجه آزادی	تعداد گره	وزن گره	درصد نیتروژن	سطح برگ	وزن خشک کل گیاه	عملکرد نیتروژن	عملکرد فلورسانس (fv/fm)
تکرار	۴	۱۷۴/۹۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۶ ^{ns}	۰/۵۲۶ ^{ns}	۱۵۹۱۵/۸۳ ^{ns}	۳/۰۴ ^{ns}	۳۰/۵۵ ^{ns}	۰/۰۱۴۸ ^{ns}
تلقیح	۱	۳۵۵۳۲/۲۵ ^{**}	۰/۱۳۸ ^{**}	۰/۰۸۸ ^{ns}	۶۰/۲۷ ^{ns}	۰/۰۱۴ ^{ns}	۳۰/۶۴ ^{ns}	۰/۰۰۸۱ ^{ns}
رقم	۱	۶۲/۴۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۱۵۶ ^{ns}	۱۳۰۲/۲ ^{ns}	۰/۰۰۰۶ ^{ns}	۱۶/۰۴ ^{ns}	۰/۰۲۱۶ ^{ns}
کود	۴	۴۵۹/۱۷۵ ^{**}	۰/۰۰۱۱ [*]	۰/۸۴۶ ^{**}	۲۲۹۷۳/۱ ^{**}	۱۵/۱۷۶ ^{**}	۱۳۳/۲۴ ^{**}	۰/۱۰۰۸ ^{**}
تلقیح×رقم	۱	۶۲/۴۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۰ ^{ns}	۰/۱۱۶ ^{ns}	۲۵۹۷/۷۳ ^{ns}	۰/۶۸۹ ^{ns}	۱۸/۷۲ ^{ns}	۰/۰۰۱۹۶ ^{ns}
تلقیح×کود	۴	۴۵۹/۱۷۵ ^{**}	۰/۰۰۱۱ [*]	۰/۰۲۲ ^{ns}	۲۰۹۲/۲۵ ^{ns}	۰/۱۶ ^{ns}	۵/۳۳ ^{ns}	۰/۰۰۳۳ ^{ns}
رقم×کود	۴	۹۹/۲۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۶ ^{ns}	۰/۰۶۲ ^{ns}	۴۷۱۴/۹ ^{ns}	۱/۴۷۸ ^{ns}	۱۹/۴۴ ^{ns}	۰/۰۰۳۹۹ ^{ns}
تلقیح×رقم×کود	۴	۹۹/۲۸ ^{ns}	۰/۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۳۷ ^{ns}	۱۸۶۴/۴ ^{ns}	۰/۳۵۵ ^{ns}	۵/۴۴ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}

**،* ns در هر ستون به ترتیب نشان‌دهنده علوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۵درصد و ۱درصد می‌باشد در ارقام یونجه.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل فاکتورهای مایه‌زنی و کود برای وزن گره (گرم) و تعداد گره در ارقام یونجه.

میزان و نوع کود نیتروژن	تلقیح		عدم تلقیح	
	وزن گره (گرم)	تعداد گره	وزن گره (گرم)	تعداد گره
شاهد (صفر میلی مول)	۰/۰۷۸۴ ^{ab}	۳۸/۷ ^a	۰/۰	۰/۰
۱ میلی مول نیترات پتاسیم	۰/۰۹۲۱ ^a	۴۶/۱ ^a	۰/۰	۰/۰
۳ میلی مول نیترات پتاسیم	۰/۰۵۷ ^b	۲۵ ^b	۰/۰	۰/۰
۱ میلی مول فسفات آمونیوم	۰/۰۸۷۰ ^a	۴۴ ^a	۰/۰	۰/۰
۳ میلی مول فسفات آمونیوم	۰/۰۶۱۲ ^b	۲۱/۷ ^b	۰/۰	۰/۰
LSD(%5)	۰/۰۲۵	۱۲/۸	۰/۰	۰/۰

در هر ستون تیمارهای که مشترک دریافت نموده‌اند از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۳- جدول مقایسه میانگین صفات سطح برگ، وزن خشک کل گیاه، درصد نیتروژن، عملکرد نیتروژن و عملکرد فلورسانس در ارقام یونجه.

نوع و مقادیر کود نیتروژن	درصد نیتروژن	سطح برگ (سانتی متر مربع بر بوته)	وزن خشک کل گیاه (گرم)	عملکرد نیتروژن (گرم در گرم ماده خشک گیاه)	عملکرد فلورسانس
شاهد(صفر میلی مول)	۲/۱۱ ^b	۱۴۱/۹۵ ^c	۲/۴۸۶ ^c	۰/۰۵۲۳ ^c	۰/۶۶۷ ^c
۱ میلی مول نیترات پتاسیم	۲/۳۰ ^b	۱۸۲/۳۷ ^b	۳/۵۶۳ ^b	۰/۰۹۰۳ ^b	۰/۸۰۸ ^b
۳ میلی مول نیترات پتاسیم	۲/۶۳ ^a	۱۹۷/۲۲ ^b	۴/۴۶۳ ^a	۰/۱۲۱۷ ^a	۰/۸۲۷ ^{ab}
۱ میلی مول فسفات آمونیوم	۲/۵۹ ^a	۱۶۷/۷۷ ^{bc}	۳/۱۸۲ ^b	۰/۰۸۶ ^b	۰/۸۰۸ ^b
۳ میلی مول فسفات آمونیوم	۲/۷۶ ^a	۲۳۲/۸۶ ^a	۴/۵۴۱ ^a	۰/۱۳۸ ^a	۰/۸۴۵ ^a
LSD(%5)	۰/۲۵	۳۳/۹۸	۰/۶۷	۰/۰۲۵۱	۰/۰۳۴

با توجه به نتایج آزمایش و ایجاد سطح برگ بالاتر در ۳ میلی مول فسفات آمونیوم به نظر می‌رسد که گیاه سطح برگ بیشتری در تیمارهای کود آمونیوم نسبت به تیمارهای کود نترات تولید می‌کند. گیاه با تکیه بر نیتروژن به دست آمده از گره‌ها در اوایل رشد نمی‌تواند به سطح برگ مطلوب برسد. بنابراین نیاز به مقداری نیتروژن در اوایل رشد دارد، که از یک طرف آسیبی به مکانیسم تثبیت نیتروژن وارد نکند، از طرف دیگر نیاز گیاه را برای رسیدن به سطح مطلوب برگ تأمین کند.

وزن خشک کل گیاه: نتایج حاصل از تجزیه واریانس وزن خشک کل گیاه (جدول ۱) نشان داد که بین تیمارهای نوع و میزان کود نیتروژن از نظر وزن خشک کل گیاه اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد وجود دارد. باتوجه به جدول مقایسه میانگین (جدول ۳) با افزایش کود نیتروژن چه به صورت آمونیوم و یا نترات میزان ماده خشک کل گیاه افزایش یافت. در تیمار شاهد (بدون استفاده از کود) متوسط وزن خشک کل گیاه ۲/۴۸۶ گرم بود، در حالی که در تیمار ۳ میلی مول فسفات آمونیوم و ۳ میلی مول نترات پتاسیم متوسط وزن خشک کل گیاه به ترتیب برابر با ۴/۵۴ و ۴/۶۴ گرم بود. بین تیمارهای نوع کود نیتروژن به صورت آمونیوم و نترات اختلاف معنی‌دار مشاهده نگردید، در حالی که بین مقادیر مختلف از کودهای نترات یا آمونیوم اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید. افزایش وزن خشک کل گیاه در تیمارهای ۳ میلی مول نترات پتاسیم و ۳ میلی مول فسفات آمونیوم نسبت به حالت شاهد بدون کود به ترتیب برابر با ۸۲/۶ و ۷۹/۵ درصد بود. وزن خشک کل شامل وزن خشک قسمت‌های مختلف گیاه مثل ساقه، ریشه، برگ و گره می‌باشد که با افزایش کود نیتروژن وزن خشک کل افزایش یافت. این افزایش بیشتر مربوط به افزایش وزن ساقه و برگ و تا حدودی ریشه بود زیرا افزایش کود نیتروژنی علاوه بر اینکه تأثیر بازدارنده‌ای در تشکیل گره دارد. باعث می‌شود که وزن خشک گره‌های روی ریشه کاهش زیادی پیدا کند.

درصد نیتروژن: با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) بین میزان و نوع کود نیتروژن از نظر میزان نیتروژن اندام‌های گیاهی اختلاف معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) مشاهده گردید. نتایج حاصل از مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان داد با افزایش میزان نیتروژن چه به صورت آمونیوم و یا نترات درصد نیتروژن گیاه افزایش یافت. درصد نیتروژن گیاه در تیمار شاهد بدون نیتروژن ۲/۱۱ بود در حالی که درصد نیتروژن گیاه در تیمار ۳ میلی مول فسفات آمونیوم و ۳ میلی مول نترات پتاسیم به ترتیب برابر با ۲/۷۶ و ۲/۶۳ بود. در تیمارهای کود نیتروژن نترات بین ۱ و ۳ میلی مول نترات اختلاف معنی‌دار مشاهده گردید در حالی که در تیمارهای کود نیتروژن به صورت آمونیوم بین تیمارهای ۱ و ۳ میلی مول فسفات آمونیوم اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد همچنین بین تیمارهای ۱ میلی مول نترات پتاسیم و ۱ میلی مول فسفات آمونیوم اختلاف معنی‌دار وجود داشت. افزایش متوسط درصد نیتروژن در تیمارهای ۳ میلی مول نترات پتاسیم و ۳ میلی مول فسفات آمونیوم نسبت به تیمار شاهد به ترتیب برابر با ۲۳/۲ و ۳۰ درصد بود که نتایج با یافته‌های بر روی یونجه (فجرى، ۲۰۰۲) که با افزایش میزان کود نیتروژن درصد نیتروژن گیاه افزایش می‌یابد. می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش درصد نیتروژن در تیمار ۳ میلی مول نترات پتاسیم و ۳ میلی مول فسفات آمونیوم به دلیل افزایش فعالیت تثبیت نیتروژن به صورت همزیستی نمی‌باشد زیرا در این تیمارها تعداد گره و وزن گره‌ها نسبت به شاهد شدیداً کاهش نشان داد (جدول ۲). بنابراین افزایش میزان نیتروژن گیاه در این تیمارها حاصل افزودن کودهای نیتروژن از محیط ریشه است.

عملکرد نیتروژن: برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر در مورد تثبیت بیولوژیک نیتروژن ارقام یونجه باید از عملکرد نیتروژن استفاده کرد. عملکرد نیتروژن هر بوته که حاصلضرب درصد نیتروژن در وزن خشک کل هر بوته می‌باشد، همان روند موجود در رابطه با درصد نیتروژن در بین ارقام یونجه حاصل از تیمارهای کود نیتروژن را نشان می‌دهد.

به عبارت دیگر، با افزایش کود نیتروژن علاوه بر افزایش وزن خشک هر بوته، درصد نیتروژن هم افزایش یافته و منجر به افزایش عملکرد نیتروژن هر بوته خواهد شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) عملکرد نیتروژن نشان می‌داد که بین تیمارهای کود نیتروژن از نظر عملکرد نیتروژن اختلاف معنی‌دار (سطح یک درصد) وجود دارد. مقایسه میانگین (جدول ۳) تیمارهای کود نیتروژن نشان می‌دهد که تیمار شاهد (بدون استفاده از نیتروژن) کمترین عملکرد نیتروژن را دارد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارهای کودی داشت. تیمار ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم و ۳ میلی‌مول نترات پتاسیم با دارا بودن عملکرد نیتروژن ۰/۱۳۷۹ و ۰/۱۲۱۷ اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند و بالاترین عملکرد نیتروژن را داشتند. تیمارهای ۱ میلی‌مول نترات پتاسیم و ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم نیز اختلاف معنی‌داری از نظر عملکرد نیتروژن با یکدیگر نشان ندادند اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشتند.

نتایج این بررسی نشان داد که تیمار کود نیتروژن بر درصد نیتروژن بافت‌های گیاه (ریشه، ساقه و برگ) بطور معنی‌داری تأثیر گذاشته و با افزایش کود نیتروژن درصد نیتروژن افزایش یافته است. با افزایش کود نیتروژن تعداد گره‌ها در هر بوته کاهش می‌یافت، این کاهش می‌تواند بر روی تثبیت بیولوژیک نیتروژن اثر نامطلوب داشته باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش عملکرد نیتروژن در تیمارهای کودی ۳ میلی‌مول نترات پتاسیم و ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم حاصل استفاده از کودهای نیتروژن بوده است.

عملکرد فلورسانس (fv/fm): عملکرد فلورسانس عبارت از نسبت تغییرات فلورسانس به حداکثر فلورسانس است. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۱) بین تیمارهای میزان و نوع کود نیتروژن از نظر عملکرد فلورسانس اختلاف معنی‌دار (در سطح ۱ درصد) وجود داشت. مقایسه میانگین عملکرد فلورسانس (جدول ۳) نشان داد که با افزایش میزان کود نیتروژن میزان متوسط

عملکرد فلورسانس افزایش می‌یابد. میزان متوسط عملکرد فلورسانس در تیمار شاهد برابر با ۰/۶۶۷ بود. تیمار ۳ میلی‌مول نترات پتاسیم و ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم دارای متوسط عملکرد فلورسانس به میزان ۰/۸۴۵ و ۰/۸۲۷ بودند. بین تیمارهای کودی ۳ میلی‌مول نترات و ۳ میلی‌مول آمونیوم اختلاف معنی‌داری از نظر آماری وجود نداشت، همچنین بین ۳ میلی‌مول نترات با ۱ میلی‌مول نترات پتاسیم و ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. میزان کاهش عملکرد فلورسانس در تیمار شاهد (با کمترین میزان عملکرد فلورسانس) نسبت به تیمار ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم و ۳ میلی‌مول نترات پتاسیم به ترتیب برابر با ۲۶ و ۲۱ درصد بود. میزان عملکرد فلورسانس در تیمار کودی بدون نیتروژن کمترین مقدار خود را داشت، و با افزایش کود نیتروژن به صورت آمونیوم یا نترات افزایش در عملکرد فلورسانس مشاهده گردید. با افزایش فلورسانس کارایی فتوسیستم و انتقال الکترون کاهش یافته و تأمین الکترون مورد نیاز برای نسبت بیولوژیک نیتروژن با اختلال مواجه می‌گردد.

تیمار ۳ میلی‌مول فسفات آمونیوم با بالاترین میزان ماده خشک کل گیاه از یک طرف و عدم تفاوت معنی‌دار در وزن گره نسبت به حالت شاهد از طرف دیگر، نشان دهنده این نکته است که نیتروژن به صورت آمونیوم تأثیر کمتری را در بازداری از انتقال مواد فتوسنتزی به گره‌ها در مقایسه با کودهای نیتروژنه به صورت نترات دارد. وجود بالاترین وزن گره و تعداد گره در روی ریشه یونجه‌هایی که با محلول غذایی محتوی ۱ میلی‌مول نترات پتاسیم و ۱ میلی‌مول فسفات آمونیوم رشد نمودند نیاز گیاه یونجه را به مقدار کمی از مکمل نیتروژن معدنی در اوایل رشد گیاه تأیید می‌کند. دلایل و مکانیسم‌های چگونگی بازدارندگی اثر کودهای نیتروژنه از مدتها پیش مورد مطالعه قرار گرفته است. رسیدن محصول فتوسنتز به گره‌ها باعث عدم تشکیل گره در روی ریشه می‌شود، زیرا کربوهیدرات حاصل همراه نیتروژن معدنی قبل از به کار رفتن در

جریان انرژی را به گره‌ها کاهش دهند اما نیترات اثر بیشتری بر روی فعالیت آنزیم نیتروژناز دارد. از طرف دیگر، آمونیوم به احتمال زیاد تأثیر بیشتری را بر روی تشکیل گره داشته باشد.

تشکیل گره به مصرف رشد گیاه می‌رسد. لاتیمور (۱۹۷۶) بیان کرد که در گیاه سویا اختلاف معنی‌داری بین فرم نیتروژن بصورت آمونیوم یا نیترات در انتقال مواد فتوسنتزی به گره‌ها وجود نداشت. این مسأله نشان می‌دهد که هر دو منبع نیتروژنی توانند به‌طور تقریباً یکسان

منابع

1. Blumental, J.M., and Russelle. M.P. 1996. Subsoil nitrate uptake and symbiotic dinitrogen fixation by alfalfa. *J. Agri.* 88: 909-915.
2. Conming. L., and Zang, J. 2000. Photosynthetic CO_2 assimilation chlorophyll fluorescence and photoinhibition as affected by nitrogen deficiency in maize plants. *J. Plant. Sci.* 151: 135-143.
3. Duong, T.P., Diep, C.N., Dag, V.H., Hiep, N.H., and Thuan, T.H. 2000. Evaluation of nitrogen fixation by soybean- rice ^{15}N Technique. preceding of third national conference of Nuclear Physics and Techniques. 190-201.
4. Eglissham, A.R.J., Hassouna, S., and Seegers, R. 1983. Fertilizer-N effects on N_2 fixation by cowpea and soybean. *J. Agro.* 75: 61-66.
5. Fajri, A. 2002. Effects of inoculation and different amounts of nitrogen on the growth and Nodulation in alfalfa cultivars (*Medicago sativa* L.) Iranian Journal of Agricultural Sciences. Vol. 32. No 2. PP: 309-317.
6. Galeshi, S., and Hedari, H. 2002. Effect of nitrate on growth and biological nitrogen fixation in Subterranean clover (*Trifolium subterranean* L.). *Agricultural Sciences and Technology.* Vol. 16. No. 2. PP: 68-73.
7. Hardarson, G., and Danson, S.K.A. 1993. Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil* 125:19-23.
8. Harper, J.E., and Gibson, A.H. 1984. Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. *Crop. Sci.* 24:797-801.
9. Imsand, J. 1986. Inhibition of nodule development in soybean by nitrate or reduced nitrogen. *J. of Exp. Bot.* 37(176): 348-355.
10. Latimor, M., Gidsens, J.J., and Ashley, D.A. 1976. Effect of ammonium and nitrate nitrogen upon photosynthesis supply and nitrogen fixation by soybean. *Crop. Sci.* 17: 399-404.
11. Lynd, J.G., and Anson, T.R. 1990. Soil conditions with distinctive coralloid nodulation and nitrogen fixation of Mecca alfalfa. *J. Plant Nutr.* 13: 77-94.
12. Sarmadnia, Gh., and Kochehi, A. 2004. *Crop physiology.* Jahad daneshgahy Publisher. Ferdosi Mashhad University. P. 400.
13. Soltani, A. 1999. Application of SAS in statistical analysis. Jahad Daneshgahy Publisher. Ferdosi. Mashhad University. P. 166.
14. Nelson, D.W., and Sommer, L.E. 1973. Determination of total nitrogen in plant material. *Agron. J.* 65: 109-111.
15. Silsbury, J.H., Cat chpoole, D.W., and Wallace, W., 1986. Effects of nitrate and ammonium on nitrogenase (C_2H_2 reduction) activity of swards of subterranean clover (*Trifolium subterraneum*), *Aust. J. Plant. Physiol.* 13:257-273.
16. Streeter, J. 1988. Inhibition of legume formation and N_2 fixation by nitrate. *CRC crit Rev Plant Sci.* 7:1-23.
17. Tang, C., Hinsinger, P. Dervon, J.J., and Jaillard, B. 2001. Phosphorus deficiency impairs early nodule functioning and enhances release in roots of (*Medicago truncatula* L.) *J. Annals of Botany.* 88: 131-138.

The effect of amount and kind nitrogen fertilizer in biological nitrogen fixation in alfalfa (*Medicago sativa* L.)

M. Gholizadeh¹, *S. Galeshi², N. Latifi³ and E. Zeinali⁴

¹M.Sc. student of Agronomy, Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Iran, ²Associate Prof. of Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Iran, ³Prof. of Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Iran, ⁴Instructor of Dept. of Agronomy, Gorgan University of Agricultural Science and Natural Resources, Iran

Abstract

The biological nitrogen fixation is effected by different factors in alfalfa. The amount of nitrogen fertilizer and kind of nitrogen fertilizer may have different effects on biological nitrogen fixation. For study effect of amount and kind if nitrogen fertilizer on alfalfa cultivars, and experiment was conducted as factorial randomized completed block design, in 2004 greenhouse of Agriculture College of Agricultural Sciences and Natural Resources University of Gorgan. The experiment treatments included two cultivar of alfalfa (Hamedani-Yazdi) two inoculation surface and non-inoculation and treatments of nitrogen fertilizer (control, 1 m. Mol of nitrate, 3m. Mol of nitrate, 1m. Mol of ammonium, 3m. Mol of ammonium). The alfalfa seeds was grew pots contained sand in greenhouse and irrigating by non-nitrogen Hogland solution with function of favorite treatment and the plant have inoculation treatment inoculated by homogenous suspension of bacteria. After that alfalfa plants reached to 10% flowering were harvested and measured amount of leaf area, node number, node weight, dry matter of different organs, the nitrogen percent, yield and fluorescents yield. The least node number (was obtained) in 3m. Mol (NH₄)PO₃ and 3 m.Mol KNO₃ treatments. The least node weight was obtained in 3m. Mol KNO₃ treatment that had non significant different with control. The highest leaf area was obtained in 3 m.Mol(NH₄)PO₄ treatment and the highest total dry weight of plant, nitrogen percentage and nitrogen yield were obtained in 3 m.Mol (NH₄)₃PO₄ and KNO₃ treatment. The control had the flouresense yield or the highest light inhibition. Higher existence of nodule weight and nodule number on root of aflafa plants that grow by nutrient solution including 1 m.Mol nitrat and 1 m.Mol ammonium confirm the necessity of alfalfa plants in amount of mineral nitrogen complement in early plant growth.

Keywords: Biological Nitrogen Fixation; Nitrogen; Alfalfa

*- E-mail: sgalessi@yahoo.com