نگاهی به تکنولوژی مایه زنی بذر گیاهان لگومینه (قسمت دوم)

Legume seed inoculation technology (Part two)

سعید شکیب منش

کارشناس ارشد علوم و تکنولوژی بذر، حوزه مدیریت بذر تحقیقات آموزش، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

فرآیند پوشش‌دهی بذر

فرآیند پوشش‌دهی بذر باید کنترل شده و مداوم باشد. بذور به کمک ابزارآلات مختلفی پوشش‌دهی می‌شوند. اگرچه این فرآیند بسته به شرکت تولیدی، متفاوت است اما اصول پایه‌ای و اساسی آن کاملاً مشابه می‌باشد. در سطح مزرعه، برای پوشش‌دهی بذر قبل از بذرپاشی، آن را با غبار پیت آغشته به مایه تلقیح و یا با شربت چسبناک آغشته به مایه تلقیح و سنگ آهک، پوشش‌دهی می‌کنند. در اینجا باید تصریح کرد که نوع روش پوشش‌دهی بسته به فرد بکارگیرنده و نوع رقم لگوم متفاوت می‌باشد. اگرچه درباره‌ی استفاده از پوشش‌های شیمیایی مطالعات زیادی صورت گرفته، اما هنوز اثرات آن‌ها بر میزان زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها به طور کامل و واضح معلوم نمی‌باشد. در هنگام بذرپاشی، فشار زیادی که به بذر در هنگام خروج از خطی‌کار بذر وارد می‌شود، باعث از دست رفتن ریزوبیوم پوشش داده شده به بذر می‌گردد. گرمای موتور هم می‌تواند باعث تخریب آن‌ها در پمپ هوا شود. بذور بسیاری از لگوم‌های مرتعی، به وسیله‌ی غلطک چرخشی پوشش‌دهی می‌شوند چراکه این روش بسیار مقرون به‌صرفه و ساده می‌باشد. دراین‌باره باید افزود که آمیخته‌ی سیمانی و آرد مایه برای پیش مایه‌زنی بذر همراه با سنگ آهک نیز استفاده می‌شود. با استفاده از سنگ آهک خرد شده یا سایر مواد چسبناک مایه تلقیح را به بذر چسبانده و سپس به داخل غلطک اضافه می‌شود. ممکن است که پس از این مرحله به آن‌ها یک ماده‌ی چسبناک اسپری شود. در مواقعی که فاصله زمانی بین بذرپاشی و مایه‌زنی باشد، بذور را در هوای آزاد یا با دمیدن فشاری هوا در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بر روی بستر هوا خشک می‌کنند. زمان مخلوط کردن و مقدار ماده‌ی چسبناک استفاده شده برای پوشش‌دهی، همگی پارامترهایی هستند که خصوصیات فیزیکی بذور مایه‌زنی شده را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. در پوشش‌های سنگ آهک، لازم است که پوششی از جنس سنگ آهک هم اضافه شود تا از هدرروی آن‌ها جلوگیری بعمل آید. درصورتی که بذرها شکلی صیقلی به خود بگیرند بیانگر آن است که به مدت طولانی عمل ترکیب صورت گرفته یا سنگ آهک کافی به آن اضافه نشده است. این پلیت‌ها باید به قدری مقاوم باشند که با لمس کردن و افتادن، از بذر جدا نشوند. گفتنی است که تکنولوژی بستر آبکی، برای پوشش‌دهی بذور لگوم‌ها از عمومیت کمتری برخوردار است. در این روش، بذور را بر روی بسترهای خاصی معلق کرده و با فشارهوا، شربت حاوی مایه تلقیح به آن‌ها اسپری می‌شود. این روش باعث تولید پوشش‌های مقاوم و بادوام می‌شود اما زنده‌مانی مایه تلقیح، احتمالاً به دلیل اعمال دمای بالا (۳۵ درجه سانتی‌گراد)، به حد زیادی پایین می‌باشد. استحکام پوشش یکی از مشخصه‌های مهم آن می‌باشد اما باید در کنار آن قابلیت زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها را هم تضمین کند و باید تأکید کرد که دراین باره تحقیقات بیشتری بایستی انجام شود.

زنده‌مانی و بقای ریزوبیوم‌ها بر روی بذر

مرگ و میر ریزوبیوم‌ها زمانی فرا می‌رسد که شرایط محیطی نامطلوبی داشته باشند. در اوایل قرن بیستم

محققین متوجه این مشکل شده و برای حل آن اقداماتی اندک از قبیل استفاده از مواد چسبناک برای مایه‌زنی و نگه‌داری در دماهای پایین ارائه نمودند. اغلب این روش‌ها برای افزایش غده‌زایی بوده که نشان از بالا رفتن میزان بقای ریزوبیوم‌ها می‌باشد. فاکتورهای بسیاری مربوط به مرگ و میر در زمان مابین مایه‌زنی و بذرپاشی در بذور لوپن (Lupine) شناسایی شد که همگی باعث کاهش محصول نهایی شدند. زمانی که بذری با برادی‌ریزوبیوم (Bradyrhizobium) با غلظت اولیه‌ی 10^5 مایه‌زنی شود در زمان بذرپاشی تنها ۴/۸ درصد آن یعنی $\log_{10}3.83$ زنده بودند (چهار ساعت پس از مایه‌زنی) و پس از ۲۲ ساعت، تنها ۰/۸۳ درصد از آن‌ها یعنی 10^3 زنده ماندند. از طرفی افزایش مایه‌زنی از $\log_{10}4.27$ به ۶/۲۷ و ۷/۲۸ خود باعث غده‌زایی اولیه و تولید غده‌های حجیم می‌شود. میزان مطلوب پیشنهادی مایه‌زنی بذور باقلا، جمعیتی حدود $\log_{10}5.55$ ریزوبیوم در هر بذر را فراهم می‌کند. الگبا و رنی (۱۹۸۴) دریافتند که بذر سویا، زمانی که با جمعیتی معادل 10^6 در هر بذر مایه‌زنی شود، نسبت به مقدار پیشنهادی (10^5) از بازدهی مطلوب‌تری برخوردار می‌باشد. همچنین، هیوم و بلیر(۱۹۹۲) نشان دادند که در بذور سویا، با افزایش میزان مایه‌زنی از 10^5 به $\log_{10}6.0$ میزان محصول نهایی به طور چشمگیری (۲۵-۱۵ درصد) افزایش پیدا کرد. به روشنی پیداست که این افزایش در نتیجه‌ی افزایش میزان بقا و ماندگاری ریزوبیوم‌ها بوده است.

فاکتورهای مؤثر بر بقای ریزوبیوم‌ها روی بذر

متأسفانه مرگ ریزوبیوم‌ها مسئله‌ایست که در میان تمام روش‌های مایه‌زنی ، عمومیت داشته و گفته می‌شود که از چند علت اصلی از جمله خشک کردن، ماهیت مواد سمی پوشش بذر، تراوش شدن مواد سمی از آن و در نهایت دمای نامناسب انبارداری بذر ناشی می‌شود. خشک شدن یکی از علل اصلی مرگ ریزوبیوم‌ها به حساب می‌آید. در مطالعه‌ای که بر روی بقای سویه‌ی باکتری *Rhizobium. leguminosarum* bv. *trifolii* روی غده‌های ریشه‌ای انجام گرفت معلوم شد که تحت شرایط خشکی دو فاز مشخص مرگ بوجود می‌آید. پس از یک سرعت آغازی در کاهش شمار سلول‌ها از ساعت صفر تا ۲۴ ساعت که مقارن است با از دست رفتگی سریع آب، یک مرحله‌ی دیگر خواهد بود که طی آن از دست رفتن آب و به دنبال آن مرگ ریزوبیوم‌ها به شدت کاهش می‌یابد. بهترین رطوبتی که در آن هیچگونه مرگ سلولی اتفاق نمی‌افتد ۱۰۰ درصد رطوبت می‌باشد اما در ۶۰ درصد رطوبت و پس از ۲۰ ساعت سپری شدن زمان، تقریباً هیچگونه سلول زنده‌ای باقی نمی‌ماند. لذا اینگونه به نظر می‌رسد که ارتباطی تنگاتنگ مابین میزان آب و میزان زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها وجود دارد. البته گفتنی است که میزان مقاومت به شرایط کم‌آبی در بین سویه‌های مختلف ریزوبیومی متفاوت می‌باشد. مطالعات نشان دادند که در خاک‌های شنی و در شرایط خشکی، سویه‌های با سرعت رشد کم از مقاومت بالایی در مقایسه با سویه‌های سریع‌الرشد دارا می‌باشند. دراین‌باره آزمایشی انجام شده است که در آن به ۱۰ گرم خاک خشک شده در هوای آزاد، چهار میلی‌لیتر شامل دو سویه‌ی سریع و کند رشد ریزوبیوم مایه زده شد بطوری‌که در هر گرم از خاک یک میلیون باکتری وجود داشت. پس از خشک کردن در آون با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، تنها ۱۰۰ عدد از باکتری‌های سریع‌الرشد توانستند زنده بمانند این درحالی است که تعداد نوع کند رشد آن‌ها در هر گرم خاک 10^5 بودند. رطوبت نسبی محیط بر روی سویه‌ی *Sinorhizobium.*

meliloti and *Bradyrhizobium japonicum* اثر گذاشته و حرکت آن را در فیلترهای سلولزی متوقف می‌کند. سرعت خشک کردن اثری بسیار حیاتی بر روی زنده‌مانی باکتری‌ها دارد طوری که پس از ۱۰۰ روز نگهداری در رطوبت ۲۲، ۴۳/۶ و ۶۷/۸ درصد، تعداد باکتری‌های زنده 10^2 بود در حالیکه در همین مدت ولی با دامنه‌ی رطوبت نسبی سه و ۸۳/۵ درصد تقریباً اثری از ریزوبیوم‌های زنده مشاهده نشد. در رابطه با سویه‌ی *B. japonicum* باید گفت که بقا و تداوم باکتری‌ها پس از ۱۰۰ روز و در تمامی رطوبت‌های نسبی مختلف به صفر رسید. رطوبت‌دهی مجدد پس از خشک شدن پوشش‌های انجام شده، در صورتی که با آهستگی انجام شود اثربخشی خیلی بهتری در مقایسه با زمانی دارد که این رطوبت‌دهی سریع انجام شود. مواد قابل حل خارج شده از پوشش بذر نیز می‌تواند اثری بازدارنده بر ریزوبیوم‌ها داشته باشد. مطالعاتی که وینسنت و همکاران (۱۹۵۸) بر روی گیاه *Trifolium. subterraneum* cv. *Woogenellup* انجام دادند، نشان دادند که زمان مرگ‌ومیر در شرایط خشکی صفر تا ۲۷ ساعت را می‌توان به دو مرحله‌ی مجزای صفر تا پنج ساعت و پنج تا ۲۷ ساعت تقسیم کرد. بیشترین مرگ در مرحله‌ی اول بوده که نشان از اثرات بازدارندگی مواد پوسته‌ای در شرایط حضور رطوبت می‌باشد (در پنج ساعت اولیه رطوبت بیشتری وجود دارد). انبار کردن بذور مایه‌زده شده، در دماهای پایین (پنج درجه سانتی‌گراد) باعث افزایش میزان زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها می‌شود. وینسنت (۱۹۶۲)، در آزمایشی نشان داد که افزایش دما از پنج درجه سانتی‌گراد به ۲۶ و پس از آن ۳۷ درجه سانتی‌گراد باعث افزایش نرخ مرگ و میر ریزوبیوم‌ها می‌شود. البته گزارشاتی ارائه شد که برخی از ریزوبیوم‌ها توانایی تحمل دماهای بالا (تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد) را دارا می‌باشند. اثر استرس دمایی زمانی به طور چندین برابری خواهد بود که بذرپاشی در زمین‌خشک انجام شود. این مسئله می‌تواند یکی از چالش‌های بزرگ در کشورهای استوایی باشد چراکه دمای خاک در این مناطق می‌تواند تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد هم بالا برود. لذا در این خاک‌ها لازم است از سویه‌های بومی این مناطق استفاده کرد. اثر خشکی و دما بر روی مرگ‌ومیر ریزوبیوم‌ها به یک اندازه نیست؛ ریزوبیوم‌ها به رطوبت‌های گرم نسبت به تنش گرم و خشک حساسیت بیشتری دارند. در این رابطه، وایکینز (۱۹۶۷) دریافت که سویه‌ی باکتری روی گیاه *Meticago* spp. قابلیت زنده‌مانی به مدت ۳۲ ساعت در خاک خشک با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد را دارا می‌باشد در حالیکه در خاک مرطوب با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد تنها پنج ساعت دوام می‌آورد. به‌طور خلاصه، بقا و زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها بر روی بذور لگوم، متأثر از فاکتورهای محیطی از قبیل خشکی، دمای بالا و اثرات بازدارندگی مواد ترشح شده از پوسته‌ی بذر است.

فرموله کردن مایه تلقیح و زنده‌مانی آن‌ها

رایج‌ترین شیوه‌ی فرموله کردن مایه تلقیح استفاده از محیط آگار، پیت، محیط‌مایع، Freeze-dried و گرانوله می‌باشد. دیت (۱۹۵۹)، نشان داد که استفاده از محیط‌های پیت، نسبت به محیط‌های آگار دارای مزایای بیشتری می‌باشد. محیط‌های آگار تنها در صورتی می‌توانند مناسب باشند که به آن‌ها ساکارز با غلظت ۱۰ درصد اضافه شود. سلول‌های کشت شده در پیت و آگار، هر دو در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۲۵ درجه سانتی‌گراد از زنده‌مانی بالاتری برخوردار بودند. لذا با استناد به یافته‌های پیشین می‌توان به این نتیجه رسید

که انبارکردن در دماهای پایین و کاربرد افزودنی‌های خاص به مایه تلقیح، باعث افزایش زنده‌مانی و بقای ریزوبیوم‌ها می‌شود. تمامی این محیط‌های کشت بایستی دو پارامتر مهم شامل فراهم کردن محیطی برای رشد و محافظت از آن‌ها برای نگه‌داری طولانی مدت را داشته باشند. به دلیل کمبود پیت در اغلب کشورها، موادی جایگزین از قبیل خاک رس، زغال سنگ، فرآورده‌های جانبی گیاهی از قبیل تفاله‌ی نیشکر، پودر یونجه و کمپوست ذرت، پرلیت، سنگ فسفات و طلق مدنظر قرار داده شدند. متأسفانه برخلاف پیت، اطلاعات اندکی درباره‌ی قابلیت حفظ ریزوبیوم‌ها در این مواد جایگزین در دست می‌باشد. تغییرات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در طول دوره‌ی بلوغ مایه تلقیح شده در پیت، می‌تواند میزان بقا و زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها را شدیداً تحت‌تأثیر خود قرار دهد. ضعف در زنده‌مانی و بقای ریزوبیوم‌ها را می‌توان با اضافه کردن مستقیم مایه تلقیح مایع یا گرانوله به خاک برطرف نمود اما با این وجود هم نیاز بالایی به شمار زیادی از سلول‌های ریزوبیوم بوده و لذا می‌طلبد که از مقدار بیشتری مایه تلقیح استفاده کردکه این خود هزینه‌های هنگفتی را به بار می‌آورد. مایه‌های تلقیح Freeze-dried شده می‌تواند گزینه مناسب بحساب آید. یکی از مزایای آن‌ها، قابلیت زنده‌مانی آن‌ها در دمای بالای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون کاهش چشم‌گیر در آن، تا شش ماه می‌باشد. اما وینسنت (۱۹۶۵) پس از مطالعات خود به این نتیجه رسید که قابلیت آن‌ها با مرطوب شدن مجدد روی بذر تا حدود زیادی کاهش می‌یابد برای این منظور از روغن‌های گیاهی به عنوان عامل کمکی برای سلول‌های Freeze-dried استفاده می‌شود. کرمن و پترسون (۱۹۸۲) دریافتند که آغشته کردن سلول‌های Freeze-dried شده در روغن‌های گیاهی توانایی بقا و زنده‌مانی ریزوبیوم‌ها را خصوصاً در چند روز ابتدایی مایه‌زنی به میزان قابل توجهی بالا می برد. به نظر می‌رسد استفاده از پوشش‌های پلیمری می‌تواند جایگزینی مناسب برای حفظ بهتر ریزوبیوم‌ها باشد. پلی‌اکریل‌آمید (PAM) به عنوان یکی از جایگزین‌های مناسب به جای پیت معرفی شد. این پلیمر، در محیط‌های مایع و حتی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد باعث حفظ ریزوبیوم‌ها به طور مؤثرتر از پیت می‌شود. تنها مشکل این روش، کاهش میزان تحرک می‌باشد و نیز قابلیت زنده‌مانی تنها در صورتی حفظ می‌شود که رطوبت به اندازه‌ی کافی تأمین شود. می‌توان به جای پلی‌اکریل‌آمید از بیوپلیمرهای زانتان، صمغ‌های کربنی و آلگینیت استفاده کرد. خاصیت حفاظتی بیوپلیمرها ناشی از توانایی آن‌ها در محدود کردن انتقال دما، فعالیت بالای آبی و قابلیت مناسب انتقال مواد می‌باشد. میزان بقا و زنده‌مانی *B. japonicum* پوشش داده شده با ترکیب خشک شده‌ی زانتان-صمغ کربنی از رطوبت نسبی در دوره‌ی ذخیره‌سازی و انبار، مستقل می‌باشد. پس از هشت روز انبار در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، ماندگاری و بقای ریزوبیوم‌ها حتی در رطوبت شش درصد هم بسیار مناسب و خوب بود و با افزایش رطوبت نسبی به ۷۵ درصد، میزان مرگ و میر به شدت کاهش یافت. مطالعات اخیر، بیشتر بر کپسوله کردن باکتری‌ها در پلیمرهای سنتتیک و نیمه‌سنتتیک متمرکز بوده است. زنده‌مانی و بقای سویه‌ی *Pseudomonas fluorescens/putida* در کپسول‌های پلیمر متیل‌اکریلیک نسبت به اتیل‌سلولز یا نشاسته‌ی تغییر یافته با رطوبتی حدود ۲۵ درصد، بهتر می‌باشد. اضافه کردن سیلیکا به نسبت ۴/۵ درصد چون باعث کاهش از دست رفتن آب از ذرات شده، لذا سبب بهبود میزان بقا

و ماندگاری ریزوبیوم‌ها می‌شود. افزودن سیلیکا بیشتر و کمتر از این مقدار بر زنده‌مانی هیچگونه اثری ندارد. علیرغم موفقیت‌های بدست آمده در کپسوله کردن ریزوبیوم‌ها با مواد پلیمری، این تکنولوژی هنوز به طور تجاری مورد استفاده واقع نشده است چراکه ایجاد و بکارگیری این محصولات بسیار پرهزینه می‌باشد. بنابراین به فناوری‌های جدید با صرفه اقتصادی نیاز می‌باشد که با امکانات و ابزارآلات موجود قابل اجرا و انجام باشد.

منبع:

-Deaker, R., Roughley, R. J., & Kennedy, I. R. (2004). Legume seed inoculation technology. Soil Biology and Biochemistry. 36 (8), 1275-1288.