فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات مرتع و بیابان ایران
جلد ١٤، شمارهٔ ٣، صفحهٔ ٣١٢-٣٠٢ (١٣٨٦)

استخراج و شناسایی سوشهای ریزوبیوم همزیست با مهمترین لگومهای مرتعی در استان اصفهان

شعبان شفیع‌زاده، احمدرضا سیف‌الهی و ذبیح‌ا... اسکندری
اعضاء هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهانShaban_shafizadeh@Yahoo.com
تاریخ دریافت: ١٣٨٤/١٢/٢١ **تاریخ پذیرش:**١٣٨٥/١٢/٢٠

چکیده

کمبود ازت در خاک از عوامل اصلی کاهش رشد گیاهان محسوب می‌گردد و از طرفی ٨٠٪ حجم گاز موجود در اتمسفر به صورت ازت مولکولی می‌باشد که بصورت مستقیم مورد استفاده گیاهان نمی‌باشد. مؤثرترین سیستم تثبیت کننده ازت مولکولی سیستم ریزوبیوم/ لگوم می‌باشد که اهمیت اقتصادی ویژه‌ای دارد.جداسازی، شناسایی و معرفی سوشهای ریزوبیوم همزیست با لگومهای مرتعی علاوه بر افزایش تولید کمی و کیفی علوفه باعث بهبود خاک و افزایش ازت قابل جذب خاک نیز می‌گردند. تأمین ازت بصورت کودهای شیمیایی علاوه بر اینکه هزینه‌های گزاف تولید و حمل را در پی دارد مقدار کمی از آن نیز مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد و ساختمان خاک را مختل می‌کند و در نهایت باعث آلودگی محیط زیست و بخصوص آبهای زیرزمینی می‌گردد. به منظور شناسایی سوشهای ریزوبیوم همزیست با مهمترین لگومهای مرتعی استان و تعیین کارآیی آنها نمونه‌های یونجه و اسپرس مرتعی به همراه خاک از شهرستانهای فریدن، فریدونشهر، چادگان و سمیرم جمع‌آوری گردید. درکل تعداد ٢٠٠ نمونه گیاه لگوم به همراه خاک بستر از شهرستانهای فوق جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید و سپس سوشهای ریزوبیوم از گره‌های گیاهان میزبان روی محیط کشت اختصاصی YMA جداسازی گردید. باکتریهای جداسازی شده خالص‌سازی و براساس خصوصیات مرفولوژیکی، میزان رشد و میزبان آنها شناسایی گردیدند. در مجموع ٢٩ کلنی باکتری جداسازی و خالص سازی شدند که در قالب ٧ سوش باکتری ریزوبیوم به نام *Rhizobium meliloti* از روی یونجه و اسپرس شناسایی گردیدند. طی آزمایشهای گره‌سازی، باکتریهای فوق روی گیاهچه‌های یونجه و اسپرس در شرایط آزمایشگاهی و روی محیط غذایی بدون ازت گره تولید نمودند.

واژه‌های کلیدی: تثبیت ازت، ریزوبیوم، لگوم، همزیستی

مقدمه

ازت به‌عنوان یکی از عناصر اصلی مورد نیاز گیاهی جهت رشد و نمو شناخته شده است و کمبود آن به همراه آب می‌تواند یکی از عوامل محدود کننده اصلی در تولیدات گیاهی باشد. در بحث مدیریت خاک، ازت جایگاه ویژه‌ای دارد. ازت ازروشهای مختلفی به خاک اضافه می‌گردد از جمله می‌توان به افزایش آن از طریق کودهای شیمیایی نیترات، آمونیوم، اوره و غیره اشاره نمود. ثبیت ازت هوا که در طبیعت به وقوع می‌پیوندد شامل تثبیت بیولوژیک و غیر بیولوژیک می‌باشد. همچنین از طرف فرایندهای شیمیایی تحت فشار و حرارت بالا در جو آمونیاک و اکسیدهای ازت موجود در جو به نیتراتها تبدیل می‌گردد و به وسیله باران به خاک اضافه می‌گردد. ولی بازگشت ازت از طریق تثبیت بیولوژیک باکتریهای

همزیست ریزوبیوم با گیاهان لکوم از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. مدیریت ازت در محیطهای طبیعی به‌ویژه مراتع، مناطق خشک و نیمه خشک ایجاب میکند که به کمک عوامل موجود در همان محیط نیتروژن مورد نیاز گیاه را تأمین نمود.

ازت مولکولی به سه روش به اشکال یونی تبدیل و قابل جذب می‌گردد که یکی از این روشها تثبیت بیولوژیکی است که به وسیله موجودات زنده از جمله باکتریها انجام می‌گیرد (محمودی، ١٣٧٤). نیاز گیاهان به ازت بیش از سایر عناصر است و از آن به‌عنوان عنصر حاصلخیز خاک نام برده می‌شود (زرین کفش، ١٣٦٨). برآورد سالیانه تثبیت بیولوژیکی ازت حدود ٩٠ میلیون تن است که حدود ٥٦ درصد آن توسط لگومهای علوفه‌ای مناطق معتدله حاصل می‌شود (حیدری‌شریف‌آباد و دری، ١٣٨٠). در زمینهای زراعی ٢٠٠-١٠٠ کیلوگرم در هکتار و در گیاهان لگوم مرتعی سالانه ١٣-٦٨ کیلوگرم ازت در هکتار تخمین زده می‌شود که تثبیت می‌گردد و علت اختلاف زیاد می‌تواند به نژاد باکتری و شرایط محیط گیاه باکتری مربوطه باشد (محمودی، ١٣٧٤).

موجودات تثبیت کننده ازت

تثبیت بیولوژیکی ازت به وسیله گروهی از موجودات پروکاریوت که به آنها دی ازوتروف گفته می‌شود انجام می‌گیرد. تمامی این موجودات دارای سیستم آنزیمی نیتروژناز بوده و به کمک این آنزیم قادر به احیاء ازت مولکولی و تبدیل آن به شکل آمونیاک هستند. گروه باکتریهای همزیست ریزوبیومی که قادرند ازت مولکولی را در گرهکهای ایجاد شده بر روی ساقه و یا ریشه گیاه میزبان تثبیت نمایند. باکتریهای ریزوبیوم علاوه بر ارتباط همزیستی با گیاهان لگوم با سایر گیاهان غیر لگوم هم ارتباط برقرار می‌کنند (رحمانی، ١٣٧٩). در مناطق مختلف ایران سعی بر آن است که سیستم زراعی گندم دیم با کشت علوفه جایگزین گردد و تولید ارقام مختلف یونجه دیم در مناطق مختلف ١ تا ٤ تن تخمین زده شده است که در مقایسه با گندم دیم بسیار اقتصادی‌تر است (حیدری‌شریف‌آباد و ایرانمنش، ١٣٧٥).

باکتریهای تثبیت کننده ازت

ریزوبیومها گروهی از باکتریها هستند که قادر به تشکیل گره بر روی ریشه گیاهان خانواده بقولات می‌باشند. این باکتریها هوازی بوده و قادر به استفاده از منابع مختلف قند مثل پنتوزها و هگزوزها به عنوان منبع کربن می‌باشند و از آمونیوم و نیترات به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کنند.

جایگاه گیاهان لگوم در چرخه تثبیت نیتروژن

طبق گزارش فائو سطح زیر کشت گیاهان لگوم در دنیا حدود ٢٥٠ میلیون هکتار می باشد که حدود ١٤ تا ٣٥ میلیون تن ازت توسط آنها تثبیت می‌گردد (صالح راستین، ١٣٥٧). اگر مزارع یونجه یک‌ساله سالیانه ٥٠ کیلوگرم ازت در هکتار در شرایط مساعد تثبیت کنند در سطح ٥ میلیون هکتار از زمینهای آیش موجود، سالیانه ٢٥٠ هزار تن ازت تولید می‌گردد که این مقدار برابر ازت مصرفی است که بصورت کود شیمیایی به خاک داده می‌شود (سندگل و ملک‌پور، ١٣٧٣). حتی بعضی از کولینوارهای یونجه یک‌ساله می‌توانند تا ٢٠٠ کیلوگرم در هکتار ازت تثبیت کنند که این مقدار ازت در استرالیا ٩٠٪ ازت مورد نیاز می باشد (پوری‌نظری، ١٣٦٥). طبق جدول شماره ١، میزان تثبیت ازت در محصولات مختلف بسته به شرایط آب و هوایی، شرایط خاک و نوع و میزان باکتریهای ریزوبیوم متفاوت می‌باشد.

عوامل مؤثر بر روی پراکنش و پایداری باکتریهای ریزوبیوم در طبیعت

وجود گره بر روی ریشه گیاهان خانواده لگوم در یک منطقه دلیل بر وجود سوش ریزوبیوم است. ریزوبیومهای موجود در یک منطقه مربوط به میزبانهای مشخصی است که در آن منطقه وجود دارد. از جمله عواملی که سبب

جدول ۱- میزان تثبیت ازت در محصولات مختلف (حیدری‌شریف‌آباد و ترک‌نژاد، ۱۳۷۹)

ردیف	میزبان	میزان تثبیت ازت (کیلوگرم در هکتار)
۱	یونجه	۱۲۵-۳۳۵
۲	شبدر	۸۵-۱۹۰
۳	نخود	۸۰-۱۵۰
٤	سویا	٦۰-۱۱۵
٥	لوبیا چشم بلبلی	٦٥-۱۳۰
٦	انواع ماشها	۹۰-۱٥٥

توسعه ریزوبیوم می‌گردد میزبان مناسب آن سوش ریزوبیوم می‌باشد. با توجه به اینکه هر سوش اختصاص به میزبان خاصی دارد ممکن است سوشی روی میزبان غیر اصلی ایجاد گره هم بکند ولی ازت تثبیت نگردد. از جمله مهمترین عوامل مؤثر بر غده‌دهی و تثبیت ازت عبارتند از: درجه حرارت (Gibson, 1980)، نور (Feigfnbaum & Mengle, 1979)، ترکیبات ازت خاک (Eaglesham *et al.*, 1983)، اسیدیته خاک (Quispel, 1974)، ویتامینها (Subba, 1971)، آب (Sprent, 1972)، اکسیژن (Criswell *et al.*, 1977)، شوری (Keck *et al.* 1984)، عناصر غذایی (Subba, 1971) مثل کلسیم، مولیبدن، کبالت، پتاسیم، آهن، بر. اسیدیته خاک از جمله عوامل اصلی تعیین کننده حضور یک سوش در یک منطقه است.

از جمله مواد دیگر، می‌توان به سموم دفع آفات نباتی بالاخص قارچکشهای جیوه‌ای که جهت جلوگیری از پوسیدگی بذرها استفاده می‌شوند اشاره نمود که مانع فعالیت باکتریهای تثبیت کننده ازت می‌گردند (میرزایی ندوشن، ۱۳۸۰).

مواد و روشها

۱- روش نمونه‌برداری

در مناطق مختلف نمونه‌های لگوم مرتعی انتخاب، با کمک بیل و کلنگ گیاه همراه با خاک اطراف از زمین خارج گردید (حداقل به ابعاد ۵۰×۳۰×۳۰ سانتیمتر) و در صورت مشاهده گره‌ها روی ریشه، نمونه همراه با خاک در پلاستیک قرار داده شد و جهت بررسی شکل و نوع گره‌ها، جداسازی گره و جداسازی باکتریها از گره‌ها به آزمایشگاه منتقل گردیدند. نام گیاه، ارتفاع محل، نام محل و تاریخ جمع‌آوری روی پلاستیک ثبت و به آزمایشگاه منتقل گردید. با توجه به اطلاعات طرح شناخت مناطق اکولوژیک استان و مناطق احیاء شده دیمزارهای کم بازده شهرستانهای سمیرم ، فریدن، فریدونشهر و چادگان جهت نمونه‌برداری انتخاب گردید. در استان اصفهان با توجه به شرایط جغرافیایی مناطق رویشی متفاوتی وجود دارد و به همین دلیل تیپهای مختلف گیاهی نیز گزارش شده است.

۲- جداسازی گره‌ها و نگهداری آنها

پس از اینکه ریشه همراه با خاک به آزمایشگاه منتقل گردید به آرامی در داخل ظرف پر از آب شستشو گردید و در زیر جریان آب جاری خاک و گل و لای اطراف گرهکها به آرامی شستشه و تمیز شدند، تعدادی گرهک همراه با بخش کوچکی از ریشه (۱-۲ mm) با کمک پنس از هر نمونه جدا شد و زیر جریان آب جاری شسته شدند. جهت

جلوگیری از دست رفتن نمونه‌ها به هنگام شستشو آنها روی یک سطح مشبک توری قرار داده شدند. پس از آن گره‌ها با کاغذ صافی یا پارچه پنبه‌ای سترون خشک گردیدند. گره‌ها بدین ترتیب تا ٤۸ ساعت در دمای یخچال قابل نگهداری هستند و برای نگهداری گره‌ها برای مدت طولانی‌تر (۱۲-٦ ماه) آنها در لوله‌های آزمایش دارای سیلیکاژل قرار داده شدند. در این حالت ٥-٤ گره در هر لوله آزمایش روی پنبه‌ای که در زیر آن سیلیکاژل وجود دارد نگهداری می‌شود اطلاعات مربوط به تاریخ جمع‌آوری گیاه میزبان، محل جمع‌آوری و ارتفاع محل روی لوله‌های آزمایش ثبت گردید.

۳- استخراج سوشهای باکتری ریزوبیوم

به‌طور کلی، جداسازی مستقیم باکتریهای ریزوبیوم از گره نسبت به خاک راحت‌تر و مطمئن‌تر می‌باشد و به راحتی می‌توان سوشهای خالص تهیه نموده برای سترون و کشت باکتریهای ریزوبیوم روی محیط کشت مصنوعی در شرایط آزمایشگاهی مراحل زیر انجام گرفت:

۱- گره‌ها به مدت ۱۰-٥ ثانیه در اتانول ۹٥ درصد قرار داده می‌شد.

۲- گره‌ها به مدت ۳ دقیقه در محلول HgCl (۲٪) قرار داده شد.

۳- گره‌ها ٦-٥ بار با آب مقطر سترون شده و در کنار شعله شسته شد و در سه بار آخر شستشو ۱٥ دقیقه گره‌ها در آب سترون نگهداری شدند.

٤- گره‌های استریل به لوله آزمایش محتوی نیم میلی‌لیتر محلول نمک (۸/٥ گرم در لیتر) سترون منتقل شدند و سپس با هاون چینی سترون له گردیدند.

٥- یک دهم میلی‌لیتر از سوسپانسیون گره و محلول نمک بر روی محیط کشت YMA (جدول شماره ۲) که در پتری دیش ۹ cm آماده شده بود. منتقل گردید و با کمک لوپ سترون روی محیط پخش گردید.

٦- پتری دیشها در انکوباتور در دمای ۲٥-۲۸° C نگهداری و با مشاهده رشد کلنی باکتری در امتداد خطوط کشت، دوبارهٔ روی محیط کشت دیگری کشت داده شدند و طی چند مرحله خالص‌سازی انجام گردید. کلنهای متفاوت از نظر شکل ظاهری در پتری دیشهای جداگانه کشت گردیدند.

۷- پس از تهیه کشتهای خالص به منظور نگهداری طولانی مدت آنها ایزوله‌های جداسازی شده در لوله‌های مورب دارای محیط YMA کشت گردیدند و در دمای یخچال نگهداری شدند. از هر سوش ٥-٤ نمونه تهیه و نگهداری گردید.

۸- تست گرم و سرعت رشد ایزوله‌ها بررسی و اطلاعات مختلف آنها رکورد برداری و براساس روشهای معمول شناسایی گردیدند.

۹- جهت اطمینان از توانایی آنها در ایجاد گره، می‌بایستی ایزوله‌ها به گیاه میزبان در شرایط سترون تلقیح گردد و در صورت تشکیل گره باکتری دوبارهٔ جداسازی و با باکتری اولیه مقایسه گردد.

جدول ۲- ترکیبات محیط کشت YMA استفاده شده در پتری دیش و لوله‌های مورب جهت استخراج باکتریهای ریزوبیوم (Beck, *et al.*, 1993).

ردیف	نام ماده	مقدار
۱	عصاره مخمر کمپانی مرک آلمان (Yeast extract)	۰/۵ گرم
۲	قند مانیتول (Manitol)	۱۰ گرم
۳	هیدروفسفات پتاسیم (K_2HPO_4)	۰/۵ گرم
٤	سولفات منیزیم ($Mg\ SO_4.7H_2O$)	۰/۱ گرم
٥	نمک طعام (NaCl)	۰/۲ گرم
٦	آگار	۱۵ گرم
۷	آب مقطر	۱۰۰۰ میلی‌لیتر

٤- آزمایش گره‌زایی ایزوله‌های جداسازی شده

بذرهای اسپرس و یونجه از مناطقی که نمونه‌های حاوی گره جمع آوری شده بود و باکتریهای ریزوبیوم نیز از آنها استخراج گردیده بودند استفاده شدند. این بذرها ابتداء به مدت ۱۰ ثانیه در اتانول ۹۵ درصد و دو دقیقه در کلرور جیوه ۲درصد ضدعفونی سطحی شدند و سپس چندین بار (٦-٥ بار) با آب مقطر سترون شسته شدند تا اثرات کلرور جیوه حذف گردد.بذرهای فوق پس از ضدعفونی سطحی در پتری دیش حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب قرار داده شدند. پس از ٤٨ ساعت که طول ریشه‌ها به حدود یک سانتیمتر رسید نشاءها به درون لوله‌آزمایش حاوی محیط غذایی بدون ازت انتقال داده شدند (جدول شماره ۳).

جدول ۳- ترکیبات محیط غذایی بدون ازت (Beck *et al.*, 1993).

ماکرو المنتها	مقدار	میکرو المتها	مقدار
KH2PO4	100 mg/L	H3BO3	2.86 g/L
NaH2PO4	150 mg/L	MnS04.7H2O	2.08 g/L
CaCl2	100 mg/L	ZnSO4.7 H2O	0.22 g/L
MgSO4.7H2O	120 mg/L	CuSO4.5H2O	0.08 g/L
Fe Citrate	5 mg/L	Na2MoO4	0.11 g/L

هر لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط غذایی بود که بصورت مورب سرد شده بودند تا سطح محیط در آنها افزایش یابد. چهل و هشت ساعت پس از اینکه لوله‌های آزمایش حاوی نهال در اطاقک رشد با دما ^{o}C ۱±۲۵، شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس، ١٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی قرار داده شدند، ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از ایزوله ریزوبیوم به هر لوله تلقیح گردید؛ آنگاه برای جلوگیری از اثر سوء نور روی باکتریهای ریزوبیوم لوله‌های آزمایش با ورقه آلومینیومی پوشانده شدند و در اطاقک رشد به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. پس از این مدت گیاهچه‌ها از لوله خارج شده و گرهکهای روی ریشه مورد بررسی قرار گرفتند.

ده میلی‌لیتر از محلول میکروالمتها به ۱ لیتر محلول ماکروالمتها اضافه شده و مخلوط بخوبی به هم زده می‌شود و سپس ۱٦ گرم در لیتر آگار اضافه می‌شود و در دمای ۱۲۱°C برای ۱۵ دقیقه سترون می‌گردد. پس از سرد شدن محیط کشت در دمای ۵۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد مقدار ۱۰ میلی لیتر از آن در لوله‌های آزمایش سترون (۱۸×۱/۸ سانتیمتر) ریخته شد و در حالت مورب نگه‌داری شد تا سرد گردند (کلیه مراحل در شرایط کاملاً سترون و در زیر لامینار فلو انجام گرفت.

نتایج

۱- محلهای نمونه‌برداری

در شهرستانهای سمیرم، فریدن، فریدونشهر و چادگان (نقشه شماره ۱) در کل ۲۰۰ نمونه لگوم (جدول شماره ٤) به همراه خاک برداشت و در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ٤- تعداد و محلهای نمونه‌برداری

سال	تعداد	تعداد	تعداد
۱۳۷۹	۷۸	۵	۱
۱۳۸۰	۵۵	۱۲	۲
۱۳۸۱	۳۳	۵	۲
۱۳۸۲	۲۱	۸	۲
۱۳۸۳	۱۳	۵	۱
جمع	۲۰۰	۳۵	۸

۲- وضعیت گره‌ها روی نمونه‌ها

گره‌های استوانه‌ای بزرگ و کشیده روی اسپرس و گره‌های گرد و کوچک روی یونجه مشاهده شدند. بسته به نوع خاک، بافت خاک و میزان رطوبت خاک، تراکم گره‌ها روی ریشه‌ها متفاوت بود. در خاکهای مرطوب، لومی و عمیق تراکم گره‌ها قابل ملاحظه بود (عکس شماره ۱). تعدادی از گره‌ها برای مدت طولانی‌تر در لوله‌های آزمایش دارای سیلیکاژل نگه‌داری شدند (عکس شماره ۲).

۳- جداسازی و شناسایی باکتریهای ریزوبیوم

تعدادی از گره‌ها پس از ضدعفونی سطحی مستقیماً روی محیط کشت له شدند(عکس شماره ۳) و یا به لوله آزمایش محتوی نیم میلی‌لیتر محلول نمک سترون منتقل شدند و پس از له شدن به محیط کشت YMA منتقل گردید و با مشاهده رشد کلنی باکتری (عکس شماره ٤) در امتداد خطوط کشت دوباره روی محیط کشت دیگری کشت داده شد و طی چند مرحله خالص سازی انجام گردیده کلنیهای متفاوت از نظر شکل ظاهری در پتری دیشهای جداگانه کشت گردیدند (عکس شماره ۵).

در کل، ۳۵ کلنی باکتری (جدول شماره۵) جداسازی گردید که پس از خالص سازی و مقایسه شکل ظاهری کلنیها و همچنین میزان رشد آنها ۸ سوش باکتری ریزوبیوم مشخص گردیدند. این باکتریها روی محیط کشت YMAکلنیهای برجسته، روغنی شکل، بعضی گرد و صاف نمایش دادند. براساس شکل کلنی باکتریها، میزان رشد و دامنه میزبانی آنها سوشهای جداسازی شده *Rhizobium meliloti*تشخیص داده شدند.

جدول ۵- مشخصات سویه‌های ریزوبیوم جداشده از روی لگومهای مرتعی

کد سوش	نام سوش	میزبان	شهرستان	پاسخ به میزبان
۱	*R. meliloti*	یونجه	فریدن	+
۲	*R. meliloti*	اسپرس	فریدن	–
۳	*R. meliloti*	اسپرس	فریدن	+
٤	*R. meliloti*	اسپرس	فریدونشهر	–
٥	*R. meliloti*	اسپرس	فریدونشهر	+
٦	*R. meliloti*	یونجه	فریدونشهر	+
۷	*R. meliloti*	یونجه	سمیرم	–

٤- تست گره‌زایی سوشهای شناسایی شده

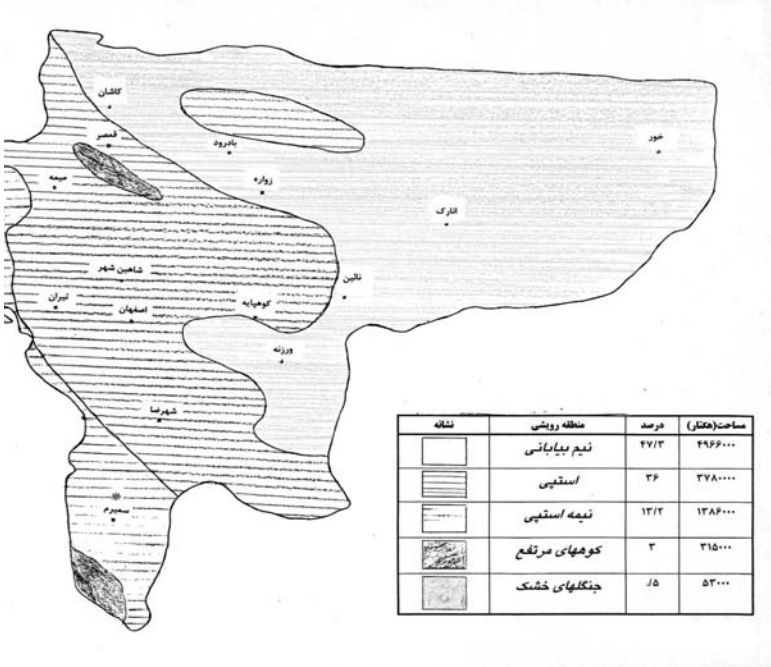
از مجموع ۸ سوش باکتری جداسازی شده ٤ سوش روی دو گونه لگوم اسپرس و یونجه که این باکتریها قبلا از روی آنها جداسازی شده بود تست گره‌زایی شدند. سوشهای شماره ۱، ۳، ٥ و ٦ روی ریشه گیاهچه‌های یونجه و اسپرس گره ایجاد نمودند.

بحث

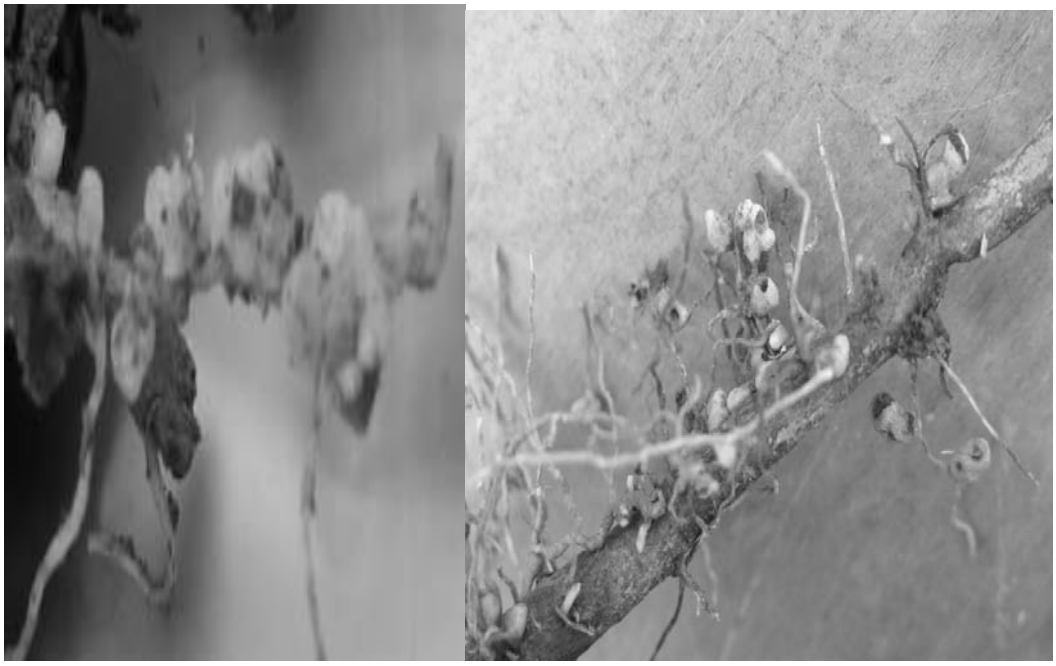
با توجه به مشاهده گره‌های ریزوبیوم روی گونه‌های مرتعی یونجه و اسپرس، دلالت از حضور این باکتریها در خاک این مناطق دارد.از آنجا که در مناطق با رطوبت کافی و عمق مناسب خاک گره‌ها روی ریشه مشاهده گردیدند، حکایت از وجود مناطق مستعد کشت این گونه‌ها به همراه باکتریهای همزیست ریزوبیوم دارد.جداسازی و شناسایی آنها و در ادامه تشکیل گره روی میزبان در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که سوشهای جداسازی شده قادر به تلقیح میزبانهای خود هستند واما تأثیر متفاوت همزیستی بستگی به روابط متقابل سوش باکتری با گونه گیاه میزبان و مواد شیمیایی اطراف ریشه دارد. تلقیح ریشه و ایجاد گره و تفاوت آنها می‌تواند پایه‌ای برای مطالعات بعدی باشد .تشکیل گره روی ریشه اسپرس و یونجه نشان داد که سوشهای متفاوت روی میزبانهای مختلف واکنش متفاوتی نشان می‌دهند. در آزمایش گره‌زایی سوشها، تعداد و اندازه گره‌های متفاوت در نتیجه سوشهای مختلف روی اسپرس و یونجه مشاهده گردید که حکایت از ارتباط متقابل سوش و گیاه میزبان میباشد. تثبیت ازت در گره‌های ایجاد شده توسط سوشهای مختلف نیاز به آزمایشهای و مطالعات بیشتری دارد.

در این تحقیق سوشهای باکتری ریزوبیوم ملیلوتی از روی گیاهان مرتعی یونجه و اسپرس در شرایط دیم جداسازی و شناسایی شده است؛ این گونه قبلاً توسط محمودی (۱۳۷٤) از مزارع یونجه آبی شهرستانهای مختلف استان جداسازی و شناسایی شده است. رحمانی (۱۳۸۰) نیز ۲٦ سوش ریزوبیوم را از روی لگومهای مرتعی در استانهای کردستان، لرستان، تهران و آذربایجان غربی جداسازی و شناسایی کرده است که عمدتاً سوشهای ریزوبیوم ملیلوتی از روی یونجه و ریزوبیوم تریفولی از روی شبدر جداسازی شده است. همچنین توان گره سازی این گونه را روی ارقامی از یونجه آبی مورد مطالعه و تحقیق قرار داده است. گالشی (۱۳٦۷) کارآیی تثبیت ازت این باکتری را در شرایط شور روی ارقام مختلف یونجه در استان مورد مطالعه قرار داده است. حیدری شریف‌آباد (۱۳۷٦) تأثیر سوشهای ریزوبیوم ملیلوتی را روی ارقام یونجه یک‌ساله و چند

ساله در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده است. سوشهای مختلف واکنش متفاوتی روی ارقام نشان دادهاند. از جمله سوش CC169 روی رقم کدی و سوش بومی مراغه روی یونجه بمی کارآیی مؤثری داشتهاند. این گونه ریزوبیوم در بسیاری از نقاط دنیا از روی گونههای یونجه یکساله و چند ساله در شرایط دیم و آبی جداسازی و شناسایی شده و در حد تجاری هم تولید و مصرف شده است و نتایج خوبی هم در جهت تثبیت ازت داشته است (Beck *et al.*, 1993).



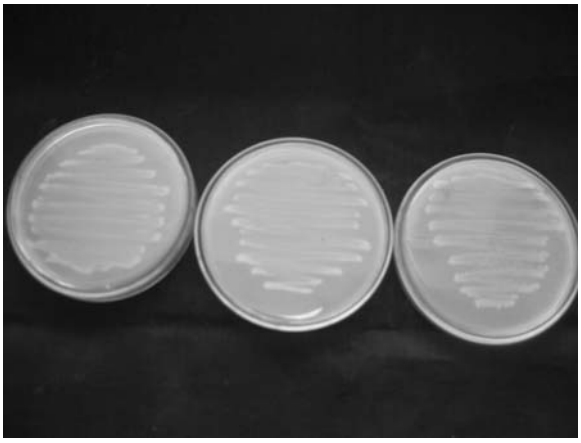
نقشه ۱- موقعیت جغرافیایی استان و محلهای نمونهبرداری



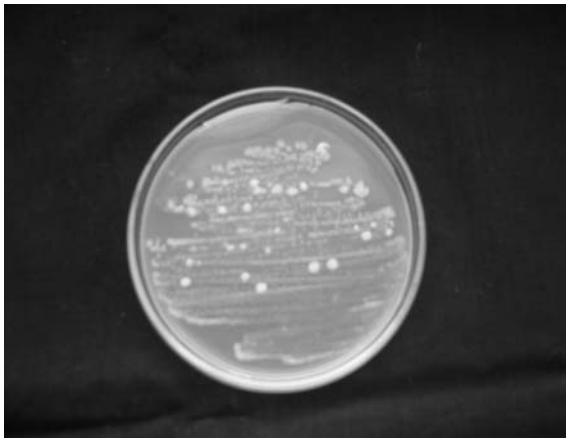
شکل۱- تراکم گرههای ریزوبیوم در شرایط مختلف

شکل ۲- لوله‌های حاوی سیلیکا ژل جهت نگه داری طولانی مدت گره‌ها

شکل ۳- کشت مستقیم گره باکتری ریزوبیوم روی محیط YMA



شکل ٤- کشت سوسپانسیون گره‌های ریزوبیوم پس از ۵ روز



شکل ۵- کشت خالص باکتری ریزوبیوم در پتری‌دیشهای YMA

منابع مورد استفاده

۱- پوری نظری، ن.، ۱۳٦۵. تناوب غله و مرتع (لی فارمینگ). دفتر فنی مرتع.

۲- رحمانی، ا.، ۱۳۷۹.فنآوری تثبیت همزیست نیتروژن (راهکارها و کاربردها)، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، شماره انتشار ۱۷۹-۱۳۷۹، ۱۲۹ صفحه.

۳- رحمانی، ا.، ۱۳۸۰.گزارش نهایی طرح ((جمع آوری و شناسایی سویه‌های ریزوبیوم همزیست با مهمترین بقولات مرتعی)).مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

٤- حیدری شریف‌آباد، ح.، ۱۳۷٦.گزارش نهایی طرح ((بررسی تأثیر سوش ریزوبیوم بر روی رشد و تثبیت نیتروژن در ارقام یونجه‌های دیم)).مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

۵- حیدری شریف‌آباد، ح. و ایرانمنش،ع.، ۱۳۷۵ ..تأثیر سوش ریزوبیوم بر روی رشد و تثبیت نیتروژن ارقام یونجه دیم.پژوهش و سازندگی.شماره ۳۰، صفحه ۷۸-۷۵.

٦- حیدری شریف‌آباد، ح. و ترک‌نژاد،ا.، ۱۳۷۹.یونجه‌های یک‌ساله (کلیات). مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور ، نشریه شماره ۲٤۹-۱۳۷۹. ۱٦۷ صفحه.

٧- حیدری شـریف‌آبـاد، ح. و دری،م.ع.، ١٣٨٠.نباتـات علوفـه‌ای (نیامداران). مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشـور ، نشـریه شماره ٢٧٧-١٣٨٠. ٣١١ صفحه.

٨- زرین‌کفـش،م.،. ١٣٦٨.حاصـلخیزی خـاک و تولیـد.انتشـارات دانشگاه تهران.

٩- سندگل، ع.ع. و ملک‌پور،ب.، ١٣٧٣. مروری بر تحقیقات انجـام شده و در حال اجرا در رابطه با یونجه‌های یک‌ساله در ایـران و تدوین برنامه کار برای آینده. مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. نشریه شماره ٢٥، ٢٢ صفحه.

١٠- گالشی علی آبادی، س.، ١٣٦٧.بررسـی کـارآیی تثبیـت ازت باکتری ریزوبیوم ملیلوتی در شرایط شور.پایان نامه کارشناسـی ارشد،انشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

١١- صالح راستین، ن.، ١٣٥٧. بیولوژی خاک (موجودات خاکزی و نقش آنها در گردش عناصـر). انتشـارات دانشـگاه تهـران، ٤٨٠ صفحه.

١٢- محمـودی ، م.، ١٣٧٤.بررسـی پراکنـدگی طبیعـی باکتریهـای ریزوبیوم و تأثیر بعضی شاخصهای اکولوژیکی مؤثر بـر رشـد آنها در منطقه اصفهان، پایان‌نامـه کارشناسـی ارشـد، دانشـکده علوم دانشگاه اصفهان.

١٣- میرزایی ندوشن، ح. ١٣٨٠. یونجه‌های یکساله (ژنتیک و اصلاح). موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع، نشریه شـماره ٢٦٧-١٣٨٠. ٢١١ صفحه.

14- Beck, D. P.: Materon, L. A. & Afandi, F. 1993. Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. Technical Manual No. 19. ICARDA. Syria. 389 pp.

15- Criswell, J. G. Havelka, J. Quebedeaux, B. & Hardy, R. W. 1977. Effect of rhizosphere Po2 on nitrogen fixation by excised and intact nodulated soybean roots. Crop Science, 17:39-44.

16- Eaglesham, A. R. Hassouna, J. S. & Seegers, R. 1983. Fertilizer-N effects on N2-fixation by cowpea and soybean. Agron. J. 75:61-66.

17- Feigfnbaum, S. & Mengel, K. 1979. The effect of reduce light intensity and sub-optimal potassium supply on N2-fixation and N Turnover in Rhizobium infected Lucerne. Physiol. Plant. 45:245-249.

18- Gibson, A. N. 1980. Methods for legumes on glasshouse and controlled environmental cabinets. Pp.139-185 in F. J. Bergerson (Ed.). Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Jhom Wiley & Sons. New York.

19- Keck, T. J.; Wagent, P. J. Campbell, W. F. & Knighton, R. E. 1984. Effect of water and salt stress on growth and acetylene reduction in alfalfa. Soil Sci. Soc. Am. J. 48:1310-1315.

20- Quispel, A. 1974. The biology of nitrigen fixation. North Holland Publishing Company Amsterdam. Oxford.

21- Sprent, J. I. 1972. The effect of water stress on fixing root nodules.IV effects on whole plants of Vicia faba and Glycine max. New Phytol. 71:603-611.

22- Subba Rao, N. S. 1971. Soil microboraganisms and plant growth. Oxford & IBH publishing Co. New Delhi. P:108-163.

Extraction and identification of sypbiotic rezibium race from the moset important ranglands legumes in Esfahan provionce

Sh.Shafizadeh, A.R.Seifalahi and Z.Eskandari

Esfahan agricultural and natural resources research center, Esfahan, Iran.

Received:12.03.2006 Accepted:11.03.2007

Abstract

The defficiency of Nitrogen in soil causes low growth of plant. Gas nitrogen is comprised of 80% of the atmosphere and is converted to nitrogen ion by different methods that are used by plants. Symbiosis of *Rhizobium* bacteria with legumes is the most effective methods to fix nitrogen. Isolation, identification and introduction of *rhizobium* in each area causes more production of foliage, improve soil texture and nitrogen ion in soil. Use of chemical nitrogen is very expensive, collapse soil texture and cause infection of soil and water.This experiment was carried out to isolate, identify and introduce *rhizobium* strain from the most important pasture legumes in Esfahan. A total of 200 samples of legumes and soils were collected and transferred to laboratory, to check and examine root nodules. Shape and size of nodules were recorded and rhizobium bacteria were isolated from nodules on YMA medium. Pure cultures of bacteria were made on YMA tube and were maintained at 4°C in the Refrigerator. These bacteria were identified as *Rhizobium meliloti* from *Medicago sativa* and *Onobrychis viciaefolia*. Seven strains of rhizobia were examined to induce nodule in legumes in free nitrogen media and they produced nodule on *Medicago sativa* and *Onobrychis viciaefolia* seedlings.

Key words: Rhizobium, nitrogen fixation, legume, nodule, symbiosis