جمع‌آوری و شناسایی سوشهای ریزوبیوم همزیست با مهمترین بقولات مرتعی

ابراهیم رحمانی، عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع

چکیده:

نیتروژن قابل جذب گیاه در محیط خاک از عوامل اصلی محدودکنندهٔ رشد گیاهان محسوب می‌گردد. از طرفی ۸۰٪ گاز موجود در آتسمفر، گاز ملکولی به صورت N_2 می‌باشد که توسط میکروارگانیزمهای مربوط به گروه پروکاریوتها احیا شده و برای گیاهان قابل جذب می‌گردد. مؤثرین سیستم تثبیت‌کننده ازت، سیستم ریزوبیوم لگوم می‌باشد که بیشترین سهم تحقیقاتی را در زمینه ارتباط متقابل بین گیاهان و میکروارگانیزمها به خود اختصاص داده است. به لحاظ اهمیت اقتصادی و به منظور دستیابی به این میکروارگانیزمها و استفاده از آنها در تحقیقات جاری کشور ضرورت استخراج و شناسایی آنها تشخیص داده شده و این هدف در طرح مد نظر بوده است. برای این کار حدود ۲۰۰ نمونه خاک از بستر عمده‌ترین لگومهای مرتعی استانهای کرمانشاه، همدان، لرستان، آذربایجان‌شرقی، خوزستان، بوشهر و تهران (ایستگاه همندآبسرد) جمع‌آوری گردیدند. این خاکها از مراتعی که رویشگاه عمده گونه‌های مختلف گیاهان یونجه - شبدر و اسپرس در منطقه محسوب می‌شدند جمع‌آوری گردیدند. کلیه دستورالعملهای استاندارد در زمینه انتخاب محل، نحوه جمع‌آوری، جداسازی گره، ایزولاسیون سوشها، خالص‌سازی سوشها، شناسایی و تجدید کشت متوالی سوشهای ایزوله شده و نگهداری از ژرم‌پلاسم سوشهای شناسایی شده رعایت گردید. از نقطه نظر اقلیم سوشهای جمع‌آوری شده متعلق به محدوده‌های سردسیری مثل همندآبسرد، نیمه گرمسیری مانند قصرشیرین و خرم‌آباد و گرمسیری مانند

خوزستان و بوشهر می‌باشد. در طول مدت اجرای طرح تعداد ۲۶ سوش ریزوبیوم استخراج و شناسایی شد. این سوشها به منظور حفظ قدرت ایجاد همزیستی (توانایی تولید گره بر روی ریشه گیاهان میزبان و انجام تثبیت ازت) در آزمایشگاه ستاد مؤسسه به طور متوالی تجدید کشت شده و نگهداری می‌گردند. هدف از اجرای این طرح داشتن مجموعه انتخاب شده‌ای از سوشهای بومی ریزوبیوم همزیست با لگومهای مراتع ایران است تا در جهت کمک به محققان کشور و اجرای طرحهای مربوط به شناسایی قابلیتهای متفاوت سوشهای تجاری و وارداتی از نقطه نظر ایفای نقش مؤثر در اصلاح پوشش گیاهی مراتع استفاده شده و نتایج و توصیه‌های لازم جهت هر گونه تصمیم‌گیری به سفارش دهندگان اعلام گردد. همزیستی در شرایطی مانند ایران بهتر است تحت شرایط استرسهای مختلف محیطی مورد بررسی قرار گیرد. این شرایط مانند استرس خشکی، نوسانهای حرارتی، شرایط بهینه غذایی و فشار کم اکسیژن (بافت و ساختمان خاک) می‌باشد. بدیهی است در صورت عدم استخراج سوشها مطالعات فوق در مورد آنها مقدور نمی‌باشد. عملیات آزمایشگاهی این طرح ملی در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع صورت گرفته است (در استانهای لرستان و خوزستان ستاد مراکز این استانها در اجرای طرحهای مربوط به خود نقش داشته‌اند).

واژه‌های کلیدی:

بقولات، ریزوبیوم، استخراج، شناسایی، تثبیت نیتروژن و گره‌زایی.

مقدمه:

سیستم همزیست تثبیت نیتروژن از نظر اقتصادی اهمیت فراوانی دارد و جمع‌آوری و شناسایی سوشهای بومی ریزوبیوم که تقریباً در تمامی نقاط مختلف اکولوژیکی کشور پراکنش دارند جهت هموارنمودن مطالعات و بررسیهای علمی در مورد این سوشها مهم تلقی می‌گردند. باکتریهای مولد گره برروی ریشه گیاهان خانواده بقولات باکتریهای مربوط به جنس ریزوبیوم بوده و تبدیل ملکول گازی نیتروژن هوا (N_2) به آمونیوم (NH_3) برای شرکت در عملیات متابولیسمی گیاه میزبان به عهده این باکتریها است. این خصوصیت جایگاه بسیار مهمی را برای سوشهای ریزوبیوم در اکوسیستم طبیعی و کشاورزی از نقطه نظر تغذیه ازتی گیاه و حاصلخیزی خاک ایجاد نموده است.

مقدار نیتروژن تولید شده توسط گیاهان مرتعی در مقایسه با هزینه کودهای شیمیایی در دهه ٦٠ ارزشی برابر سیصد میلیون دلار در برداشته است که در شرایط فعلی از نظر اقتصادی و شرایط زیست محیطی بیش از این مقدار ارزش دارد. ریزوبیوم و آگروباکتریوم طبق اظهارات جردان و آلن در سال ١٩٧٤ دو جنس از باکتریهای خانواده ریزوبیاسه می‌باشند و به همراه دیگر جنسهای باکتریایی به‌طور مفصل مورد رده‌بندی قرار گرفته‌اند. وجه تمایز اصلی در گروه‌بندی ریزوبیومها یکی اختلاف در میزبان اختصاصی آنها به منظور تلقیح ریشه و دیگری نحوه رشد و سرعت تکثیر آنها می‌باشد. تنها منبع استاندارد و بین‌المللی در خصوص شناسایی کلیه جنسها و گونه‌های باکتریایی از جمله سوشهای ریزوبیوم (Bergys manual determinative bacteriology) می‌باشد که مورد استفاده در این طرح نیز بوده است.

جمع‌آوری سوشهای بومی ریزوبیوم در هر کشور از اقدامات پایه و اساسی جهت انجام هر گونه تحقیقات در مورد این سوشها محسوب می‌گردد. مؤثرترین سیستم بیولوژیکی تثبیت‌کننده نیتروژن سیستم ریزوبیوم - لگوم می‌باشد و بیشترین سهم تحقیقاتی در این خصوص را در جهان به خود اختصاص داده است. این سیستم از نظر اقتصادی اهمیت فراوانی داشته و جمع‌آوری و شناسایی سوشهای بومی ریزوبیوم جهت هموار نمودن مطالعات و بررسیهای علمی برروی این سوشها از اهمیت خاصی برخوردار است.

به لحاظ موارد فوق و به منظور دستیابی به این میکروارگانیزمها و استفاده از آنها در تحقیقات جاری کشور ضرورت استخراج و شناسایی آنها در این طرح مد نظر بوده است. با اجرای این طرح مجموعه‌ای از سوشهای بومی ریزوبیوم همزیست با یونجه‌های موجود در مراتع ایران در دسترس خواهد بود تا در جهت کمک به محققان کشور در اجرای طرحهای تحقیقاتی برروی این سوشها قابلیتهای این سوشها شناسایی و با سوشهای تجاری و وارداتی مقایسه و در جهت ایفای نقش در اصلاح پوشش گیاهی مراتع با بکارگیری سوشهای برتر طرحهای لازم در این زمینه توسط محققان علاقه‌مند به این موضوع تهیه و به اجرا درآید.

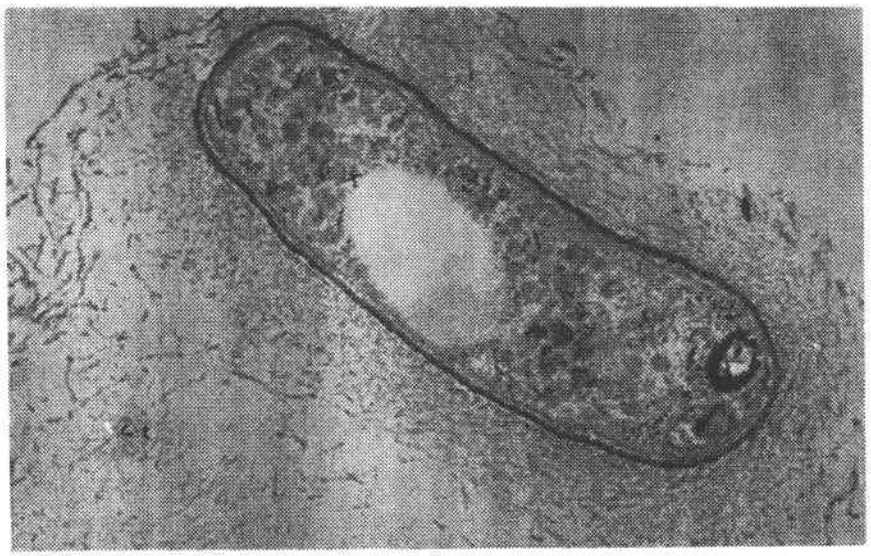
قابل ذکر آنکه کلیه سوشهای ریزوبیوم مربوط به ٦ جنس:

1- Rhizobium
2- Azorhizobium
3- Sinorhizobium
4- Bradyrhizobium
5- Photorhizobium
6- Mesorhizobium

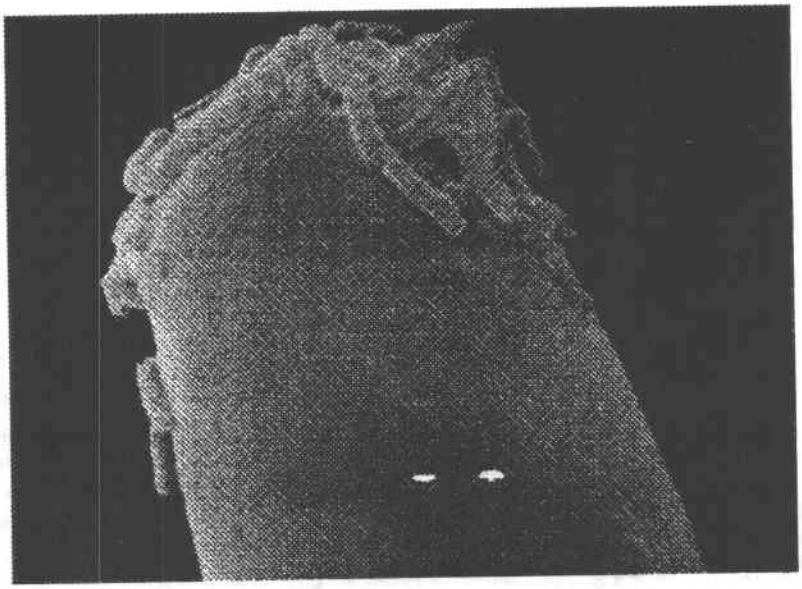
می‌باشند. بهترین و مهمترین ریزوبیومهای شناخته شده تاکنون دسته‌ای هستند که برروی ریشه گیاهان مهم مانند یونجه، سویا، نخود، لوبیا، باقلا و شبدر تشکیل گره می‌دهند.

ریشه گیاه میزبان توسط سوش باکتریایی ریزوبیوم موجود در خاک وادار به گره‌زایی می‌گردد و تلاش و نفوذ ریزوبیوم به داخل ریشه نتیجه کنترل و فعالیتهای مریستماتیکی داخل بافت ریشه می‌باشد. به موازات توسعه تشکیل گره، ریزوبیوم سلول گیاهی را با حضور خود آلوده می‌کند و در این محل لوله‌هایی به نام infection thread ایجاد می‌کند. در این حالت باکتری در سلول گیاه علاوه بر تکثیر تغییر شکل داده و به سلولهای تثبیت‌کننده ازت به نام باکتروییید تبدیل می‌گردد. آنچه که در این طرح استخراج و شناسایی گردیده است سوشهای ریزوبیوم می‌باشند.

قبل از رابطه همزیست با گیاه، ریزوبیوم به‌صورت آزاد در خاک بوده، ولی پس از تلقیح به‌صورت همزیست یا سمبیوتیک بوده و شکل آن نیز تغییر می‌پذیرد تصاویر شماره (۱و۲).

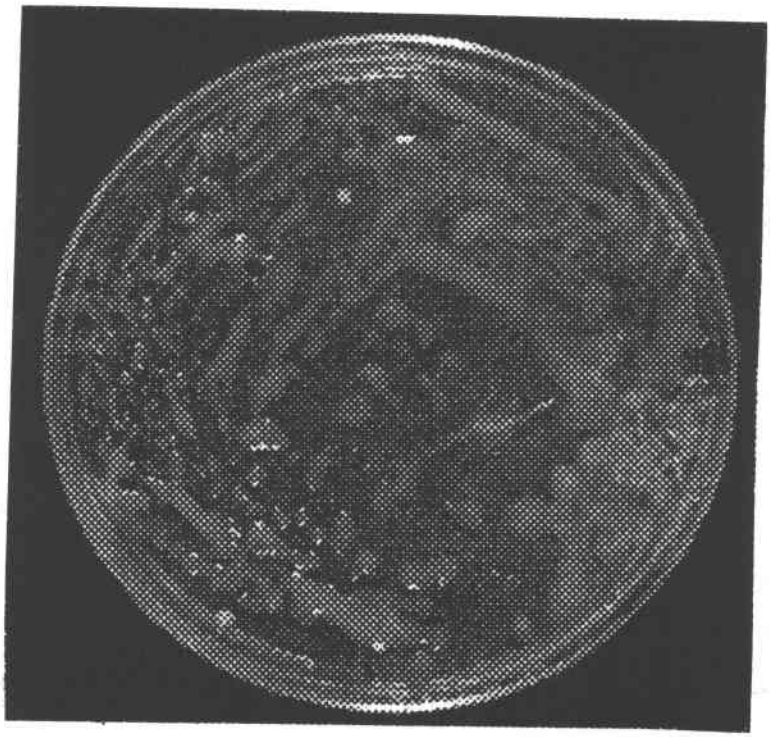


تصویر شماره (۱): سوش ریزوبیوم قبل از ایجاد رابطه همزیست با گیاه میزبان



تصویر شماره (۲): سوش ریزوبیوم بعد از ایجاد رابطه همزیست با گیاه میزبان

تصویر شماره (۳) مربوط به کلنی‌های ریزوبیوم پس از رشد کامل سلولهای باکتریایی بر روی محیط کشت YMA (ایست اکسترکت مانیتول آگار) در داخل پتری‌دیش و در شرایط آزمایشگاه می‌باشد. روشهای ترسیم شده روشهای میکروبیولوژیکی است کشت میکروی جهت بدست آوردن تک کلنی می‌باشد.



تصویر شماره (۳): کلنی‌های ریزوبیوم بعد رشد کامل سلولهای باکتریایی بر روی محیط YMA

تاریخچه:

طبق محاسبات دونالد در سال ۱۹۶۰ و هوتون در سال ۱۹۶۸ میزان تامین نیتروژن سیستم کشاورزی کشور استرالیا از طریق ایجاد رابطه همزیستی بین گیاهان تیره بقولات و سوشهای ریزوبیوم بیش از یک میلیون تن در سال بوده است. طبق این محاسبات بیش از ۹۵٪ از این مقدار تثبیت ازت در مراتع استرالیا از طریق لگومهای مرتعی تامین گردیده است. قریب ۵۰ سال پیش مطالعات در مورد سیستم همزیست تثبیت ازت با گیاهان بقولات حول چهار محور صنعت تلقیح ریزوبیا به عنوان میکروارگانیزومهای

آزاد زی در خاک، تشکیل گره، تثبیت ازت و نقش بقولات در اقتصادی نیتروژن بوده است.

در سال ۱۹٦۹ دیت براساس مطالعات یودالس این مطالعات را بر ۳ اصل: انتخاب و نگهداری ریزوبیای مناسب، کنترل کیفی ماده تلقیح برای بقولات (inoculant) و توصیه‌های ضروری برای تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان مواد تلقیح ریزوبیوم استوار دانست.

نخستین مطالعات در مورد ریزوبیا به عنوان میکروارگانیزمهای آزادزی از طریق انجام صحیح تلقیح لگومها و فهم کامل اکولوژی ریزوبیا در خاک شروع شد و بعد از آن به کشت و نگهداری ریزوبیا برروی مواد نگهدارنده و یا حامل مانند پیت منجر گردید و پس از آن تکنیکهای مربوط به شناسایی نژادهای ریزوبیا و کاربرد آنها در خاک و معرفی آنها به میکروفلور خاک توسعه یافت. تری‌نیک در سال ۱۹۸۲ اظهار داشت که از ۱٤۰۰۰ گونه گیاهی متعلق به fabaceae هزار و دویست گونه از نقطه نظر تشگیل گره مورد بررسی قرار گرفته‌اند که از این تعداد ۸۰٪ آنها قادر به گره‌بندی برروی ریشه‌های خود بوده‌اند. اولین افرادی که در زمینه مطالعه دربارهٔ نیازهای غذایی (معدنی و غیرمعدنی) ریزوبیا کار کرده‌اند نوریس در سال ۱۹۵۹ و برجوسون در سال ۱۹٦۱ می‌باشند. در سال ۱۹٦۳ گراهام در مورد نیاز سوشهای ریزوبیوم ملی لوتی به ویتامین و برجوسون در سال ۱۹٦۱ در مورد تأثیر منبع ازت برروی میزان رشد ریزوبیا تحقیقاتی را به انجام رساندند. در سال ۱۹٦۹ دیت اعلام کرد که ماده تلقیح حاوی ۱۰ به توان ۹ سلول ریزوبیا در هر گرم پیت می‌باشد و از نقطه نظر اقتصادی تولیداتی که محتوی دو سوش متفاوت ریزوبیوم مناسب هستند به انواعی که محتوی یک سوش می‌باشند برتری دارند. دیت ۱۹٦۸ و افیفی ۱۹٦۹ دریافتند که از نظر میزان زنده ماندن ریزوبیا برروی بذرهای سوشهای ریزوبیوم در پاسخ به بازدارندگی توسط قارچ‌کشها تفاوتهایی را در قابلیت ایجاد رابطه همزیستی و تشکیل گره از خود نشان می‌دهند.

در سال ۱۹۶۲ وینسنت و همکاران در مورد پوشش محافظ ماده تلقیح کار کردند. این تحقیقات در سال ۱۹۶۵ توسط براکول و فیلیپس و در سال ۱۹۷۰ توسط براکول و والی ادامه یافت. در سال ۱۹۶۲ دیت و وینسنت آزمایش plant test را ابداع و انجام دادند. آنها با کاربرد سوسپانسیون خاک به‌عنوان ماده تلقیح تعداد نسبی ریزوبیوم جهت انجام یک تلقیح موفق را محاسبه کردند. بعدها این روش توسط تامپسون و وینسنت در سال ۱۹۶۷ با کاربرد قارچ‌کشها در محیط آگار اصلاح شد. در مورد جدیدترین مطالعات در مورد شناسایی نژادهای ریزوبیوم در سال ۱۹۹٤ مارتینز رومر خاطر نشان ساخت که ریزوبیوم و برادی ریزوبیوم در ۱۳ گروه جداگانه با میزبانهای مربوطه دسته‌بندی گردیده‌اند. در سال ۱۹۶۸ هلی در شمال N.S.W در زمینه مشکلات تشکیل گره در خاکهای پودزولیک ناشی از اثرات آنتاگونیستی میکروبها به‌عنوان یک عامل مهم تحقیقاتی در این مورد انجام داد. حاصل این مطالعات تشخیص اصلاح خاک به‌وسیله کلسیم بود که سبب زیاد شدن ریزوبیوم در ریزوسفر گیاه شبدر شد. ولی موجب کاهش قابل توجه قارچها در این ناحیه شد. مارشال در سال ۱۹۶۷ با بررسی حرکت الکترونورتیکی برروی سلولهای ریزوبیوم تعیین نمود که باکتریهای کند رشد اسیددوست بوده، ولی گروه سریع رشد شرایط قلیایی را می‌پسندند.

باتملی در سال ۱۹۹۱ توضیح داد که عرصه‌های بایر با میزان بارندگی کم و حرارتهای بحرانی و همچنین خاکهای فقیر با ظرفیت پایین نگهداری آب مهمترین مشکل و محدودیتهای محیطی جهت رشد و توسعه ریزوبیا به شمار می‌روند. در سال ۱۹۹۷ وینسنت مناسبترین ترکیبهای کربنی جهت رشد و تکثیر نژادهای مهم ریزوبیا را تعیین نمود.

مطالعات ژنتیکی در مورد ریزوبیا همیشه ۳ هدف زیر را دنبال کرده‌اند:

۱- افزایش محدوده میزبان برای همزیستی با یک سوش ۲- بدست‌آوردن اطلاعات در مورد منابعی که سبب تغییرات ژنتیکی سوشها در طبیعت می‌شوند ۳- بدست‌آوردن

اطلاعات در مورد ارتباط آشکار موتانتها با والدین خود. در سالهای ۱۹۵٤ وینسنت و در ۱۹٦۲ نوریس مطالبی در مورد اختصاصی بودن سوشهای ریزوبیوم برای میزبانهای مربوطه در سطوح مختلف منتشر نمودند. این موارد شامل قدرت گره‌زایی، توانایی انجام تثبیت ازت و میزان تثبیت و درجه تأثیر سوشها بود. قبل از آن در سال ۱۹۳۲ فرد و همکارانش گروههای هم میزبان در گره‌های بقولات را پایه‌ریزی نمودند. در سال ۱۹٦۹ دیت نتایج تحقیقات خود را در مورد تعیین ماده تلقیح و توصیه گونه‌های مشخص برای مناطق مشخص اعلام نمود.

در محیط خاک عوامل زنده مانند اثر متقابل سوشهای ریزوبیوم با دیگر باکتریها و یا رقابت سوشهای متفاوت با یکدیگر مهمترین عامل زنده‌ای هستند که تثبیت همزیست ازت را محدود می‌سازند. پوکاشتی و همکاران در سال ۱۹۸۲ گزارش دادند که آکتینومیست‌ها، باکتریها و قارچها به‌صورت اعمال اثر آنتاگونیستی برروی ریزوبیا عمل می‌کنند و از طریق رقابت و یا تولید مواد سمی زندگی ریزوبیوم را به خطر می‌اندازند. در مورد رابطه ریزوبیوم و میکوریز باتوجه به نیاز شدید میکوریز به نیتروژن جهت ترکیب کیتین و نیاز زیاد فرآیند تثبیت ازت به فسفر به نظر می‌آید که ارتباط متقابل زیادی را بین قارچ میکوریز و ریزوبیوم در رابطه با گیاهان میزبان بوجود آورده است. آزکن اگویلار و باراً از کشور اسپانیا فعال‌ترین گروهی هستند که در دو دهه اخیر بیشترین تحقیقات جهانی را در زمینه ارتباط متقابل ریزوبیوم و میکوریز به ثبت رسانیده‌اند. دهه ۱۹۸۵ الی ۱۹۹۵ را می‌توان توجه جدی و عملی‌تر محققان ایرانی به اهمیت فرآیند تثبیت همزیست ازت نامید، زیرا محققان زبده‌ای در این زمینه وارد عرصه شده و بیشترین مقالات در این مورد برای اولین بار و بیش از هر زمان دیگری نسبت به گذشته در سطح کشور منتشر گردیده است. در این قسمت لازم به توضیح است که جنبه‌های تحقیقاتی در مورد سوشهای ریزوبیوم مانند اکولوژی و عوامل مؤثر برروی پایداری سوش در طبیعت و مسائل مربوط به میزبان و شرایط مختلف محیط

خاک و عوامل بازدارنده رشد و جنبه‌های اقتصادی و میزان مؤثر تثبیت ازت و . . . باید مورد توجه دانشمندان ایرانی جهت کار درباره ریزوبیا قرار گیرد.

مواد و روشها:

مواد و وسایل مورد نیاز

- نمونه‌های خاک بستر و نمونه‌های ریشه گیاهان میزبان - اتانول ۹۵٪ - محلول نمک استریل با غلظت ۰/۹٪ - آب مقطر استریل - آب معمولی - HgCl2- Hcl -NaOH ۰/۲ درصد محیط کشت یست‌اگسترکت مانیتول آگار شامل مواد:

- Manitol ۱۰ گرم - Yeast extract ۰/٤ گرم K2HPO4 ۰/٤ گرم MgSO4 7H20 ۰/۲ گرم - NaCl ۰/۱ گرم - Ager ۱۵ گرم - آب مقطر استریل ۹۰۰ میلی‌لیتر - PH ٦/۸.

وسایل شامل:

اتوکلاو، انکوباتور، میکروسکوپ نوری، هم‌زن، یخچال، pH متر، ظروف آزمایشگاهی، پنبه، شعله، لام و لامل، لوپ، هاون‌چینی و گلدان پلاستیکی.

روشها:

جمع‌آوری نمونه خاک و گیاه

براساس روش اوینگ و فرچون در جنوب‌غربی اسپانیا مهمترین گونه‌های گیاهی مربوط به اکو تیپهای یونجه‌های یکساله در مناطق مختلف کشور به همراه خاک بستر به تفکیک مناطقی با خصوصیات مختلف اقلیمی در طول فصل رویش از کلیه مناطق مورد نظر جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. قابلیت شناسایی گیاه مهمترین عامل تعیین

کننده زمان جمع‌آوری محسوب گردید. بر این اساس توسعه کامل گیاه از نظر رشد کافی ریشه و تشکیل گره‌ها برروی ریشه دو امر مهم تلقی گردید. طبق روش انتخابی جمع‌آوری نمونه‌های گیاه بر حسب یکساله بودن گونه مورد نظر و پس از شناسایی گیاه انجام پذیرفت. جمع‌آوری نمونه‌ها در مساحتهایی به وسعت حداکثر ۵۰ مترمربع و انتخاب گیاه شاداب و قوی‌تر و وجود گره برروی ریشه انجام پذیرفت.

جمع‌آوری و نگهداری گره

این کار به منظور بدست آوردن نژاد سوش ریزوبیوم ضرورت یافت. بدین‌منظور گره‌ها از گیاهان سالم و سبز که تثبیت ازت بهتری دارند انتخاب و جدا گردیدند. انتخاب گره از بخش بالایی سیستم ریشه در چنین گیاهانی بهتر از قسمتهای دیگر می‌باشد. برای این کار پس از جمع‌آوری نمونه‌های ریشه و خاک و انتقال به آزمایشگاه به‌وسیله دست و با دقت خاک را از ریشه جدا نموده و چون اکثر گره‌ها برروی ریشه‌های ثانویه می‌باشند شکستن کلوخه‌های خاک با دقت و ظرافت صورت گرفت. بعد گیاه را از آن به دقت جدا نموده و اندام هوایی گیاه قطع شد و ریشه‌ها به آرامی با آب جاری شستشو داده شدند. یک سطح مشبک توری و یا سیو (Seive) جهت جلوگیری از فرار و از دست رفتن گره‌ها هنگام شستشو بکار گرفته شد. گره‌ها به نحوی جدا شدند که آسیب نبینند. به میزان ۲-۱ میلیمتر از ریشه در دو طرف هر گره باقی گذاشته شد. این امر سبب حفظ سلامت گره در موقع استریل و تماس با مواد شیمیایی اعمال می‌شود. قبل از انبار نمودن بایستی گره‌ها را با حوله کاغذی یا پارچه پنبه‌ای خشک نمود. گره‌های تازه قابلت نگهداری تا ٤٨ ساعت در یخچال را دارند. با تنظیم درجه حرارت یخچال بر روی ٤ درجه سانتیگراد دقت شد که در این مدت گره‌ها یخ نزده و کریستال یخ در آنها تشکیل نگردد. زیرا یخ‌زدگی سبب مرگ باکترویدها می‌گردد. برای نگهداری گره‌ها به مدت طولانی‌تر نگهداری به‌صورت

خشک در شیشه توصیه می‌گردد که در حضور ماده سیلیکاژل گره‌ها به مدت ۱۲-۶ ماه قابل نگهداری هستند، ولی استخراج سوش از این گره‌ها بسته به نوع گیاه دشوارتر صورت می‌گیرد و در این طرح نیز به این روش نیازی نبود. جهت اطلاع محققان ذکر می‌گردد که در این روش تعداد ۵-۳ گره با اندازه متوسط و یا ۳-۲ گره بزرگتر بر روی لایه پنبه‌ای در هر شیشه کافی است و رطوبت سطحی گره از قبل توسط حوله کاغذی باید گرفته شود. در کلیه روشها نکته مهم آن است که جهت خشک‌شدن نسبی گره‌ها به هیچوجه نبایستی از اون استفاده نمود، زیرا حرارت ایجاد شده سبب کشته شدن باکتروییدها می‌گردد.

استخراج سوش باکتریایی ریزوبیوم:

با توجه بوجود انواع روشها، استفاده از روش استخراج مستقیم بهتر بوده و احتمال خطا و وجود ناخالصی در محیط کشت بسیار کمتر از روش استخراج سوش به طور غیرمستقیم از محیط خاک می‌باشد. در روش مستقیم گره‌های جمع‌آوری شده همراه با زائده یک میلیمتری از بقایای ریشه در طرفین استریل گردیدند. برای استریل‌نمودن گره‌ها را با آب استریل شستشو داده بعد به مدت ۳ دقیقه در محلول کلرور جیوه $HgCl_2$ ۰/۲٪ قرار داده و بعد از آن با محلول نمک استریل به غلظت ۰/۹٪ به مدت ۵-۳ دقیقه شستشو و سپس گره‌ها را بسته به تعداد در یک یا دو میلی‌لیتر آب مقطر استریل با هاون‌چینی استریل شده له نمودیم. محیط کشت ایست‌اکسترکت مانیتول آگار که محیط کشت اختصاصی برای ریزوبیوم می‌باشد از قبل آماده و از کشت مادر Mother Culture تهیه شده توسط لوپ استریل برداشت نموده و بر روی این محیط داخل پتری دیش کشت دادیم. (در آخرین مرحله از مراحل استریل‌کردن گره‌ها می‌توان به جای استفاده از محلول نمک استریل با غلظت ۰/۹٪ از آب مقطر استریل به دفعات ۶-۵ مرتبه شستشوی گره‌ها و زدودن مواد شیمیایی اقدام نمود. در این آزمایش

از هر دو روش استفاده شد و نتیجه یکسانی حاصل گردید. بـرای تهیـه محیـط کشـت YMA مواد مورد نظر با اوزان مربوطه: Manitol ۱۰ گـرم – Yeast extract ۰/٤ گـرم $K2HPO^4$ ۰/٤ گرم $MgSo^4$ 7H20 ۰/۲ گرم – NaCl ۰/۱ گرم – Agar ۱۵ گـرم – آب مقطـر اسـتریل ۹۰۰ میلی‌لیـتر – و PH ٦/۸ اعمـال گردیـد. پـس از توزیـــن دقیـــق و آماده‌نمودن مواد، محیط کشت را با اتوکلاو استریل نموده و بعد از این مرحله در پتری دیشهای از قبل استریل شده توزیع نمودیم. پس از سرد شدن، پتریهای محتـوی محیـط کشت را بسته‌بندی و در یخچال نگهداری کردیم و موقـع اسـتخراج سـوش ریزوبیـوم برای کشت مورد استفاده قرار گرفت.

پس از انتقال کشت مادر بر روی محیط پتریها را به مـدت ۵-۳ روز در حـرارت ۲٦ درجه سانتیگراد جهت رشد مطلوب سوشهای احتمالی قرار دادیم. پس از مشـاهده رشد سلولهای باکتریایی جهت اطمینان از ریزوبیوم‌بودن آنها با آزمایش کنگـو رد آگـار (Congo red agar) و پس از موفقیت در این مرحله کشتهای متوالی با روشهای مربوطه جهت تولید کلنی از سلولهای انفرادی سوشها صورت پذیرفت. روشهای مختلف کشت برای تولید کلنی بکار گرفته شدند و بـا اسـتخراج کلنی‌هـای تولیـد شـده و تطـابق بـا خصوصیات ظاهری کلنی‌های سوش ریزوبیوم اعلام شده توسط برگی در مرجع بزرگ باکتری‌شناسی با نام برگیز منوال در نهایت سـوش خـالص بـا اطمینـان ۹۵٪ را تعییـن نمودیم. با انجام آزمایش مهم آزمون گیاه Plant test و ایجاد گره بـرروی گیـاه میزبـان توسط سوشهای استخراجی در نهایت سوشهای خالص تعیین و کد مورد نظر بـه آنـها تعلق گرفت. این سوشها آمـاده تحویـل بـه محققـان جـهت انجـام مطالعـات وسـیعتر ریزوبیولوژی و تعیین خصوصیات مهم از جمله میزان تثبیـت ازت گردیـد. سوشـها در یخچال قرار داده شدند و جهت نگهداری و حفاظت از این ژرم‌پلاسم تجدید کشت در هر دو ماه در محیط کشت جدید صورت پذیرفت. در صـورت نگـهداری در حـرارت معمولی آزمایشگاه این تجدید کشت جهت حفظ ژرم‌پلاسم بایستی هر دو هفتـه یکبـار

صورت پذیرد که هزینه نگهداری را بسیار بالا می‌برد. روش دیگری به نام فریز دراینگ (Freez drying method) یا روش انجماد خشک وجود دارد که قادر به نگهداری سوشها به مدت ۱۰ سال در حرارت معمولی اتاق می‌باشد که در این طرح مورد نیاز نبوده و علاوه بر آن وسیله آن بسیار گران است و موجود نیست.

نتایج:

اسامی سوشهای ریزوبیوم استخراج شده به تفکیک استانهای مربوطه به شرح زیر است:

استان کرمانشاه

کد سوش	نام سوش	منطقه	پاسخ به میزبان	جذب محیط Congo red agar
۱	Rh. Meliloti	حسن‌آباد	+	-
۲	Rh. Meliloti	پاوه	+	-
۳	Rh. trifolli	پاوه	+	-
٤	Rh. Meliloti	قصرشیرین	+	-
٥	Rh. Meliloti	گیلانغرب	+	-
٦	Rh. trifolli	گیلانغرب	+	-

استان تهران

کد سوش	نام سوش	منطقه	پاسخ به میزبان	جذب محیط Congo red agar
۱	Rh. Meliloti	هومند	+	-
۲	Rh. Meliloti	هومند	+	-

استان لرستان

کد سوش	نام سوش	منطقه	پاسخ به میزبان	جذب محیط Congo red agar
۱	Rh. Meliloti	بروجرد (میزبانی یونجه)	+	-
۲	Rh. Meliloti	بروجرد (میزبانی یونجه)	+	-
۳	Rh. Meliloti	رومشگاه (چغال)	+	-
٤	Rh. Meliloti	رومشگاه (چغال)	+	-
٥	Rh. Meliloti	پارک جنگلی شوراب	+	-
٦	Rh. Meliloti	نوژیان خرم‌آباد	+	-
۷	Rh. Meliloti	کوهدشت	+	-

استان آذربایجان‌شرقی

کد سوش	نام سوش	منطقه	پاسخ به میزبان	جذب محیط Congo red agar
۱	Rh. Meliloti	پیام مرند	+	-
۲	Rh. Meliloti	تحقیقات دیم مراغه	+	-
۳	Rh. Meliloti	تحقیقات دیم مراغه	+	-
٤	Rh. Meliloti	تحقیقات دیم مراغه	+	-
٥	Rh. Meliloti	روبروی ت. دیم‌مراغه	+	-
٦	Rh. Meliloti	جزیره اسلامی	+	-
۷	Rh. Meliloti	قره چمن (بنفشه‌درق)	+	-
۸	Rh. Meliloti	بستان‌آباد	+	-
۹	Rh. Meliloti	بستان‌آباد	+	-
۱۰	Rh. Meliloti	شیبه	+	-
۱۱	Rh. Meliloti	شیبه	+	-

مجموعه ۲۶ سوش ریزوبیوم از ریشه یونجه‌های یکساله واقع در رویشگاههای مربوطه در استانهای فوق استخراج گردید. سوشها در طول مدت نگهداری تجدید کشت شده و جهت انجام تحقیقات مختلف در اختیار متقاضیان قرار گرفت. این سوشها به طور عمده مورد استفاده دانشجویان دانشگاههای مختلف قرار گرفت. این دانشجویان برای تحقیقات پایان‌نامه خود به سوشهای فوق نیاز داشتند که در اختیار آنها قرار گرفت.

بحث:

۱) کلیه سازمانها، دست‌اندرکاران و مدعیان تحقیق در زمینه تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در سطح کشور در اولین فرصت، باید جامعه‌ای علمی را در این خصوص به طور مستقل و یا به‌صورت شاخه کشاورزی سیاستهای کلان انرژی کشور مستقر در وزارت نیرو تشکیل داده و کنگره‌های اختصاصی در این زمینه را راه‌اندازی نمایند. (این امر به مصرف انرژی زیاد در خصوص کودهای شیمیایی ازته مربوط می‌گردد.

۲) مشابه بقیه موارد تقریباً در این زمینه فاصله بسیار زیادی با کشورهای پیشرفته داریم، به‌طوری که در این کشورها کنگره‌های داخل قاره‌ای، منطقه‌ای، کشوری و بین‌المللی در زمینه تثبیت بیولوژیکی نیتروژن به طور دائم در جریان می‌باشد. جامعه علمی تثبیت ازت در کشور ما کمرنگ‌ترین حضور را در این مجامع دارد و این در حالی است که محققان ارزشمندی در این زمینه در کشور حضور دارند و در اینجا به جاست که یاد دانشمند مرحوم، گرانمایه و مایه افتخار کشور به نام بهلول متولد تهران و از محققان بزرگ شرکت نیفتال آمریکا در زمینه تحقیقات ریزوبیوم گرامی داشته شود.

۳) بایستی توجه سیاست‌گذاران کشور به امور تکنولوژیهای نوین در بخش کشاورزی از جمله تولید و گسترش استفاده از کودهای بیولوژیکی معطوف شود، چون حمایت

جدی از این قبیل فعالیتهای علمی و اجرایی از نیازهای حیاتی امروز و آینده کشاورزی کشور است.

٤) شرایط نامساعد موجود مانند مشکلات کلانی چون عدم سرمایه‌گذاری در بخش کشاورزی - یکپارچه نبودن زمینها - عدم مکانیزاسیون و سودآور نبودن فعالیت در بخش کشاورزی به علت واقعی نبودن قیمت تولیدات، کشاورزی کشور را با بحران روربرو نموده است و نیاز به بسیاری از موارد مهم از جمله تکنولوژیهای نوین را کمرنگ نموده است ولی با وجود همه این مصائب، رسالت علمی از دوش محققان برداشته نشده و به امید روزی که راههای پیشرفت در بخشهای مختلف کشاورزی تسهیل گردد محققان موظف به تطبیق خود با شرایط موجود تا حصول شرایط مطلوب هستند.

۵) در پایان به اطلاع می‌رساند که تکنولوژیهای مربوط به تولید انبوه کودهای بیولوژیکی مانند سوشهای ریزوبیوم، قارچ میکوریز و تولید ماده بیولوژیکی و بسیار مهم سوپر جاذب کوچا (R. H. C) جهت حفظ منابع آب و حفاظت از محیط زیست در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع موجود بوده و این تکنیکها چشم به سرمایه‌های عظیمی دوخته‌اند که در بخش دلالی کشور در چرخش بوده و به ایرانی آباد، سرسبز و آبادان نمی‌اندیشد.

منابع:

1- Jordan, D. C, Allen, O. N, 1974. Family Rhizobiaceae. pp. 261-267. In: Buchanan, R. E., Gibson, N. E. (eds.), Bergey, S manual of determinative bacteriology. 8 th ed. Baltimore: Williams.

2- Donald, C. M, 1960. The impact of cheap nitrogen. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 34: 203-18.

3- Hutton, E. M, 1968. Australian pasture legumes. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 34: 203-18.

4- Date,R. A,1969. A decade of legume inoculant quality control in Australia. J. Aust. Inst. Agric. Sci. 35: 27-37.

5- Norris, D. O, 1959. The role of calcium and magnesium in the nutrition of Rhizobium. Aust j. Agric. Res. 10: 651-98.

6- Bergersen, F. J., Burris, R. H., and Wilson, P. W,1961.Biochemical studies on soybean nodules. 9 th Int. bot. Congr.,Recent Advances in Botany. (Univ. Press: Toronto). Pp. 589-93.

7- Data, R. A, 1968.Rhizobial survival on the inoculated legume seed. Trans. 9 th Int. Congr. Soil Sci. Vol. 2, pp. 75-83.

8- Brockwell, J., and Whalley, R. D. B. 1970. Studies on seed pcllcting as an aid to legume seed inoculation. II. Survival of Rhizobium meliloti applied to medic seed sown in to dry soil. Aust. J. exp. Agric. Anim.Husb. 10: 455-9.

9- Afifi, N. M., Moharram, A. A., and Abd-El-Malek, Y, 1969.Sensitivity of Rhizobium species to certain fungicides. Arch.Mlkrobiol

10- Incent. J.M., and Jancey, C. H,1962. A calcium Sensiti of Rhizobium ttrifolli. Nature, Lond. 195: 99-100.

11- Brockwell. J., and Phillips, L. J, 1965. Survival at high temperatures of Rhizobium meliloti in peat inoculant on lucem seed. Aust. J.

(Sci. 27: 332-3.12).

12- Data, R. A., and Vincent, J. M, 1962. Determination of the number of root nodule bacteria in the presence of other organisms. Aust. J. exp. Agric. Anim. Husb. 2: 5-7.

13- Thompson, J. A., and Vincent, J. M, 1967. Methods of detlection and estimation of Rhizobium in soil. Pl. Soil 26: 72-84.

14- Martincz-Romcro, E. 1994, Recent devclopmont in Rhizobium taxonomy. Plant Soil 161: 11-20.

15- Marshall, K. C, 1967. Electriphoretic prpperties of fast-and sloww-growing species of Rhizobium. Aust. J. biol. Science 20: 429-38.

16- Bottomley, P, 1991. Ecology of Rhizobium and brady Rhizobium. In Biological Nitrogen Fixation, G. Stacey. R. H. Borris, and H. J. Evans (eds.). Chapman and Hall, New York, pp. 292-347.

17- Vincent, J. M,1977. Rhizobium: General microbiology, pp. 277-366. In: Hardy, R. W. F., Silver, W. S. (eds.), Biology. A trcatisc on dinitrogcn fixation, Sect. 3. New York: Willcy Interscience.

18- Fred, E. B., Baldwin, I. L., and McCoy, E,1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. (Univ. of Wisc. Press: Madison).

19- Vincent. J. M., and Waters, L. M,1954. The root nodule bacterium as a factor in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore district, New South Wales. 2. Survival and successof inocula in laboratory trials. Aust. J. agric. Res. 5: 61-76.

20- Norris, D. O,1962. Strain spccificit, With particular reference to tropical legumes. Proc. N. Qd Agrostol. Conf., South Johnstone. (Qd Dep. Agric. Stock: Brisbane). Pp. 15/1-15/1.4.