بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیک *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* بومی ایران

هوشنگ خسروی

کرج، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت:۹۳/۶/۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۷

چکیده

نیتروژن یکی از مهم ترین و پرمصرف‌ترین عناصر برای رشد گیاهان است. نیتروژن در کشاورزی، معمولاً از طریق کود شیمیایی در اختیار گیاه قرار می‌گیرد که باعث مشکلات زیست محیطی فراوانی می‌شود.. تثبیت زیستی نیتروژن از پدیده‌های طبیعی و استثنایی است که توسط گروهی از باکتریها از جمله *ریزوبیوم*ها انجام می‌شود. باکتری اختصاصی همزیست تثبیت کننده نیتروژن باقلا *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* می‌باشد. یکی از راههای مطمئن و ارزان برای تشخیص این باکتری آزمون آلودگی گیاه می‌باشد. در این پژوهش در موعد ۵۰ درصد گلدهی، نمونه‌برداری از گرههای *ریزوبیومی* ریشه باقلا از استانهای خوزستان، لرستان، گلستان، مازندران و گیلان انجام شد. در مجموع، تعداد ۱۶۸ نمونه گره از این مناطق جمع‌آوری شد. پس از جداسازی باکتریها از گرهها، آزمایشات مرفولوژیک و فیزیولوژیک مختلفی از جمله آزمون آلودگی گیاه و بررسی کارآیی تثبیت زیستی نیتروژن (S.E.) بر روی نمونه‌ها انجام شد. بر این اساس تعداد ۱۰۱ جدایه، خالص‌سازی و شناسایی شدند. تعداد ۴۲ جدایه بر اساس توان ایجاد گره در ریشه شناسایی و تأیید شدند. بر اساس نتایج کارآیی تثبیت نیتروژن تعداد ۱۹ جدایه انتخاب شدند. مقدار S.E. جدایه‌های انتخاب شده بین ۵ تا ۱۶۵ بود. جداهای انتخابی از نظر مقاومت به آنتی بیوتیکها دارای تنوع زیستی بودند. نتیجه و حاصل اصلی این پژوهش دستیابی به چند سویه *ریزوبیوم* برتر بومی از نظر گره‌بندی ریشه و کارآیی همزیستی برای ادامه پژوهشها در جهت معرفی مایه تلقیح ریزوبیوم برای گیاه باقلا بود.

واژه های کلیدی: نیتروژن، همزیستی، تثبیت.

نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۶۳۶۲۰۳۵۰۲، آدرس پست الکترونیکی:hkhosravi@swri.ir

مقدمه

جمعیت جهان به طور تصاعدی در حال رشد و نیاز جامعه به غذا و از جمله پروتئین در حال افزایش است. بنابراین ارائه راهکارهای مبتنی بر توسعه پایدار و توجه به حفظ سلامت محیط زیست امری ضروری است. نیتروژن یکی از عناصر پرنیاز و مهم برای رشد گیاهان است. با وجود اینکه بیش از ۷۸ درصد ترکیب گازی جو زمین را نیتروژن مولکولی (N_2) تشکیل می‌دهد و برفراز هر هکتار زمین کشاورزی حدود ۷۸۰۰۰ تن از این گاز وجود دارد، اما این عنصر به شکل مولکولی برای گیاهان قابل جذب نیست. از طرف دیگر، نیتروژن، مهم ترین عامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی در جهان است (۹). مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی یکی از راههای معمول برطرف کننده این محدودیت می‌باشد که از یک سو مهم ترین نهاده کشاورزی مؤثر در افزایش تولید بوده و از سویی دیگر از پتانسیل آلوده‌سازی بالایی برخوردار است. مصرف بی‌رویه و غیر اصولی کودهای شیمیایی نیتروژنی باعث آلودگی نیتراتی آبهای سطحی و زیر زمینی و در نهایت موجب مسمومیت انسان، دام و آبزیان می‌شوند. همچنین مشکل

افزایش نیترات زدایی (دی نیتریفیکاسیون) و در نتیجه تولید بیشتر گازهای اکسید نیتروژنی و تخریب لایه حیاتی ازن را به همراه دارند. ظهور این قبیل مسائل مخرب و بسیاری مسائل دیگر ضرورت تجدیدنظر در روشهای افزایش تولید محصولات کشاورزی و لزوم فراهم‌سازی شرایط برای استفاده بیشتر از فرآیندهای مفید طبیعی مانند تثبیت زیستی نیتروژن به جای کودهای شیمیایی نیتروژنی را ایجاب می‌کند. تثبیت زیستی نیتروژن در انحصار انواع خاصی از موجودات پروکاریوت می‌باشد که توانائی تولید آنزیم نیتروژناز را دارند (۹ و ۲۳). *ریزوبیوم* اولین بار در سال ۱۸۸۸ از گره لگومها جداسازی و *Bacillus radicicola* نامیده شد. *ریزوبیوم* همزیست با باقلا متعلق به سلسله باکتریها، شاخه پروتئوباکترها، رده آلفاپروتئوباکترها، راسته ریزوبیال، خانواده ریزوبیاسه، جنس *ریزوبیوم*، گونه لگومینوزاروم و بیووار ویسیا می‌باشد (۱۳). باکتری اختصاصی همزیست با باقلا *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* می‌باشد. این باکتری، میله‌ای شکل، هوازی، متحرک و دارای دو تا شش تاژه پیرامونی می‌باشد. دمای بهینه برای رشد آن ۳۰-۲۵ درجه و pH بهینه برای رشد این باکتری شش تا هفت است. کلنیهای آن دایره‌ای، محدب و برآمده، لعابی و نیمه مات هستند که پنج روز پس از رشد در محیط کشت (Yeast Manitol Agar)Y.M.A. قطر آنها به دو تا چهار میلی‌متر می‌رسد. باقلا به عنوان یکی از حبوبات عمده در بسیاری از کشورها از جمله چین، مصر، سودان ، استرالیا و اتیوپی کشت و به صورت خشک یا سبز و تازه و یا کنسرو شده مصرف شده و بخشی از پروتئین جوامع را تأمین می‌کند. مطابق آمار سازمان خوار و بار و کشاورزی جهانی، کشور چین با تولید ۱/۴ میلیون تن باقلا در سال ۲۰۱۲ در مقام اول می‌باشد (۴). سطح زیر کشت باقلا در ایران در حدود ۲۰۰۰۰ هکتار و عملکرد متوسط باقلای خشک حدود دو تن در هکتار می‌باشد. عمده سطح زیر کشت باقلا در استانهای خوزستان، لرستان،گلستان و مازندران می‌باشد.

سویه‌های برتر *ریزوبیوم* در گرههای فعال موجود در ریشه به شکل باکتروئید بوده و می‌توانند مقادیر قابل توجهی نیتروژن مولکولی هوا را تثبیت کنند. همزیستی باکتری فوق با گیاه باقلا علاوه بر تثبیت نیتروژن و در نتیجه کاهش مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی، سبب افزایش عملکرد نیز می‌شود. مقدار تثبیت نیتروژن مولکولی با توجه به نوع سویه همزیست، جمعیت باکتریهای همزیست بومی، میزان کود مصرفی، رقم بذر و به طور کلی شرایط خاکی و اقلیمی بسیار متفاوت می‌باشد. مقدارتثبیت نیتروژن توسط ریزوبیوم باقلا متفاوت و حداکثر تا ۳۰ درصد کل نیتروژن جذب شده گزارش شده است (۱۷). همچنین گزارش شده که نیتروژن مشتق شده از اتمسفر توسط باقلا برای یک سویه *ریزوبیوم* بین ۶۶ تا ۷۴ درصد می‌باشد (۳). در گزارش دیگری آمده است که باقلا ۷۹ درصد نیتروژن مورد نیاز خود را از طریق تثبیت زیستی، ۲۰ درصد از طریق خاک و فقط یک درصد آن را از طریق کود به دست می‌آورد. (۲۵).

در تحقیقی در آلبرتای کانادا مقدار تثبیت نیتروژن توسط باقلا ۳۴/۸ و ۱۲۷/۵ کیلوگرم نیتروژن در هکتار گزارش شد (۱۸).

در شرایط اقلیمی و خاکی فرانسه و سوریه نیز همزیستی باقلا با یک سویه معین از *ریزوبیوم* به ترتیب ۹۰ و ۶۹ درصد از کل نیتروژن جذب شده توسط گیاه را از طریق تثبیت تأمین نمود (۷).

تثبیت زیستی نیتروژن باقلا در مناطق مختلف کشاورزی جنوب بریتانیا مورد مطالعه و پتانسیل تثبیت نیتروژن، متفاوت و حداکثر تا ۳۰ درصد کل نیتروژن جذب شده گزارش شده است (۲۱).

تلقیح باقلا با *ریزوبیوم*، عملکرد و وزن صد دانه باقلا در سودان را به طور قابل توجهی افزایش داد.(۱۲).

با توجه به اینکه رابطه همزیستی *ریزوبیوم*ها با خانواده لگومها کاملاً اختصاصی بوده و هر لگوم قادر است فقط با یک گونه *ریزوبیوم* رابطه همزیستی تثبیت کنندگی نیتروژن داشته باشد بنابراین، بر اساس این خصوصیت آزمون آلودگی گیاه مهم ترین، مطمئن‌ترین و ارزانترین روش برای شناسایی *ریزوبیوم*ها تا سطح گونه و حتی بیووار معرفی شده است. آزمون کارآیی یا راندمان تثبیت نیتروژن یا به اختصار، .S.E نیز از آزمونهای مهم برای انتخاب سویه‌های برتر از نظر توان تثبیت نیتروژن مولکولی هوا محسوب می‌شود.

هدف از انجام این پژوهش، بررسی و مطالعه سویه‌های *ریزوبیوم* بومی همزیست با باقلا در مناطق عمده مختلف زیر کشت این محصول بود. هدف نهایی در پژوهشهای تکمیلی که شامل تحقیقات مزرعه‌ای در مناطق مختلف ایران است، دستیابی به سویه‌های برتر به منظور ارائه مایه تلقیح و کود زیستی نیتروژنی مناسب برای کشت باقلا در ایران است.

مواد و روشها

به منظور تهیه کلکسیونی متنوع از باکتری *R. leguminosarum* bv.*viciae* همزیست با باقلا از مزارع کشاورزان در استانهای گلستان، مازندران، خوزستان و لرستان به علت سطح زیر کشت قابل توجه و استان گیلان به علت کشتهای پراکنده متعدد، در موقع ۵۰ درصد گل-دهی گیاه، نمونه‌برداری انجام شد. برای نمونه‌برداری، چند بوته باقلا که از نظر ظاهری دارای رشد بهتری بودند انتخاب و به وسیله بیل به شعاع حدود ۱۵ سانتیمتر اطراف ریشه از خاک خارج شدند. پس از شستن ریشه‌ها و تمیز کردن آنها، گرهها به آرامی از ریشه جدا و پس از شستشوی کامل با آب، با دستمال کاغذی خشک و در ظروف حاوی سیلیکاژل قرار داده شدند. نمونه‌ها به آزمایشگاه بخش تحقیقات بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب منتقل شدند. ابتدا گرهها به مدت ۱۰ ثانیه در الکل ۹۶ درجه و سپس به مدت دو دقیقه در کلرید جیوه ۰/۱ درصد قرار داده و استریل سطحی شدند. سپس گرهها با آب مقطر استریل حدود شش بار کاملاً شستشو داده شدند. گرهها با پنس استریل به درون لوله‌های درپوش‌دار حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل و به وسیله میله شیشه‌ای استریل به طور کامل له شدند. با استفاده از حلقه لوپ، مقداری از سوسپانسیون حاصل بر روی پلیت حاوی محیط کشت Y.M.A انتقال داده شد. این محیط کشت حاوی دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ۰/۵، سولفات منیزیم ۰/۱، کلرید سدیم ۰/۱، مانیتول ۱۰، عصاره مخمر ۰/۵، و آگار ۱۵ گرم در یک لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر کنگورد ۲/۵ درصد بود. pH محیط روی هفت تنظیم شد. پس از پخش سوسپانسیون به وسیله حلقه، پلیتهای تلقیح شده در انکوباتور و دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با توجه به نوع سویه باکتری، بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت کلنیها ظاهر شدند. از کلنیهای مشخص و تیپیک یک حلقه داخل لوله‌های اسلنت حاوی Y.M.A با سه درصد آهک کشت شدند. این اسلنتها جهت ادامه پژوهشهای مربوطه در دمای چهار درجه سانتی گراد و در یخچال نگهداری شدند. آزمونهای بررسی اشکال میکروسکوپی و کلنی باکتریها، آزمون تحرک و آزمایش گرم انجام شدند. برای بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدایه‌ها از پنج آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، اسپکتینومایسین، کانامایسین، ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید استفاده شد. حلال سه آنتی بیوتیک اول، آب مقطر، حلال ریفامپیسین، اتانول ۹۵ درصد و حلال نالیدیکسیک اسید، سود یک نرمال بود. از هرآنتی بیوتیک، پنج سطح ۱۰؛ ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت استفاده شد (۶). برای تجزیه آماری داده‌های آنتی-بیوتیک از برنامه Minitab استفاده شد. برای نگهداری و حفاظت از نمونه‌های باکتری در دراز مدت با استفاده از روش لیوفیلیزاسیون یا فریز دراینگ سه تکرار آمپول لیوفیلیزه تهیه شد (۶ و ۲۰).

جهت تأیید نهایی باکتریهای مورد نظر، آزمون آلودگی گیاه بر روی آنها صورت گرفت. برای این منظور از سیستم ظروف لئونارد حاوی ماسه شسته و استریل و در سه تکرار استفاده شد. یک عدد بذر باقلای استریل سطحی شده در هر ظرف کشت شد. باکتریهای مورد نظر در محیط مایع Y.M.B. تکثیر و سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر با جمعیت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر بر روی هر بذر باقلا تلقیح شد. در طول دوره رشد، محلول غذایی عناصر کم مصرف و پر مصرف (بدون نیتروژن) از طریق سیستم ظرف لئونارد تأمین شد. دمای اتاقک رشد بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. سه تکرار نیز به صورت شاهد بدون تلقیح در نظر گرفته شدند. پس از چهار هفته، ریشه‌ها از نظر تشکیل گره مورد بررسی قرار گرفتند (۶، ۱۱ و ۲۰). برای محاسبه درجه گره‌بندی از جدول یک استفاده شد (۸).

جدول ۱- روش درجه گره‌بندی برای لگومها (۸)

درجه گره‌بندی	توزیع و تعداد گره‌های موثر	
	در ناحیه تاج ریشه*	در سایر قسمت‌های ریشه
۰	۰	۰
۱	<۵	۰
۲	۵-۱۰	۰
۳	>۱۰	۰
۴	>۱۰	<۵
۵	>۱۰	>۱۰

*تاج ریشه عبارت است از ۵ سانتیمتر بالایی ابتدای ریشه

آزمون بررسی کارآیی تثبیت نیتروژن به صورت گلخانه‌ای انجام شد. برای این منظور از گلدانهای حاوی دو کیلوگرم ماسه استریل استفاده شد. تیمارها شامل تیمارهای تلقیحی، تیمار نیتروژنی و تیمار شاهد بدون تلقیح در سه تکرار بودند. پس از رشد، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر با جمعیت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر بر روی هر بذر باقلا تلقیح شد. در طول دوره رشد، محلول غذایی عناصر کم مصرف و پر مصرف (بدون نیتروژن) تأمین شد. تیمار نیتروژنی به مقدار ۱۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به شکل نیترات پتاسیم و به صورت تقسیط در پنج مرحله و هر مرحله ۲۵ میلی‌گرم در کیلوگرم به ترتیب در ۴، ۶، ۷، ۸ و ۹ هفتگی استفاده شد. دمای گلخانه بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم شد. در انتهای ۱۰ هفتگی، اندام هوایی از محل طوقه جداسازی و در داخل پاکتهای کاغذی به مدت سه روز در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. سپس وزن خشک اندام هوایی اندازه‌گیری شد (۶ و۲۰). وزن خشک اندام هوایی شاخص مناسبی برای محاسبه کارآیی تثبیت نیتروژن (S.E.) است. برای به دست آوردن S.E از فرمول زیر استفاده شد (۲۰):

$$S.E. = \frac{I - C}{N - C} \times 100$$

در این فرمول I: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار تلقیح شده، C: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد بدون تلقیح و N: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار نیتروژنی است. در ارزیابی کارآیی همزیستی، S.E.<۵۰: نسبتاً مؤثر (ضعیف)، S.E.=۵۰-۷۵: مؤثر (متوسط) و S.E.=۷۵-۱۰۰: کارآیی خوب و S.E.>۱۰۰: کارآیی خیلی خوب و به عنوان سویه برتر طبقه‌بندی می‌شوند.

نتایج و بحث

در مجموع ۱۶۸ نمونه گره *ریزوبیوم* باقلا از مناطق مختلف ایران جمع آوری شد. تعداد و محل جداسازی باکتریها در جدول دو ارائه شده است. تعداد ۱۵۰ جدایه باکتری از گرهها جداسازی شدند. ۱۰۱ جدایه دارای مشخصات میکروسکوپی و مرفولوژیک *ریزوبیوم* بودند. کلیه جدایه‌های انتخابی در این مرحله، گرم منفی، میله‌ای، هوازی، متحرک و کلنیهای آنها دایره‌ای، محدب، برآمده، لعابی، نیمه مات، فاقد توان جذب کنگورد با قطر کلنی دو تا چهار میلی‌متر پس از پنج روز بودند. این موارد مطابق با مشخصات ذکر شده در منابع (۱۳) برای *ریزوبیوم* بود

(داده‌ها نشان داده نشده است). بر اساس آزمون آلودگی گیاه، تعداد ۴۲ جدایه شناسایی و تأیید شدند.

همان طوری که جدول دو نشان می‌دهد تعداد جدایه خالص شده معمولاً کمتر از تعداد گره جمع‌آوری شده می‌باشد. یکی از دلایل این مسئله این می‌تواند باشد که در برخی از گرهها ممکن است باکتری در حین انتقال از مزرعه تا آزمایشگاه توان رشد خود را از دست بدهد و یا اینکه در هنگام استریل نمودن گره، مواد استریل کننده به داخل گره نفوذ و موجب از بین رفتن باکتری شود.

جدول ۲- تعداد نمونه و جدایه‌های خالص شده به تفکیک استان

استان	تعداد نمونه گره جمع‌آوری شده	تعدادجدایه باکتری خالص شده	تعداد جدایه تأیید شده بر اساس خصوصیات اندازه‌گیری شده	تعداد جدایه انتخاب شده بر اساس آزمون آلودگی گیاه*
گلستان	۲۸	۲۷	۱۶	۱۶
مازندران	۴۸	۴۲	۲۵	۸
گیلان	۳۴	۲۵	۱۵	۶
لرستان	۱۸	۱۶	۷	۶
خوزستان	۴۰	۴۰	۳۸	۶
جمع	۱۶۸	۱۵۰	۱۰۱	۴۲

* جدایه‌های با درجه گره‌بندی کمتر از یک ارائه نشده‌اند.

در یک بررسی در چین از ۵۴ جدایه جداسازی شده از گرههای ریزوبیومی باقلا از مناطق مختلف، ۴۸ جدایه توان تشکیل گره در ریشه باقلا را داشتند. در این گزارش آمده است شش جدایه برای ادامه کار برای تولید مایه تلقیح انتخاب شد (۲۴).

در جدول دو همچنین همه جدایه‌های خالص شده به عنوان ریزوبیوم مورد تأیید قرار نگرفتند. از دلایل این مسئله ممکن است به علت وجود سایر باکتریها غیر از ریزوبیوم در داخل گره یا سایر آلودگیهای در سطح گره باشد. گزارش شده است از گرههای استریل سطحی شده جداسازی شده از ریشه یونجه باکتریهای اندوفیت غیر ریزوبیومی هم جداسازی شده است (۲۲).

در جدول سه نتایج مقاومت و حساسیت سویه‌های مختلف به مقادیر مختلف آنتی‌بیوتیکها ارائه شده است. دندوگرام ترسیم شده جدایه‌های مختلف بر اساس نتایج مقاومت به آنتی‌بیوتیک نیز در شکل یک ارائه شده است. بر این اساس بیش از ۹۰ درصد باکتریها دارای تشابهی بیشتر از ۵۰ درصد بودند. کل سویه‌های انتخابی در ۱۴ گروه، تقسیم بندی شدند. نتایج نشان داد که جدایه‌ها از نظر حساسیت و یا مقاومت به آنتی‌بیوتیکها و سطوح مختلف آن دارای تنوع (Diversity) می‌باشند. روش مقاومت به غلظتهای کم آنتی-بیوتیک یکی از روشهای بررسی وضعیت تاکسونومیک و تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف باکتریها می‌باشد. امروزه برای مطالعه تنوع ژنتیکی و وضعیت تاکسونومیک باکتریها، بررسی ژن 16S rRNA روشی مرسوم و معتبر محسوب شده و توسط پژوهشگران مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این رابطه در پژوهشی باکتریهای سودوموناس بومی خاکهای ایران توسط این روش بررسی شدند (۲). همچنین در بررسی دیگری تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست دریاچه اینچه برون توسط مطالعه ژن 16S rRNA انجام شد (۱). علی رغم رایج بودن روشهای مولکولی با این حال در مواردی روش بررسی حساسیت و مقاومت به آنتی بیوتیک در مورد ریزوبیوم‌ها نیز استفاده می‌شود. در یک بررسی مقاومت به آنتی بیوتیک سویه‌های ریزوبیوم جداسازی شده از گره ریزوبیومی باقلا نشان داد اکثریت جدایه‌ها به استرپتومایسین حساس و تقریبا همه جدایه‌ها

به غلظتهای مختلف نالیدیسیک اسید مقاوم بودند و این در حالی بود که فقط یک سویه به استرپتومایسین مقاوم بود (۱۶).

جدول ۳ – نتایج مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدایه‌های مختلف*

نوع آنتی‌بیوتیک ⟶		Spectinomycin					Nalidixic acid					Rifampicin					Kanamycin					Streptomycin				
ردیف	سویه	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰	۱۰	۲۰	۳۰	۴۰	۵۰
		mg.l^{-1}																								
1	F1	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
2	F3	R	R	R	S	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
3	F4	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S		-	-	-
4	F7	R	R	S	-	-	R	R	R	R	R	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	R	R	R	S	-
5	F9	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	R	R	R	S	-	S	-	-	-	-
6	F10	S	-	-	-	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-
7	F14	S	S	-	-	-	R	R	R	R	S	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
8	F15	S	S	-	-	-	R	R	R	R	S	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-
9	F16	S	S	-	-	-	R	R	S	-	-	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
10	F17	R	S	-	-	-	R	R	R	R	S	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-
11	F18	R	R	S	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
12	F19	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
13	F20	R	R	R	S	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	S	-	-	-
14	F21	S	S	-	-	-	R	R	R	R	S	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-
15	F22	R	R	R	S	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	R	R	R	R	R
16	F23	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
17	F26	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
18	F27	R	S	-	-		R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
19	F28	S	S	-	-	-	R	R	R	S	-	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
20	F29	R	R	S	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
21	F30	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	S	S	S	-	-	-	-
22	F31	R	R	R	S	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
23	F32	R	R	R	S	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	R	S	-	-	-
24	F34	R	R	S	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
25	F35	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-
26	F36	R	R	R	S	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	R	R	S	-	-	S	-	-	-	-
27	F37	R	R	R	S	-	R	R	R	S	-	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
28	F39	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	R	R	R	-	-	S	-	-	-	-
29	F40	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-
30	F41	R	R	R	S	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
31	F42	R	S	-	-	-	R	R	S	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	R	S	-	-	-
32	F43	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
33	F44	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	R	R	R	R	R	S	-	-	-	-
34	F45	R	S	-	-		R	R	R	R	S	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
35	F46	R	R	R	S	-	R	R	R	R	R	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	R	R	R	S	R
36	F49	R	R	S	-	-	R	R	R	R	S	S	S	-	-	-	R	R	S	-	-	S	-	-	-	-
37	F50	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-
38	F51	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	R	R	R	R	S
39	F52	R	S	-	-	-	R	S	-	-	-	S	S	-	-		S	-	-	-	-	S	-	-	-	-
40	F53	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	-	-	-	S	-	-	-	-	R	S	-	-	-
41	F54	R	S	-	-	-	R	R	-	-	-	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	R	S	-	-	-
42	F55	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	-	-	-	S	-	-	-	-	R	S	-	-	-

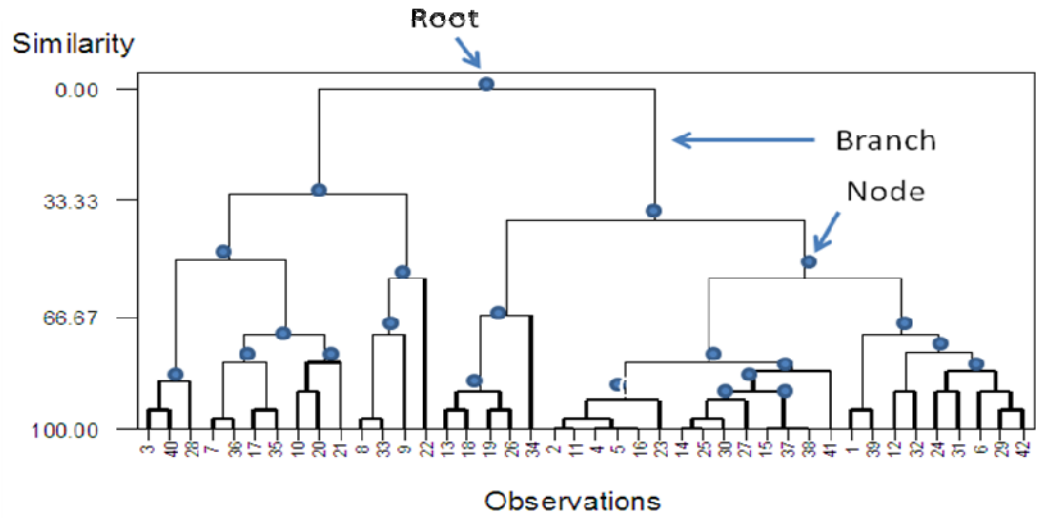
* S= Sensitive, R= Resistant, (-) = No growth

تنوع زیستی جدایه‌های *R. leguminosarum* bv. *viciae* جداسازی شده از مصر نیز بر اساس مطالعات مقاومت به آنتی بیوتیکها گزارش شده است (۱۴).

در منابع مختلف نگاههای متفاوتی به تحلیل نمودارهای فیلوژنی می‌شود. با این حال تفسیر این نمودارها نیاز به دقت دارند. در شکل یک دایره‌ها در محل اتصال اضلاع، به عنوان گره (Node) نامیده می‌شوند. گره واحد تاکسونومیک بوده و به عنوان والد موارد پایین‌تر در نظر گرفته می‌شود. . نگاهی به بالاترین دایره در شکل یک این مسئله را در مورد سویه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که

منشاء (Root) همه سویه‌ها یکی بوده، به طوری که در طول زمان دچار گوناگونی و تنوع و تفکیک سویه‌ای شده-اند. اضلاع عمودی به عنوان شاخه (Branch) نامیده می-شوند و رابط بین والد و گونه محسوب می‌شوند. بر اساس مقاومت و حساسیت به پنج نوع آنتی‌بیوتیک ذکر شده تنوع و تغییرات در سطح سویه کاملاً مشهود می‌باشد. از دلایل این تنوع می‌تواند پراکنش جغرافیایی مکانهای مورد نمونه-برداری باشد.

نتایج بررسی درجه گره‌بندی جدایه‌های مختلف بر اساس نتایج آزمون آلودگی گیاه در جدول چهار ارائه شده است.



شکل ۱- درخت فیلوژنی جدایه‌های انتخابی از لحاظ مقاومت به آنتی‌بیوتیکها

جدول ۴- درجه گره‌بندی جدایه‌های مختلف

ردیف	جدایه	گره‌بندی	جدایه	گره‌بندی	جدایه	گره‌بندی
۱.	F1	۲/۵	F22	۲/۵	F40	۲
۲.	F3	۲/۵	F23	۲/۵	F41	۱
۳.	F4	۲	F26	۱	F42	۱
۴.	F7	۱	F27	۱	F43	۴
۵.	F9	۲/۵	F28	۲/۵	F44	۴
۶.	F10	۱/۵	F29	۱	F45	۴
۷.	F14	۱	F30	۱	F46	۵
۸.	F15	۲	F31	۱	F49	۴
۹.	F16	۲/۵	F32	۱/۵	F50	۳
۱۰.	F17	۱	F34	۱	F51	۳
۱۱.	F18	۱	F35	۱/۵	F52	۴
۱۲.	F19	۱	F36	۱/۵	F53	۴
۱۳.	F20	۲/۵	F37	۱	F54	۳
۱۴.	F21	۱	F39	۲	F55	۳

همان طوری که جدول چهار نشان می‌دهد جدایه‌های مختلف دارای درجه‌بندی گره متفاوتی از یک تا ۵ بودند (سویه‌های کمتر از یک ارائه نشده است). بر اساس معیار درجه‌بندی گره ارائه شده در جدول یک، جدایه‌های دارای درجه بیشتر از دو به عنوان جدایه‌های انتخابی از نظر گره‌بندی برای ادامه پژوهشها در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج این مرحله ۱۹ جدایه که دارای درجه‌بندی گره بیشتر از دو بودند برای بررسی کارآیی تثبیت نیتروژن (S.E.) انتخاب شدند.

در جدول پنج نتایج مربوط به آزمون کارآیی تثبیت نیتروژن (S.E.) ارائه شده است.

جدول ۵- کارآیی تثبیت نیتروژن (S.E.) سویه‌های انتخابی

سویه	مقدار S.E.	کارایی	سویه	مقدار S.E.	کارایی
F1	۳۳	ضعیف	F23	۷۰	متوسط
F3	۱۳	ضعیف	F28	۵	ضعیف
F51	۵۶	متوسط	F16	۵۸	متوسط
F52	۱۵	ضعیف	F39	۷۵	خوب
F53	۳۱	ضعیف	F43	۱۶۵	خیلی‌خوب
F54	۱۱	ضعیف	F44	۵۳	متوسط
F55	۵	ضعیف	F45	۲۰	ضعیف
F20	۳۳	ضعیف	F46	۱۵۱	خیلی‌خوب
F50	۸۷	خوب	F49	۹۳	خوب
F22	۵	ضعیف	Nitrogen	-	-

بر اساس نتایج جدول پنج، دو جدایه F43 و F46 به عنوان سویه‌های خیلی خوب و سه جدایه F50، F49 و F39 به عنوان جدایه خوب از نظر کارآیی همزیستی تثبیت نیتروژن انتخاب شدند. این سویه‌ها برای پژوهشهای تکمیلی، مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

گزارش شده است که از ۴۹ جدایه ریزوبیوم جداسازی شده همزیست با باقلا در اتیوپی مرکزی، شش درصد جدایه‌ها دارای کارآیی خیلی مؤثر(S.E.>۱۰۰) و ۸۸ درصد نیز مؤثر بودند (۵).

در بررسی دیگری در اتیوپی از ۳۸ جدایه ریزوبیوم جداسازی شده از گره ریزوبیومی باقلا در کشت درون شن، ۷۴ درصد دارای کارآیی همزیستی مؤثر (خوب) و ۵ جدایه خیلی مؤثر (خیلی خوب) بودند (۱۶).

همان طوری که نتایج نشان داد S.E. برخی سویه‌ها خوب و خیلی خوب بود. این موضوع به علت تثبیت نیتروژن قابل توجه جدایه‌ها بود. گزارشات مختلف نیز نشان می دهد بیشترین مقدار تثبیت نیتروژن در بین حبوبات مهم مربوط به باقلااست. برخی از این گزارشات در جدول شش خلاصه شده است. در این جدول مقدار نیتروژن مشتق شده از اتمسفر در بررسیهای آزمایشگاهی و مزارع کشاورزان نشان داده شده است. بیشترین درصد نیتروژن تأمین شده از طریق تثبیت همزیستی در هر دو مورد مربوط به باقلا می‌باشد (۱۵).

بنابراین به نظر می‌رسد برای تأمین پروتئین جامعه بهتر است به این محصول و رابطه همزیستی آن با باکتری ریزوبیوم توجه بیشتری شود. همچنین کشت این گیاه به

عنوان یک منبع غنی از نیتروژن به صورت برگرداندن آن به زمین و مصرف به صورت کود سبز برای تقویت خاکهای ایران که عمدتاً دارای کمبود مواد آلی و نیتروژن هستند مورد توجه بیشتری قرار گیرد. گزارش شده است که در غرب واشنگتن و شمال آیداهوی آمریکا که از مناطق کشت گندم هستند، باقلا به عنوان تناوب در کشت گندم به جای نخود، عدس و نخودفرنگی معرفی شده است. در این گزارش اشاره شده است که باقلا به علت توان تثبیت بالای نیتروژن به عنوان کشت دوم در تناوب با گندم به عنوان کود سبز برای تقویت زمین به خاک برگردانده شود (۱۰).

جدول ۶- درصد نیتروژن مشتق شده از تثبیت در حبوبات مختلف (۱۵)

نوع حبوبات	در آزمایشات	در مزارع کشاورزان
لوبیا	۴۰	۳۶
نخود، عدس، ماش، نخود فرنگی، لوبیا چشم بلبلی	۶۳	۶۵
سویا و بادام زمینی	۶۸	۵۸
باقلا	۷۵	۶۸

با این حال با توجه به اینکه ممکن است در همه مناطق مورد نظر، باکتری ریزوبیوم همزیست با باقلا در خاک مرزعه مورد کشت وجود نداشته باشد و یا اینکه باکتری دارای کارآیی مناسب و همچنین توان تثبیت نیتروژن کافی را نداشته باشد لذا ضرورت تلقیح مزارع زیر کشت این محصول با سویه‌های برتر که از بین تعداد زیادی باکتری بومی غربالگری شده‌اند روشن است. گزارش شده است مهم ترین عامل در به حداکثر رساندن بهره‌وری لگومهای دانه‌ای و مرتعی تطابق گیاه میزبان و ریزوبیوم همزیست است (۱۹). بنابراین سویه‌های *ریزوبیوم* به دست آمده از این پژوهش می‌توانند در ادامه بررسیها به عنوان مایه تلقیح برای باقلا مورد استفاده قرار گیرند. بدیهی است موفقیت نهایی در این زمینه موجب کاهش مصرف کودهای شیمیایی نیتروژنی، تولید محصول سالم و حفظ منابع خاک و آب و در نتیجه سلامت گیاه، دام و در نهایت انسان خواهد شد. بی‌شک این مسئله گامی در جهت تولید محصول ارگانیک و در نتیجه توسعه کشاورزی پایدار خواهد بود.

نتیجه‌گیری

تعداد ۵ جدایه برتر *R. Leguminosarum* bv.*viciae* از نظر گره‌بندی و کارآیی همزیستی تثبیت نیتروژن با S.E. خوب و خیلی خوب که دارای پتانسیل مناسبی برای ادامه بررسیها در جهت ارائه مایه تلقیح ریزوبیوم برای گیاه باقلا بودند انتخاب شدند. تمام باکتریهای تأیید شده در بانک ریزجانداران مفید خاک زی مؤسسه تحقیقات خاک و آب نگهداری شدند.

منابع

۱. زرپرور پ. آموزگار م.ع. و فلاحیان م.ر. ۱۳۹۳. بررسی تنوع زیستی باکتریهای نمک دوست نسبی و تحمل کننده نمک قابل کشت در تالاب پرشور اینچه برون. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی(مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۷ ، شماره ۱، ص۵۶-۴۴.

۲. کیان مهر ا.س. و مهدی زاده دهوسطی ر. ۱۳۹۳. مطالعه فیلوژنتیکی باکتری سودوموناس پوتیدا تولید کننده پرولین دهیدروژناز و آنالیز بیوانفورماتیکی آنزیم جداسازی شده. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی(مجله زیست شناسی ایران). جلد ۲۷ ، شماره ۲، ص ۲۹۵-۲۸۵.

3. Amanuel, G., Kuhne, R.F. Tanner ,D.G. and Vlek, P.L.G. 2000. Biological nitrogen fixation in fababean (*Vicia faba* L.) in the Ethiopian highlands as affected by P fertilization and inoculation. Biology and Fertility of Soils, 32: 353-359.

4. Anonymous. 2013. FAO Statistics. http://data.fao.org/.

5. Argaw A. 2012. Characterization of symbiotic effectiveness of Rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba* L.) isolated from central Ethiopia. Research Journal of Microbiology, 7(6):280-296.

6. Beck, D.P., Materon, L.A. and Afandi, F. 1993. Practical *Rhizobium*- legume technology manual. ICARDA. Technical Manual No. 19.

7. Beck, D.P., Wery, J., Saxena, M.C. and Ayadi, A. 1991. Dinitrogen fixation and nitrogen balance in cool-season food legumes. Agronomy Journal, 83: 341-343.

8. Corbin, EJ., Brockwell, j. and Gault, R.R. 1977. Nodulation studies on chickpea (*Cicer arietinum*). Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry, 17, 126-134.

9. Dixon, R.O.D., and Wheeler, C.T. 1986. Nitrogen Fixation in Plants. Chapman and Hall, New York.

10. Elise Mwengi, J. 2011. Faba bean growth response to soil temperature and nitrogen. A M.Sc. thesis submitted in soil science, Washington state University, Department of Crop and Soil Sciences. 60 pages.

11. Elkan, G.H. (Ed.). 1987. Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. Marcel Dekker, Inc., New York. 440 p.

12. Elsheikh, E.A.E. and Elzidany, A.A. 1997. Effects of *Rhizobium* inoculation, organic and chemical fertilizers on yield and physical properties of faba bean seeds. Plant foods for Human Nutrition, 51: 137-144.

13. Garrity, G.M., Bell, J.A., and Lilburn. T. 2005. Class III.*Gammaproteobacteria* class. nov. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, vol. 2 (*The Proteobacteria*), part B (*The Gammaproteobacteria*), p. 1. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer.

14. Hassan M.M., Fahmi, A.I., Eissa, R.A. and Nagaty, H.H. 2015. Diversity of Rhizobia nodulating faba bean (*Vicia faba*) growing in Egypt. Microbial & Biochemical Technology, 7(3): 152-159.

15. Herridge D.F., Peoples, M.B., Robert, D.F. and Boddey, M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil, 311:1–18

16. Legesse, S, Assefa, F. 2014. Symbiotic and phenotypic characteristics of Rhizobia nodulating fababean *(Vicia faba)* from Tahtay Koraro, northwestern zone of Tigray Regional state, Ethiopia. International Journal of Technology Enhancements and Emerging Research, 2, Issue 11: 15-23.

17. Rodelas, B. 1999. Response of faba bean (*Vicia faba* L.) to combined inoculation with *Azotobacter* and *Rhizobium Legominosarum* bv. *viceae*. Applied Soil Ecology, 12: 51-59.

18. Rweyemamu, C.L. and Kondra, Z.P. 1989. Nitrogen fixation in faba bean *(Vicia faba L.)* and its economic benefit in central Alberta. Canada. Fabis news Letter (ICARDA). 25: 14-18.

19. Slattery J. and Pearce, D. 2002. Development of elite inoculants *Rhizobium* strains in southeastern Australia. In: Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam.D. Herridge (Ed.), ACIAR Proceedings 109e. pp: 86-94.

20. Somasegaran, P. and Hoben, H.J. 1994. Handbook for Rhizobia, methods in legume-*Rhizobium* Technology. Springier-verlag. New York .

21. Sorwli, F.K. and Mytton, L.R. 1986. The nitrogen fixing potential of vicia faba rhizobia (*R. leguminosarum*) form different agricultural locations. Plant and Soil, 92: 249-254.

22. Stajkovic, O., Elisabeth, S., Meyer, De, Milicic, B., Willems, A. and Delic, D.. 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Botanica Serbica, 33(1); 107-114.

23. Steven- son, F.J. 1982. Nitrogen in agricultural soils. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin U.S.A., 940 p.

24. Xue K.W., Zou L. Penttinen, P. Wang, K., Heng N.N. Zhang X.P Xua, C.W., Zoua, L., Penttinenb, P., Wanga, K., Zhanga, Q. 2015. Symbiotic effectiveness and phylogeny of Rhizobia isolated from fababean (*Vicia faba* L.) in Sichuan hilly areas, China. Systematic and Applied Microbiology, 38(7): 515-523.

25. Zapata,F., Danso, S.K.A., Hardarson, G. and Fried, M. 1987. Nitrogen fixation and translocation in field growth faba bean. Agronomy Journal, 79: 505-509.

Evaluation of some physiological characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* native to soils of Iran

Khosravi H.

Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, I.R. of Iran.

Abstract

Nitrogen is one of the most important and most frequently used elements for plant growth. The need of plants to nitrogen supplied through chemical fertilizers that causes many environmental problems. Biological nitrogen fixation is one of the exceptional natural phenomena that accomplished by some of bacteria including Rhizobia. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is the specific symbiotic nitrogen fixer of faba bean. Plant infection test is one of the inexpensive and reliable methods for detection of *Rhizobium*. In this research the sampling of *Rhizobium* root nodules of faba bean in 50% flowering stage in fields of farmers from Khouzestan, Lorestan, Golestan, Mazandaran and Gilan provinces was accomplished. A total, 168 *Rhizobium* root nodules were collected from these areas. After isolation of bacteria from nodules, various morphological and physiological tests were performed on the isolates. Accordingly, 101 isolates were purified and detected. Plant infection test revealed that 42 isolates are able to form root nodules on fababean. The symbiotic effectiveness of selected isolates was 5-165. The main Conclusion of this research was achieving to some super strains of native Rhizobia in terms of nodulation and symbiotic effectiveness for future investigations for introducing Rhizobium inoculums for fababean.

Key words: Nitrogen, symbiotic, fixation.