

# بررسی برخی از خصوصیات مرفولوژیک و فیزیولوژیک *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

## در مناطق زیر کشت باقلا در ایران

هوشنگ خسروی

مربی پژوهشی موسسه تحقیقات خاک و آب

### مقدمه

باکتری همزیست با گیاه باقلا *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* می‌باشد. این باکتری، میله ای، هوازی، متحرک و دارای دو تا شش تازک پیرامونی است. دما و PH بهینه برای رشد آن به ترتیب ۲۵ تا ۳۰ درجه و شش تا هفت است. کلنی های آن دایره ای، محدب، برآمده، لعابی و نیمه مات هستند که پس از پنج روز رشد در محیط کشت Yeast Manitol Agar (YMA) قطر آنها به دو تا چهار میلی متر می رسد (۲). سوبه های برتر این باکتری در گره های فعال موجود در ریشه به شکل باکتروئید بوده و می توانند مقادیر قابل توجهی نیتروژن ملکولی هوا را تثبیت کنند.

### مواد و روش ها

از استانهای گلستان، مازندران، خوزستان و لرستان به علت سطح زیرکشت قابل توجه و استان گیلان به علت کشت های پراکنده متعدد در موقع ۵۰ درصد گلدهی به فاصله حداقل هر پنج کیلومتر از مزارع باقلا نمونه برداری گره ریشه صورت گرفت. ترکیب محیط کشت مورد استفاده جهت رشد ریزوبیوم (YMA) عبارت است از: دی پتاسیم 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 که PH آن روی هفت تنظیم گردید. پلیت های تلقیح شده در اینکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. با توجه به نوع سوبه باکتری، بین ۲۴ تا ۷۲ ساعت کلنی ها ظاهر شدند(۱). شکل میکروسکوپی، تحرک، آزمایش گرم و شکل کلنی جدایه های مختلف

تثبیت نیتروژن در گلدانهای چهار کیلوگرمی حاوی ماسه دریایی استریل انجام شد. طرح به صورت بلوکهای کامل تصادفی با ۲۸ جدایه باکتری، دو تیمار نیتروژنی ۳۵ و ۷۰ میلی گرم در کیلوگرم و یک تیمار شاهد تلقیح نشده با چهار تکرار اجرا شد. هر بذر باقلا (رقم برکت) با یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر با جمعیت  $10^8$  تلقیح شد. پس از ۲/۵ ماه شاخص های وزن خشک اندام هوایی، مقدار جذب نیتروژن اندام هوایی و درجه گره بندی اندازه گیری شد. داده ها مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

بررسی شد. توان سنتز اکسین به روش سالکوفسکی و تفکیک جدایه ها با استفاده از روش مقاومت به آنتی بیوتیک مورد بررسی قرار گرفت. در روش اخیر، شش آنتی بیوتیک استرپتومایسین، اسپکتینومایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل، ریفامپیسین و نالیدیکسیک اسید با مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی گرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از روش لیوفیلیزاسیون (فریز درایینگ) سه تکرار آمپول لیوفیلیزه از جدایه ها تهیه و در بانک میکروارگانیسم های مفید موسسه تحقیقات خاک و آب نگهداری شد (۳). آزمایش کارایی

### نتایج

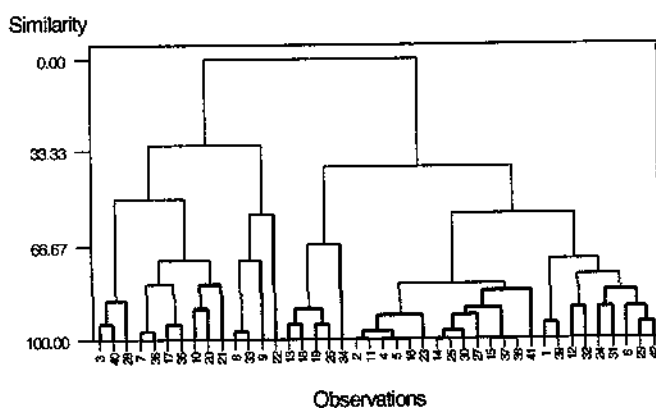
نتایج تعداد نمونه برداری، جداسازی و شناسایی ایزوله های مختلف در جدول یک خلاصه شده است.

جدول (۱) تعداد نمونه، جدایه های خالص شده، ایجاد کننده گره و انتخابی در آزمون تثبیت نیتروژن به تفکیک استانهای مختلف

استان	تعداد نمونه	تعداد ایزوله خالص شده	تعداد ایزوله های ایجاد کننده گره	تعداد ایزوله انتخاب شده برای مقایسه کارایی تثبیت نیتروژن
گلستان	۲۸	۲۷	۱۶	۱۶
مازندران	۴۸	۴۲	۲۵	۸
گیلان	۳۴	۲۵	۱۵	۶
لرستان	۱۸	۱۶	۷	۴
خوزستان	۴۰	۴۰	۳۸	۴
جمع	۱۶۸	۱۵۰	۱۰۱	۳۸

۹۰ درصد باکتری ها دارای تشابهی بیشتر از ۵۰ درصد بودند. کل باکتریهای انتخابی در ۱۴ گروه، تقسیم بندی شدند میزان تشابه باکتریها ارتباط چندانی با فاصله جغرافیایی آنها از همدیگر نشان نداد. در شکل یک دندوگرام جدایه های مختلف مشاهده می شود.

کلیه جدایه های انتخابی دارای توان ایجاد گره، میله ای، هوایی، متحرک و دارای واکنش گرم منفی بوده و کلنی های آنها دایره ای، محدب، برآمده، لعابی، نیمه مات بودند و قطر کلنی های آنها پس از پنج روز به دو تا چهار میلی متر رسید. تولید اکسین در هیچ یک از نمونه ها مشاهده نشد. براساس نتایج مقاومت به آنتی بیوتیک، بیش از



شکل (۱) دندوگرام جدایه های انتخابی از لحاظ مقاومت به آنتی بیوتیک

نیتروژن اندام هوایی با شاهد اختلاف معنی داری از نظر آماری مشاهده نشد.

وضعیت گره بندی باقلا در اثر تلقیح با جدایه های مختلف در آزمون گلخانه ای بین درجه ۰/۵ تا ۵ متغیر بود. بین تیمارهای مختلف تلقیحی و شاهد از نظر اثر بر شاخص های وزن خشک و جذب

منابع مورد استفاده

2- Holt, N.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams (Eds). 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins. USA.

1- Beck, D.P. L.A. Materon and F. Afandi. 1993. Practical Rhizobium- Legume Technology Manual. ICARDA, Technical Manual No. 19.