

**بررسی و شناسایی سویه‌های بومی**  
***Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli***  
**در برخی از خاکهای ایران و تعیین میزان کارائی آنها در مزرعه**  
**میترا افشاری، اشرف‌السادات نوحی، اسلام مجیدی هروان<sup>۱</sup>**

گیاهان جهت رشد و نمو بهتر به ازت نیاز دارند. در کشاورزی جهت تأمین این نیاز به مصرف کودهای ازته اقدام می‌شود که در نتیجه زیان‌هایی از قبیل آلودگی محیط‌زیست را به دنبال خواهد داشت. گیاهان خانواده لگومینوز که لوبیا نیز از آن جمله است، قادرند بطور طبیعی با باکتریهای جنس ریزوبیوم همزیستی داشته و از این راه ازت تثبیت شده بوسیله آنها را مورد استفاده قرار دهند. این باکتریها بطور معمول در خاک‌های زیر کشت لوبیا در جمعیت‌های نسبتاً مناسب وجود دارند که در صورت کاشت گیاه میزبان و مساعد بودن تمامی شرایط جهت همزیستی، عمل تثبیت ازت انجام می‌گیرد. جهت استفاده بهینه از این همزیستی بهتر است که این باکتریها جمع‌آوری، شناسایی و بهترین سویه‌ها تعیین گردند و در شرایط مناسب نگهداری شوند تا در مواقع ضروری بتوان آنها را مورد استفاده قرار داد.

به منظور شناسایی سویه‌های بومی باکتریهای جنس ریزوبیوم که با لوبیا همزیست هستند، ابتدا از مناطقی خصوصاً قطبهای مهم کشت لوبیا، گیاهان سالم و شاداب لوبیا که در مرحله گلدهی بودند، انتخاب و ریشه آنها بطور کامل از خاک خارج شد. پس از حذف خاک اطراف ریشه و شستشوی آن، از گرهکهای موجود روی ریشه نمونه‌برداری انجام گردید. سپس این نمونه‌ها در شرایط مناسب به آزمایشگاه انتقال یافت. در آزمایشگاه پس از آماده‌سازی محیط‌های کشت اختصاصی برای جداسازی باکتریهای ریزوبیوم و نیز تهیه لوازم، مواد و محلول‌های مورد نیاز، اقدامات لازم برای جداسازی استریلیزاسیون سطحی گرهک‌ها و کشت روی محیط‌های غذایی مختلف و سپس خالص‌سازی و شناسایی باکتریهای همزیست انجام شد. پس از خالص کردن ایزوله‌ها با استفاده از آزمایش‌های تشخیصی مختلف و مناسب مثل انواع رنگ‌آمیزیها، تعیین حرکت باکتری، آزمایشات مختلف بیوشیمیایی شامل استفاده از کربوهیدرات‌های مختلف، قابلیت جذب رنگ قرمز کنگو، واکنش در محیط ل تیموس میلک، رشد در غلظت‌های مختلف نمک و ... و نیز تعیین مقاومت ایزوله‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های متفاوت، آزمون تعیین ویژگی میزبانی در لوله آزمایش و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی باکتری توسط کروماتوگرافی

<sup>۱</sup> به ترتیب عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهران، استاد دانشکده علوم - دانشگاه تهران، عضو هیأت علمی و رئیس مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال کرچ

گازی. ایزوله‌های برتر انتخاب شدند و سپس با استفاده از کرتهای خرد شده در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در مزرعه مورد ارزیابی قرار گرفتند.

پس از کاشت گیاه لوبیا در مزرعه و تلقیح باکتری به آن و انجام مراقبت‌های ویژه، به هنگام شروع گلدهی از ریشه گیاهان لوبیا نمونه‌برداری انجام شد و ریشه‌ها در داخل محفظه مناسب جهت انجام آزمایش تعیین فعالیت آنزیمی به روش احیای استیلین به اتیلین و اندازه‌گیری آن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی قرار داده شد و پس از تزریق گاز استیلین به آن و قرار دادن در شرایط مناسب، فعالیت آنزیم نیتروژناز در باکتریها تعیین گردید. پس از انجام این آزمایش، وضعیت گره‌بندی شامل تعداد و محل ایجاد گره‌کها و نیز رنگ داخل آنها مورد بررسی قرار گرفت و وزن تر گره‌کها نیز محاسبه شد. سپس با خشک کردن گره‌کها در حرارت  $70^{\circ}\text{C}$ ، وزن خشک گره‌کها نیز مورد مطالعه قرار گرفت. قسمت هوایی این گیاهان برای اندازه‌گیری سطح برگ که شاخصی از رشد گیاه است مورد استفاده قرار گرفت و از دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ برای این منظور استفاده شد.

نتایج بدست آمده از آزمایشات مختلف نشان داد که باکتریهای ریزوبیوم همزیست با لوبیا نسبتاً تند رشد بوده و بعد از ۲۲-۴۸ ساعت روی محیط کشت با رشد مناسب ظاهر شدند و رنگ قرمز کنگو را جذب نکرده و یا به مقدار ضعیفی جذب نموده بودند. آزمون‌های بیوشیمیایی در شناسایی این باکتریها ارزش تشخیصی قوی نداشته و برای تعیین سویه‌ها باید از تعیین ویژگی میزبانی و نیز مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده نمود.

در این بررسی علاوه بر ایزوله‌های بومی از چند سویه غیربومی نیز بعنوان شاهد و مقایسه استفاده شد که در بعضی مراحل مانند آزمون تعیین ویژگی میزبانی، ایزوله‌های بومی نتایج بهتری از خود نشان دادند که به سازگاری بهتر این ایزوله‌ها به ارقام لوبیای ایرانی نسبت داده شد که توانسته‌اند همزیستی بهتری را برقرار کنند.

اگرچه در انتخاب مزرعه سعی بر این بود زمینی در نظر گرفته شود که کمترین تعداد باکتری ریزوبیوم را داشته باشد، اما تیمارهای شاهد بدون تلقیح باکتری نیز در این آزمایشات دارای گره‌بندی مناسب بودند.

با مطالعه نتایج بدست آمده از آزمایشات مختلف مشاهده شد که علیرغم اینکه بعضی از این ایزوله‌ها مانند نمونه‌های شماره ۵ و ۸ در شرایط مزرعه‌ای از فعالیت خوبی برخوردار بودند و بر روی بعضی از صفات همانند رشد گیاه و افزایش سطح برگ و نیز فعالیت آنزیمی باکتری اثرات مثبت و فزاینده‌ای داشته‌اند، با این حال سویه‌های بومی درون زمین که در تیمار شاهد خودنمایی می‌کنند نیز از فعالیت خوبی برخوردارند. بنابراین بررسی و مطالعه واکنش‌های متقابل و وجود رقابت بین سویه‌های معرفی شده به خاک و سویه‌های بومی داخل آن الزامی به نظر می‌رسد.