مطالعه توان همزیستی و حل فسفات باکتریهای *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

مریم غزائیان[1]، حسینعلی علیخانی[3]، امیر لکزیان[2]، غلامحسین حق نیا[4]

چکیده

کارآیی همزیستی و توان حل فسفات ۴۵ جدایه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه جدا شده از دو منطقه گرگان و نیشابور در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که هیچکدام از جدایه‌ها در محیط کشت جامد توانایی حل فسفات معدنی را نداشتند اما در محیط کشت مایع حل فسفات معدنی در بین جدایه‌ها مشاهده شد. کلیه جدایه‌های ریزوبیوم توانایی حل فسفات آلی را نشان دادند. نتایج حاصله از کارآیی همزیستی نشان داد که جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزارم از نظر همزیستی تفاوت معنی داری داشتند. کارآیی همزیستی بین ۵ تا ۵۰۰ درصد در بین جدایه‌های گرگان و نیشابور مشاهده شد. جدایه‌های R65G و R59G از منطقه گرگان و R30N از منطقه نیشابور بالاترین کارآیی همزیستی را نشان دادند. با توجه به نتایج توان حل فسفات معدنی و آلی و همچنین با در نظر گرفتن کارآیی همزیستی،جدایه‌های R65G، R30N و R59G بعنوان جدایه‌های برتر در این آزمایش انتخاب شدند.

کلمات کلیدی: ریزوبیوم لگومینوزارم، حلالیت فسفات، راندمان همزیستی.

مقدمه

نیتروژن بعنوان عنصر اصلی در بیومولکولهایی نظیر اسیدهای نوکلئیک، مولکولهای آدنوزین تری فسفات(ATP)، نیکوتین آمید دی نوکلئوتید(NAD)، پروتئین‌ها و در بسیاری از ترکیبات دیگر وجود دارد. اگر چه منبع مهم ذخیره نیتروژن در لیتوسفر (۲×۱۰^{۱۷} تن) می‌باشد اما بدلیل آزاد شدن بسیار کند و آهسته این عنصر از مواد مادری و همچنین غلظت پایین آن در مواد مادری، این منبع مهم نقش اساسی را در تغذیه گیاهان ایفا نمی کند (۱۱). دومین منبع ذخیره‌ای نیتروژن ، اتمسفر (۱۸×۱۰^{۱۵} تن) می‌باشد که حدود ۷٪ کل نیتروژن را شامل می‌شود. این منبع عظیم نیتروژن تقریبا در دسترس تمامی موجودات زنده وجود دارد ولی این منبع فقط برای تعداد محدودی از پروکاریوتها که از آنها تحت عنوان دیازوتروفها یاد می‌شود قابل استفاده است. توانایی تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط پروکاریوتها مرهون وجود آنزیم بسیار پیچیده و مهمی به نام نیتروژناز می‌باشد (۱۱).

در حال حاضر بخشی از نیاز نیتروژنی جمعیت ۶ میلیارد نفری کره زمین از طریق کودهای شیمیایی تامین می‌شود که متاسفانه اثرات سوء ناشی از مصرف کودهای شیمیایی بر خاک، محیط و آبهای زیرزمینی و همچنین هزینه بسیار بالای تولید آنها مشکلات متعددی را بوجود آورده است. بنابر این مطالعه و بررسی توان تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط پروکاریوتها از مدتها قبل مورد علاقه دانشمندان قرار گرفته و

۱، ۳، ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و اعضاء هیئت علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲ – عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی تهران ، کرج.

ادعا شده است که تثبیت بیولوژیکی نیتروژن می‌تواند یکی از منابع اصلی تامین نیازهای نیتروژنی بشر باشد و همچنین مشکلات ناشی از مصرف کودهای شیمیایی را نیز به همراه نخواهد داشت. تثبیت بیولوژیکی نیتروژن که معمولا یکی از اصلی ترین روش های جبران نیتروژن از دست رفته در بیلان نیتروژن می‌باشد به سه روش آزادزی، همیاری و همزیستی صورت می‌گیرد. تثبیت به روش همزیستی که عمدتاً توسط باکتریهای جنس ریزوبیوم و گیاهان جنس بقولات صورت می‌گیرد از اهمیت ویژه ای بر خوردار است و میزان تثبیت بیولوژیکی نیتروژن به روش همزیستی رادرسطح جهان سالیانه ۹۰ میلیون تن تعیین کرده اند (۱۱).

از طرف دیگر، فسفر مانند نیتروژن یکی از ضروری ترین و پر مصرف ترین عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان می‌باشد. از آن جایی که فسفر در ساختار بسیاری از بیومولکولها نظیر اسید دزکسی ریبونوکلئیک، فسفولیپیدها و آدنوزین تری فسفات و همچنین در فرآیند ذخیره و انتقال انرژی در گیاهان دخالت دارد لذا این عنصر نقش بسیار مهمی برای تمامی اشکال حیات ایفا می‌کند. میزان کل فسفر در خاکها بسیار متغیر است و از گستره ۲۰۰ کیلو گرم در هکتار در خاکهای شنی تا ۲۰۰۰ کیلو گرم در خاکهای حاصله از سنگهای بازی تغییر می‌کند. میزان فسفر در محلول خاک معمولا بطور طبیعی یک میلی گرم در کیلو گرم و گاهی حتی کمتر از آن نیز می‌باشد که نصف این مقدار ممکن است از تجزیه مواد آلی یا تجزیه سلولهای مرده حاصل شده باشد. کمبود فسفر می‌تواند تاثیر بسیار زیادی در رشد و نمو گیاه داشته باشد. هیدرولیز فسفاتهای آلی که توسط آنزیم فسفاتاز صورت می‌گیرد قابلیت جذب این عنصر حیاتی را افزایش می‌دهد. گزارشات زیادی وجود دارد که منشاء آنزیم‌های فسفاتاز را میکروبی می‌دانند (۶ و ۱۲) و نقش باکتریهایی نظیر ساشیا، باسیلوس ها، سودوموناس‌ها و ریزوبیومها در تولید آنزیم فسفاتاز اثبات شده است (۱ و ۵). بنابر این باکتریهای ریزوبیوم یک نقش دو گانه بسیار مهم در تامین دو عنصر حیاتی، نیتروژن و فسفر ایفا می‌کنند.

هدف از این مطالعه بررسی توان کارآیی تثبیت نیتروژن و مطالعه توانایی حل فسفات معدنی و آلی توسط جدایه‌های بومی ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه از دو منطقه گرگان و نیشابور بوده است.

مواد و روشها

جمع آوری گره‌ها و جداسازی باکتریهای ریزوبیوم

تعداد ۳۵۰ گره از ریشه‌های گیاهان باقلا از مزارع زیر کشت این گیاه در دو منطقه نیشابور و گرگان جمع آوری شدند. سطح ۱۰۵ گره (از هر دو منطقه) با الکل اتیلیک ۹۶ درجه به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۴-۳ دقیقه ضدعفونی شدند. بمنظور حذف اثرات باقیمانده هیپوکلریت سدیم، گره‌ها ۸ مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس هرگره به درون یک لوله پلاستیکی درب دار (لوله اپندورف) حاوی ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل منتقل و توسط یک میله شیشه‌ای استریل کاملاً له شدند. از هر سوسپانسیون گره یک لوپ بر روی محیط کشت YMA[1] حاوی معرف کنگورد با روش خطی کشت داده شد. پس از رشد باکتریها به مدت ۴ روز در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد، یک کلنی مشخص باکتریهای ریزوبیوم لگومینوزارم که معمولا حالت لعابی و بیرنگ دارند، انتخاب گردید و سپس کشت خالص باکتری از هر یک از نمونه‌ها تهیه شد. به منظور نگهداری طولانی مدت، باکترهایی خالص شده برروی سطح شیبدار حاوی محیط YMA و کربنات کلسیم (۳ گرم در لیتر) داخل لوله آزمایش درپوش دار کشت داده شدند پس از رشد کافی باکتری در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد، لوله‌های تهیه شده برای هر باکتری، در یخچال و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

1- Yeast Manitol Agar

آزمون تلقیح گیاه میزبان

آزمون تلقیح گیاه میزبان با ۹۹ سویه جدا شده باکتریهای ریزوبیوم بمنظور تایید فرآیند خالص سازی انجام شد. برای هر کدام از جدایه‌های جدا شده تعداد سه ارلن مایر ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۷۵ میلی لیتر محلول غذایی فاقد ازت (۱۳) با آگار ۱ درصد تهیه شد. پس از استریل کردن محیطهای کشت بذور جوانه دار شده باقلا به درون ارلن منتقل و با یک میلی لیتر از سوسپانسیون هر یک از سویه های جدا شده تلقیح شدند. در طی دوره رشد گیاه، شدت روشنایی ۱۰۰۰۰ لوکس شمع به مدت۱۴ ساعت، دمای روزانه و شبانه به ترتیب ۲۶ و ۱۸ درجه سانتیگراد انتخاب شد (۱۳).

توان حل فسفات معدنی و آلی جدایه‌های ریزوبیوم در محیط کشت جامد

برای ارزیابی توان حل فسفات معدنی سویه‌های ریزوبیومی از ۴ محیط کشت YMA، YGA[1]، YMGA[2]، و محیط (SP) با pH تنظیم شده (۷/۲) استفاده گردید. YMA رایج ترین محیط کشت اختصاصی برای ریزوبیومها است که در این تحقیق منبع فسفر و پتاسیم (K_2HPO_4) با یک منبع فسفاتی نامحلول تری کلسیم فسفات ($Ca_3(PO4)_2$) به مقدار ۲/۵ گرم در لیتر و منبع پتاسیم بصورت کلرور پتاسیم (KCl) به مقدار ۰/۱ گرم در لیتر، جایگزین گردید. منبع کربن چهار محیط کشت به ترتیب مانیتول، گلوکز و ترکیب این دو (۵۰ درصد گلوکز + ۵۰ درصد مانیتول) و گلوکز بود. محیط‌های کشت استریل در هر ظرف به ۴ قسمت مساوی علامت گذاری شد و هر قسمت با ۵ میکرولیتر سوسپانسیون هر یک از سویه‌ها در۴ تکرار تلقیح گردید. ظروف پتری در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند و پس از مدت ۱۰ و ۳۰ روز قطر کلنی‌ها و قطر هاله‌های اطراف آنها در هر تکرار اندازه گیری و میانگین چهار تکرار برای هر سویه تعیین گردید.

1- Yeast Glucose Agar
2- Yeast Manitol Glucose Agar

برای آزمون فسفر آلی از محیط کشت IHP-Sperber (۱۱) با pH تنظیم شده روی ۷/۲ استفاده شد. منبع فسفر آلی در این محیط کشت، اینوزیتول هگزافسفات به مقدار ۲/۵ گرم در لیتر به جای $Ca_3(PO_4)_2$ انتخاب شد.

توان حل فسفات معدنی جدایه‌های ریزوبیوم در محیط کشت مایع

تعداد ۱۰ جدایه از بین جدایه‌های فوق انتخاب و در ۱۵ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی فسفر مایع بمدت سه روز در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد با سه تکرار کشت شدند. سوسپانسیون باکتریهای رشد یافته در درون لوله‌های آزمایش با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. میزان فسفر در سوسپانسیون صاف شده باکتری به کمک اسپکتروفتومتر در طول موج ۸۸۲ نانومتر تعیین شد.

مطالعه کارآیی همزیستی

بررسی کارآیی همزیستی ۴۵ سویه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه با گیاهان باقلا واریته برکت در ظروف کشت معروف به لئوناردو جار انجام شد (۱۳). این آزمون در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی به صورت فاکتوریل شامل ۴۵ سویه باکتری، یک تیمار نیتروژنی (۷۰ میلی گرم نیتروژن در لیتر) و تیمار شاهد (بدون تلقیح و بدون نیتروژن) با ۴ تکرار انجام گرفت.

در این آزمایش، از مخلوط مساوی شن سفید با قطر ۴-۲ میلی متر و پرلیت برای تهیه بستر کشت استفاده شد. ذرات رس، سیلت ریز، مواد آلی با الک و شستشو جدا شدند. پوشش‌های کربناتی شن نیز بکمک محلول اسید کلریدریک ۲ نرمال شستشو و حذف شدند. فتیله‌های استفاده شده در تمام اجزاء جارها با محلول هیپوکلریت سدیم ضدعفونی و تمامی جارها در اتوکلاو استریل شدند. بذور جوانه دار شده باقلا در هنگام کاشت با یک میلی لیتر مایه تلقیح از هر یک

سویه‌های باکتری تلقیح شدند. شرایط نگهداری گیاهان مشابه آزمون تلقیح بود. پس از سه ماه، وزن خشک اندام هوایی اندازه گیری و کارآیی سیستم همزیستی برای سویه‌های مختلف با استفاده از رابطه زیر تعیین گردید:

$$SE= (w_i-w_u)/(w_n-w_u) \times 100$$

SE = کارآیی سیستم همزیستی در هر سویه

W_i = وزن خشک اندام هوایی گیاه تلقیح شده با سویه ریزوبیومی

W_u = وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار شاهد

W_n = وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار کود نیتروژن

نتایج وبحث

در اولین مرحله تعداد ۱۰۵ باکتریهای ریزوبیوم از گره‌ها جدا و خالص سازی شدند. در پایان این بخش از آزمایش، کلنی‌های ۶ جدایه که مشکوک به آلودگی بودند از آزمایش حذف شدند. تعداد ۹۹ جدایه دیگر (۴۲ جدایه از منطقه گرگان و ۵۷ جدایه از منطقه نیشابور) برای مرحله بعد انتخاب شدند. تایید نهایی فرایند جداسازی باکتریهای ریزوبیوم از گره‌ها معمولا با آزمون آلوده سازی گیاه میزبان صورت می‌گیرد. برای انجام این آزمون از واریته برکت بعنوان گیاه میزبان استفاده گردید. تشکیل و ظهور گره در گیاهان میزبان پس از تلقیح با هریک از سویه‌ها پس از گذشت یک د وره ۲۱ روزه مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. از ۹۹ سویه جدا شده از گره‌های گیاه میزبان تعداد ۷۹ سویه تایید شدند. این سویه‌ها بدون استثناء در هر سه تکرار گیاهان میزبان تولید گره کردند. از بین جدایه‌های تایید شده، ۴۵ جدایه (۲۵ جدایه از نیشابور و ۲۰ جدایه از گرگان) برای آزمون کارایی همزیستی و توانایی حل فسفات انتخاب گردیدند. جدایه‌های انتخاب شده در جدول ۱ مشخص شده اند. بقیه جدایه‌ها از آزمایش حذف شدند. کلیه ۴۵ جدایه انتخاب شده سبب رشد خوب در هر سه تکرار گیاه میزبان شده بودند. اگر چه در این مرحله هدف اصلی گره دار شدن گیاه میزبان بمنظور تایید باکتریهای ریزوبیوم بوده است.

جدول ۱ : نتایج آزمون تلقیح گیاه میزبان باقلا (واریته برکت) با ۹۹ سویه‌های جدا شده ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه از مناطق نیشابور و گرگان با سه تکرار

شماره	جدایه‌های نیشابور	تکرارI	تکرارII	تکرارIII	رشد گیاه	شماره	جدایه های گرگان	تکرارI	تکرارII	تکرارIII	رشد گیاه
۱	R1N	-	-	-	ضعیف	۱	R4G	-	-	-	ضعیف
۲	R2N	-	-	-	ضعیف	۲	R5G	-	-	-	ضعیف
۳	R3N	-	-	-	ضعیف	۳	R6G	-	-	-	ضعیف
۴	R7N	-	-	-	ضعیف	۴	R46G	+	+	+	متوسط
۵	R8N	-	-	-	ضعیف	۵	R47G	+	+	+	متوسط
۶	R9N	-	-	-	ضعیف	۶	R48G	+	+	+	متوسط
۷	R10N	-	-	-	ضعیف	۷	R49G	+	+	+	متوسط
۸	R11N	-	-	-	ضعیف	۸	R50G	+	+	+	خوب
۹	R12N	-	-	-	ضعیف	۹	R51G	+	+	+	متوسط
۱۰	R13N	-	-	-	ضعیف	۱۰	R52G	+	+	+	متوسط
۱۱	R14N	-	-	-	ضعیف	۱۱	R53G	+	+	+	متوسط
۱۲	R15N	-	-	-	ضعیف	۱۲	R54G	+	+	+	خوب

رشد گیاه	تکرارIII	تکرارII	تکرارI	جدایه های گرگان	شماره	رشد گیاه	تکرارIII	تکرارII	تکرارI	جدایه‌های نیشابور	شماره
متوسط	+	+	+	R55G	۱۳	ضعیف	−	−	−	R16N	۱۳
ضعیف	−	−	−	R56G	۱۴	ضعیف	−	−	−	R17N	۱۴
خوب	+	+	+	R57G	۱۵	ضعیف	−	−	−	R18N	۱۵
خوب	+	+	+	R59G	۱۶	ضعیف	−	−	−	R19N	۱۶
خوب	+	+	+	R60G	۱۷	متوسط	−	+	+	R20N	۱۷
متوسط	+	+	+	R61G	۱۸	خوب	+	+	+	R21N	۱۸
متوسط	+	+	+	R62G	۱۹	خوب	+	+	+	R22N	۱۹
خوب	+	+	+	R63G	۲۰	خوب	+	+	+	R23N	۲۰
خوب	+	+	+	R64G	۲۱	خوب	+	+	+	R24N	۲۱
خوب	+	+	+	R65G	۲۲	خوب	+	+	+	R25N	۲۲
خوب	+	+	+	R66G	۲۳	متوسط	+	+	+	R26N	۲۳
خوب	+	+	+	R67G	۲۴	خوب	+	+	+	R27 N	۲۴
خوب	+	+	+	R68G	۲۵	خوب	+	+	+	R28 N	۲۵
خوب	+	+	+	R69G	۲۶	خوب	+	+	+	R29N	۲۶
متوسط	+	+	+	R70G	۲۷	خوب	+	+	+	R30N	۲۷
متوسط	+	+	+	R71G	۲۸	متوسط	+	+	+	R31N	۲۸
متوسط	+	+	+	R72G	۲۹	خوب	+	+	+	R32N	۲۹
خوب	+	+	+	R73G	۳۰	خوب	+	+	+	R33N	۳۰
متوسط	+	+	+	R74G	۳۱	متوسط	−	+	+	R34N	۳۱
خوب	+	+	+	R76G	۳۲	خوب	+	+	+	R35N	۳۲
خوب	+	+	+	R77G	۳۳	خوب	+	+	+	R36N	۳۳
متوسط	+	+	+	R78G	۳۴	متوسط	+	+	+	R37N	۳۴
متوسط	+	+	+	R79G	۳۵	متوسط	+	+	+	R38N	۳۵
متوسط	−	+	+	R80G	۳۶	متوسط	+	+	+	R39N	۳۶
خوب	+	+	+	R81G	۳۷	خوب	+	+	+	R40N	۳۷
متوسط	+	+	+	R82G	۳۸	خوب	+	+	+	R41N	۳۸
خوب	+	+	+	R83G	۳۹	خوب	+	+	+	R42N	۳۹
خوب	+	+	+	R84G	۴۰	خوب	+	+	+	R43N	۴۰
خوب	+	+	+	R85G	۴۱	خوب	+	+	+	R44N	۴۱
خوب	+	+	+	R102G	۴۲	خوب	+	+	+	R45N	۴۲
						خوب	+	+	+	R58N	۴۳
						متوسط	+	+	+	R75N	۴۴
						خوب	+	+	+	R87 N	۴۵
						متوسط	+	+	+	R89 N	۴۶
						خوب	+	+	+	R90 N	۴۷
						متوسط	+	+	+	R91N	۴۸

رشد گیاه	تکرارIII	تکرارII	تکرارI	جدایه های گرگان	شماره	رشد گیاه	تکرارIII	تکرارII	تکرارI	جدایه‌های نیشابور	شماره
						متوسط	−	−	+	R93N	۴۹
						متوسط	−	+	+	R94N	۵۰
						خوب	+	+	+	R95 N	۵۱
						خوب	+	+	+	R98N	۵۲
						خوب	+	+	+	R99N	۵۳
						متوسط	−	+	+	R100N	۵۴
						متوسط	−	+	+	R101N	۵۵
						خوب	+	+	+	R104N	۵۶
						متوسط	+	+	+	R105N	۵۷

شماره جدایه هایی که پررنگ شده، جدایه‌های انتخاب شده برای آزمون توان همزیستی و حل فسفات می‌باشد

نتایج حاصله از آزمون توانایی حل فسفات معدنی و آلی در بین ۲۵ جدایه ریزوبیوم لگومینوزارم جدا شده از منطقه نیشابور و ۲۰ جدایه از منطقه گرگان نشان داد که هیچکدام از جدایه‌های گرگان یا نیشابور توانایی حل فسفات معدنی را در شرایط آزمایش نداشتند. بعبارت دیگر هیچگونه هاله ای در اطراف کلنی‌های باکتریهای ریزوبیوم که بر روی محیط کشتهای YMA، YGA، YMGA، و محیط اسپربر(SP) رشد داده شده بودند مشاهده نشد (جدول ۲). مکانیزمهای انحلال فسفاتهای معدنی توسط باکتریها مورد مطالعه قرار گرفته است. تولید اسیدهای آلی توسط باکتریها از جمله باکتریهای ریزوبیوم اثبات شده است (۱۰).

معمول ترین اسید آلی تولید شده توسط اغلب باکتریها اسید گلو کونیک است که بعنوان مهمترین عامل در انحلال فسفاتهای معدنی شناخته شده است و باکتریهای ریزوبیوم هم توانایی تولید آن را دارا می‌باشند (۲). اما در این آزمایش هیچکدام از جدایه‌ها در شرایط آزمایش توانایی حل فسفات معدنی را بر روی محیط کشت جامد نشان ندادند. قطر کلنی‌های جدایه‌های گرگان در محیط کشت YMA بیشترین و بر روی محیط کشت اسپربر کمترین مقدار را داشتند. علیخانی (۲) نیز نتایج کاملا مشابهی را در رابطه با مقایسه رشد کلنی‌ها در دو محیط کشت YMA و اسپربر گزارش کرده است. میانگین قطر کلنی‌ها در محیطهای کشت YGA و YMGA تقریبا مشابه بودند. روند کلی تغییرات قطر کلنی‌ها در بین جدایه‌های منطقه نیشابور مشابه جدایه‌های گرگان بود با این تفاوت که جدایه‌های نیشابور در محیط کشت YMA بیشترین قطر کلنی را دارا نبودند. بطور کلی محیط کشت YMA معمولاً محیط کشت عمومی برای اکثر باکتریهای ریزوبیوم می‌باشد و بنظر می‌رسد که قند مانیتول بعنوان یک منبع کربنی برای مطالعه توانایی حل فسفات مناسب نباشد زیرا باکتریها با مصرف آن تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی زیادی میکنند که این امر ممکن است مانع تشخیص هاله اطراف کلنی‌ها گردد. کلیه جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه توانایی حل فسفات آلی را داشتند (جدول ۲). یعنی زمانی که هگزا اینوزیتول فسفات بعنوان یک منبع فسفر آلی برای جدایه‌ها انتخاب گردید هاله در اطراف کلنی‌ها تشکیل شد. نسبت قطر هاله به کلنی از ۱/۲۱ تا ۱/۸۵ میلیمتر متغیر بود. نکته جالب توجه دیگر این است که میانگین قطر هاله به کلنی برای جدایه‌های گرگان و نیشابور تقریبا مساوی (۱/۴۲) بودند. معمولا انحلال فسفاتهای آلی یا معدنی شدن فسفر آلی غالبا توسط آنزیمهای فسفاتاز که فسفوهیدرولازها نامیده می‌شوند انجام می‌گیرد (۸). عبد الله (۱) نشان داد که جدایه‌های

ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه توانایی تولید هر دو نوع آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی را دارا می‌باشند. البته تولید اسیدهای آلی توسط جدایه‌های باکتریهای ریزوبیوم که عامل اصلی در انحلال فسفاتهای معدنی بشمار می‌روند توسط

جدول ۲ : نتایج آزمون توانایی حل فسفات معدنی و آلی (نسبت هاله به کلنی به میلیمتر) ۴۵ سویه‌های جدا شده ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه ، حروف C و N در انتهای شماره مربوط به نقطه گرگان و نیشابور

جدایه	YMA	YGA	YMGA	SP	HIP-SP	جدایه	YMA	YGA	YMGA	SP	HIP- SP
R65G	۰/۱۱*	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۹	۱/۴۴*	R30N	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۸	۱/۵۵
R59G	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۱	۱/۴۴	R44N	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۸	۱/۵۷
R64G	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۹	۱/۵۷	R58N	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۸	۱/۵۷
R67G	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۸	۱/۶۹	R32N	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۹	۱/۴۶
R84G	۰/۱۰	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۸	۱/۴۷	R22N	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۸	۱/۵۵
R66G	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۷	۱/۸۵	R28N	۰/۱۰	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۸	۱/۵۷
R57G	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۹	۱/۴۷	R35N	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۱	۱/۱۴
R63G	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۵	۰/۱۱	۱/۲۵	R41N	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۸	۱/۴۷
R85G	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۸	۱/۵۷	R24N	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۹	۱/۴۶
R68G	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۸	۱/۳۶	R104N	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۹	۱/۸۴
R73G	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۹	۱/۳۵	R25N	۰/۱۲	۰/۱۰	۰/۱۱	۰/۱۱	۱/۴۳
R69G	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۸	۱/۳۳	R90N	۰/۱۱	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۰	۱/۴۳
R54G	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۷	۱/۴۷	R42N	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۹	۱/۲۸
R83G	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۸	۱/۴۴	R27N	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۱	۱/۲۵
R50G	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۱۵	۰/۸	۱/۳۸	R45N	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۷	۱/۳۸
R77G	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۹	۱/۲۹	R23N	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۷	۱/۳۸
R60G	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۱۱	۱/۳۳	R99N	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۱	۰/۸	۱/۳۶
R102G	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۱۰	۱/۲۹	R36N	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۷	۱/۳۳
R81G	۰/۹	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۸	۱/۲۱	R43N	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۹	۱/۴۷
R76G	۰/۱۳	۰/۱۲	۰/۱۴	۰/۹	۱/۴۷	R33N	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۰	۱/۳۱
						R95N	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۸	۱/۳۸
						R21N	۰/۹	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۷	۱/۲۱
						R98N	۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۱۳	۰/۷	۱/۳۱
						R40N	۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۱۲	۰/۹	۱/۴۳
						R29N	۰/۱۱	۰/۱۳	۰/۱۴	۰/۱۰	۱/۳۱
میانگین	۱۴/۱	۱۳/۲	۱۳/۵	۸/۷۵	۱/۴۳	میانگین	۱۲	۱۲/۷	۱۳	۸/۶۸	۱/۴۲

*هر عدد میانگین چهار تکرار است.

محققین زیادی گزارش شده است (۴). علیخانی (۲) گزارش کرده است که جدایه‌های باکتریهای ریزوبیوم از نظر توان حل فسفات آلی بسیار متنوع هستند. او گزارش کرده است که ۱۰۰ و ۹۳ درصد از جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار تریفولی و ویسیه توانایی حل فسفات آلی را داشته اند.

بمنظور بررسی کمی توانایی حل فسفات معدنی تعداد ۱۰ جدایه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه از بین جدایه‌های

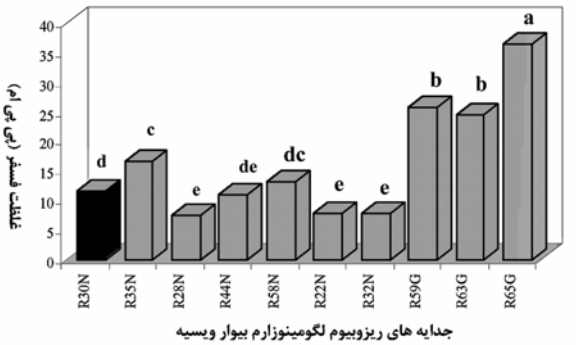
فوق انتخاب و با سه تکرار و در محیط کشت مایع حاوی فسفات معدنی رشد داده شدند. میزان فسفر آزاد شده در محیط پس از سه روز اندازه گیری شد. نتایج حاصله از آزمایش نشان داد که میزان فسفر آزاد شده در سوسپانسیون باکتریها از نظر آماری در سطح ۵ درصد معنی دار بود (جدول ۳). بیشترین و کمترین فسفر آزاد شده به ترتیب مربوط به جدایه‌های گرگان و نیشابور بودند. جدایه R65G بیشترین توانایی حل فسفات معدنی را نشان داد. جدایه‌های R63G و R59G از نظر توانایی حل فسفات اختلاف معنی داری نداشتند (شکل ۱). هیچگونه ارتباطی بین توانایی حل فسفات آلی و حل فسفات معدنی در محیط کشت مایع در بین جدایه‌ها مشاهده نشد. البته علیخانی (۲) گزارش کرده است که نتایج حاصله از توانایی حل فسفات معدنی در محیط کشت جامد و مایع بین جدایه‌های ریزوبیومی کاملا با یکدیگر مطابقت داشته اند. البته ذکر این نکته ضروری است که وی از محیط کشت اسپربر حاوی تری کلسیم فسفات استفاده کرده است که با محیط کشت استفاده شده در این آزمایش متفاوت است. در آزمون توانایی حل فسفات معدنی از محیط کشت YEM برای رشد باکتریهای ریزوبیوم استفاده شد.

جدول۳ : تجزیه واریانس توانایی حل فسفات معدنی ۱۰ جدایه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه در محیط کشت مایع YMB[1]،

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه	۹	۲۸۰/۵۶۷**
خطا	۲۰	۴/۸۴۳

معنی دار در سطح ۰/۵ درصد (P<0.05)

1- Yeast Manitol Broth



شکل ۱: مقایسه میانگین‌های غلظت فسفر کل آزاد شده در سوسپانسیون ۱۰ جدایه ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه در محیط کشت YMB

نتایج حاصله از مطالعه کارآیی همزیستی جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه نشان داد که اختلاف معنی داری بین جدایه‌های ریزوبیوم از لحاظ راندمان تثبیت بیولوژیکی وجود دارد (جدول۵). کارآیی همزیستی از ۵ تا ۵۰۰ درصد در بین جدایه‌های جدا شده از منطقه نیشابور و از ۵ تا ۵۲۷ درصد در بین جدایه‌های منطقه گرگان متغیر بود. جدایه R65G بالاترین کارآیی همزیستی را نشان داد. اگر چه دو جدایه R30N و R59G اختلاف معنی داری با هم نداشتند اما این دو جدایه بعد از جدایه R65G بالاترین کارآیی همزیستی را در بین ۴۵ جدایه نشان دادند. البته با توجه به این نکته که گیاه میزبان واریته برکت بوده است که مدتهاست در منطقه گرگان کشت می‌شود لذا این نتایج توجیه منطقی دارد. در منطقه نیشابور واریته محلی باقلا کشت می‌شود که کاملا با واریته برکت متفاوت است. بنابراین بنظر می‌رسد که اگر از واریته محلی باقلا منطقه نیشابور بعنوان گیاه میزبان استفاده می‌شد نتایج کاملا متفاوتی مورد انتظار بود.

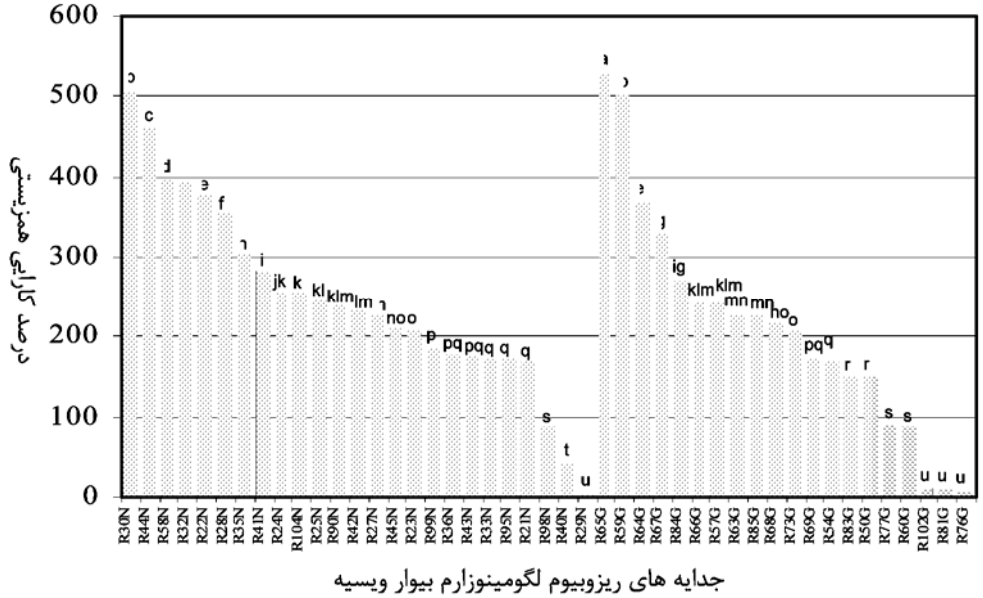
جدول۵: تجزیه واریانس راندمان همزیستی جدایه ای ریزوبیوم با گیاه باقلا واریته برکت

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه	۴۴	۶۸۸۳۵/۰۲۱**

خطا	۱۳۵	۱۱۶/۱۴

معنی دار در سطح ۰/۵ درصد ($P < 0.05$)

در مجموع با در نظر گرفتن کارآیی همزیستی جدایه و توانایی حل فسفات جدایه‌های R65G,R59G از منطقه گرگان و جدایه‌های R30N, R35Nو R58N از منطقه نیشابور برای آزمون توانایی تثبیت بیولوژیکی در محیط خاک در شرایط گلخانه ای توصیه می‌شود. قطعاً با توجه به نتایج حاصل از این آزمایش جدایه برتر برای هر منطقه را می‌توان شناسایی کرد.



شکل ۲: مقایسه میانگین کارآیی همزیستی جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزارم بیوار ویسیه جدا شده از دو منطقه نیشابور و گرگان

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که امکان انجام این تحقیق را فراهم ساختند و همچنین از پرسنل محترم آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشکده کشاورزی کرج بخاطر مساعدت فراوان در تمامی مراحل آزمایش تشکر می‌کنیم.

منابع

1- Abd-Alla, M. H. 1994. Use of Organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Phosphatases. Biology and Fertility of Soils. 18: 216-218.

2- Alikhani, H., N. Saleh-Rastin, and H. Antoun. 2002. Phosphate solubilization by rhizobial strains native to Iranian Soils. Abstract Book first International meeting on microbial phosphate Solubilization, Salamanca, Spain. 16-19 July.

3- Gerresten, F. C. 1948. The influences of microorganisms on the phosphate uptake by the plant. Plant and Soil. 1: 51-81.

4- Ghani, A., S. S. S. Rajan, and A. Lee. 1994. Enhancement of phosphate rock solubility through biological processes. Soil Biology and Biochemistry. 26:127-136.

5- Gügi, B., N. Orange, F. Hellio, J. F. Burini, C. Guillou, F. Leriche, and J. F. Guespin-Michel. 1991. Effect of Growth temperature on several exported enzyme activities in the psychrotropic bacterium Pseudomonas fluorescens. Journal of Bacteriology. 173: 3814-3820.

6- Kirchner, M. G., A. G. Wollum, and L. D. Kong. 1993. Soil Microbial population and activities in reduced chemical input agroeosystems. Soil Science Society American Journal. 57, 1289-1295.

7- Peix. A., A. A. Rivas-Boyero, P.F. Mateos, C. Rodriguez-Barruceo, E. Martinez-Molina, and E. Velazquez. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate Solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterranum* under growth chamber conditions. Soil Biology and Biochemistry. 33: 103-110.

8- Rodriguez, H., and R. Fraga. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biothecnology dvances. 17: 319-339.

9- Somasegaran, P., and H. J. Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia, Methods in Legum-Rhizobium Technology. Springier-Verlay. New York.

10- Sperber, J. I. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research. 9: 778-781.

11- Stacey, G., R. H. Burris, and H. J. Evans. 1992. Biological Nitrogen Fixation. Chapman and hall, New York.

12- Van Rossum, D., A. Muyotcha, and H. W. Van Verseveld. 1995. Siderophore production by *Baryrhizobium* spp strain nodulating groundnut, Plant and Soil. 163: 177-187.

13- Vincent, J. M. 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. IBP Handbook, No. 15. Blackwell. Sci. Oxford.

The study of symbiotic and phosphate solubility efficiency of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae*

M. Ghazaian , A. Lakzian, H. A. Alikhani, Gh. H. Haghnia[5]

Abstract

Symbiotic and phosphate solubility efficiency of 45 isolates of *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciae* isolated from Gorgan and Nyshabour were investigated in the laboratory conditions. The results showed that all isolates did not have the ability of inorganic phosphate solubility in solid media but they showed it in liquid media. All isolates had the ability of organic phosphate solubility. Isolates of *R. leguminosarum* biovar *viciae* had different symbiotic efficiency and it ranged from 5 to 500 % among them. Isolates R65G and R59G isolated from Grogan and R30N isolated from Nyshabour showed the most symbiotic efficiency. Regarding the results of organic and inorganic phosphate solubility and symbiotic efficiency, isolates of R65G, R59G and R30N were selected as superior ones in this experiment.

Key words: *Rhizobium leguminosarum*, phosphate solubility, symbiotic efficiency.

5 - Contribution from College of Agriculture , Ferdowsi University of Mashhad and Collage of Agriculture, Tehran University, Kraj.