فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۲۹۵-۲۸٤ (۱۳۸٦)

بررسی تشابه باکتریهای همزیست با یونجه یکساله (*Medicago rigidula* L.) و یونجه چندساله (*M. sativa* L.)

مریم جبلّی[۱]، محبت علی نادری شهاب[۱]، احمدعلی پوربابایی[۲]، عباس قمری‌زارع[۱]و علی‌اشرف جعفری[۱]
۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، صندوق پستی: ۱۱٦-۱۳۱۸۵، E-mail: jebeli@rifr-ac.ir
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی.

چکیده

پایه‌های یونجه یکساله *M. rigidula* از سه رویشگاه با ارتفاع ۲۰۰۰-۱٤۵۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری و باکتری *Sinorhizobium* از ریشه گیاهان استخراج گردید. باکتری همزیست با ریشه یونجه زراعی *M. sativa* نیز از این گونه استخراج گردید. باکتریهای استخراج شده از دو گونه مذکور تحت آزمایشهای بیوشیمیایی مانند، مشخصات باکتری، رنگ‌آمیزی گرم، مصرف قندهای مختلف و آزمایش لیتموس میلک قرار گرفتند. حساسیت و مقاومت باکتریهای استخراج شده به تعدادی از آنتی‌بیوتیکها و نیز مقاومت در مقابل غلظت‌های مختلف NaCl مورد بررسی قرار گرفتند. انجام آزمایشها در شرایط *in vivo* با تلقیح گیاهچه‌های هر یک از دو گونه یونجه یکساله و چند ساله با باکتریهای استخراج شده از دو گونه گیاهی وجود*Sinorhizobium meliloti* را در *M. rigidula* و *M. sativa* اثبات نمود. تلقیح گونه‌های گیاهی با باکتریهای مختلف نشان داد، باکتری سینوریزوبیوم استخراج شده از یک گونه گیاهی می‌تواند بر روی ریشه گونه دیگر مستقر شده (Cross infection) و ایجاد گرهک نماید. اما تعداد گره تشکیل شده بر روی ریشه گیاهچه و اندازه گره ایجاد شده توسط باکتری *Sinorhizobium meliloti* استخراج شده از یک گونه گیاهی، با باکتری استخراج شده از گونه دیگر تفاوت معنی‌داری داشت.

واژه‌های کلیدی: *Sinorhizobium meliloti*، یونجه یکساله، *Medicago rigidula* L.، *M. sativa* L.، تلقیح معکوس و گره‌زایی.

مقدمه

نیتروژن یکی از عناصر مهم در تغذیه موجودات زنده از جمله، گیاهان بوده و کمبود آن از عوامل مهم در کاهش تولیدات کشاورزی است (Larsson *et al.*, 1992). باکتریهای تثبیت‌کننده نیتروژن قادرند که از نیتروژن مولکولی (N_2) استفاده کنند. همزیستی گیاهان لگوم و باکتری ریزوبیوم بیشترین تأثیر کمی را روی چرخه نیتروژن دارد (Athar & Johanson, 1996). هشتاد درصد نیتروژن تثبیت شده از طریق همزیستی باکتریها با لگومها بدست می‌آید، که در اثر این فرایند، نیتروژن مورد نیاز برای سنتز پروتئین و سایر ترکیبات آلی گیاه افزایش یافته و ذخایر نیتروژن خاک کمتر مورد استفاده گیاه قرار می‌گیرد. از جنبه‌های اکولوژیک و اقتصادی، پدیده تثبیت نیتروژن در لگومها اهمیّت خاصی دارد که با بالا رفتن قیمت سوختهای فسیلی نقش تثبیت بیولوژیک نیتروژن قابل لمس‌تر می‌شود (Herridge & Rose, 2000). قسمت

عمده نیتروژن تثبیت شده در سیستم‌های زراعی مربوط به همزیستی بین گیاهان لگوم با گونه‌هایی از جنس‌های ریزوبیوم، برادی ریزوبیوم، سینوریزوبیوم، آزوریزوبیوم، مزوریزوبیوم و آلوریزوبیوم است (Michiels & Vanderleyden, 1994; Vance, 1997).

تحقیق در زمینه نقش ریزوبیوم در تثبیت بیولوژیک نیتروژن در بسیاری از گیاهان زراعی نظیر لوبیا، نخود و سویا در سطح وسیعی صورت گرفته و در گیاهان علوفه‌ای بیشترین تحقیقات در زمینه تأثیر سوشهای مختلف *Rhizobium meliloti* بر تأمین نیتروژن یونجه چندساله (*M. sativa*) مورد بررسی قرار گرفته است. با توجه به اهمیت یونجه‌های یکساله در عرصه‌های منابع طبیعی، ضروری است تحقیقات گسترده‌ای در زمینه باکتریهای تثبیت کننده همزیست با یونجه‌های یکساله صورت گرفته و نسبت به جداسازی و بررسی ریزوبیوم همزیست با این گونه‌های مهم اقدامات اساسی صورت گیرد. گونه‌های یونجه یکساله نسبت به سایر گونه‌های جنس *Medicago*، نسبت به سرما مقاومت بیشتری داشته (Krall *et al.*, 1996) و در شرایط سخت و نامساعد، محیط‌های طبیعی پایداری بیشتری از خود نشان می‌دهند.

تلقیح یونجه با ریزوبیوم‌ها، اجازه رشد در غیاب ترکیبهای نیتروژن را به گیاه می‌دهد. نیاز به تلقیح زمانی مشخص می‌شود که گونه ریزوبیوم در محیط حضور نداشته باشد و تعداد آنها کم و یا بر روی گیاه غیر مؤثر باشد یا به دلیل تنش‌های محیطی جمعیت ریزوبیوم اختصاصی کم شده باشد (ملکی فراهانی، ۱۳۸۳). بنابراین جهت ایجاد تعداد مناسبی از باکتریهای جنس ریزوبیوم در همزیستی موفق با لگومها، تلقیح ریزوبیوم ضروری به نظر می‌رسد. اولین کار برای تولید یک مایه تلقیح مناسب، انتخاب سوش مناسب باکتری است (Stephens & Rask, 2000). بر اساس گزارش بعضی از منابع، یکی از ویژگیهای خاص یونجه‌های یکساله اختصاصی بودن سوشهای ریزوبیومی است که بر روی هر گونه فعالیت می‌نماید. اظهار می‌شود این اختصاصی بودن سوشهای ریزوبیومی گاهی به اندازه‌ای است که یک سوش ریزوبیوم روی یک گونه به فراوانی تشکیل گره می‌دهد، ولی روی گونه دیگر اصلاً تمایلی به ایجاد گره ندارد (میرزایی ندوشن، ۱۳۸۰) همچنین، در یونجه یکساله همبستگی زیادی بین تعداد ریزوبیوم در محیط ریشه (Rhizosphere) و تشکیل گره وجود دارد (Young & Brockwell, 1992). از این‌رو، اندازه جمعیت ریزوبیوم نقش مهمی در تشکیل گره و تثبیت نیتروژن توسط گیاه دارد.

روشهای اولیه جداسازی، تشخیص و طبقه‌بندی باکتریها اغلب براساس تشابه در خواص فنوتیپی آنها صورت می‌گیرد. در مطالعات اکولوژی و تفکیک سویه‌های ریزوبیوم، استفاده از مارکر مقاومت به آنتی‌بیوتیک هم‌ردیف با ELISA، از تکنیک آنتی‌بادی فلورسنت و سرولوژی استفاده می‌شود (Beck *et al.*, 1993). مارکرهای آنتی‌بیوتیک عبارتند از: استرپتومایسین، کانامایسین، اسپکتینومایسین و سایر گروههای آنتی‌بیوتیک. مطالعات نشان می‌دهند، ریزوبیوم‌های مقاوم به استرپتومایسین انتخاب شده برای مطالعات اکولوژیکی می‌توانند این صفت را به‌عنوان مارکر چندین سال حفظ نمایند (Beck *et al.*, 1993).

بررسی و جداسازی سوشهای سینوریزوبیوم تولید کننده گره برروی ریشه یونجه یکساله گونه *M. rigidula* و استقرار باکتری همزیست با ریشه یونجه چند ساله (*M. sativa*) بر روی ریشه یونجه یکساله و

به‌عکس از اهمیّت خاصی برخوردار است، که هدف این تحقیق می‌باشد. با توجه به اهمیت استقرار باکتری ریزوبیوم بر روی ریشه یونجه یکساله و اهمیت گره‌زایی توسط باکتری همزیست و مطرح نمودن این سؤال که آیا باکتری *Rhizobium melliloti* قادر به استقرار بر روی یونجه یکساله می‌باشد یا خیر، اقدام به انجام این بررسی گردید. مبحث دیگر اینکه، آیا باکتری استخراج شده از ریشه یونجه یکساله (*M. rigidula*) می‌تواند بر روی یونجه چندساله (*M. sativa*) مستقر گردد؟ آیا گیاه میزبان (*M. rigidula*) برای باکتری کاملاً اختصاصی است یا اینکه یک گونه باکتری می‌تواند به روی ریشه گونه‌های دیگر جنس *Medicago* مستقر گردد؟ سؤالات بالا مباحثی است که در این بررسی دنبال خواهد گردید.

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

یونجه یکساله *M. rigidula* از سه عرصه مرتعی شامل، منطقه آبعلی با ارتفاع ۱۸۵۰-۱۷۵۰ متر، منطقه دشت قزوین با ارتفاع ۱٤۵۰ متر و منطقه الموت با ارتفاع ۲۰۰۰-۱۹۵۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری گردید.

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی از عرصه‌های مختلف از نیمه دوم اردیبهشت ماه تا نیمه اول خرداد صورت گرفت، نمونه‌های گیاهی از بوته‌های شادابی که هیچ‌گونه علائم بیماری نداشته و در ابتدای مرحله گلدهی بودند، انتخاب شدند. از هر منطقه حدود ۱۵ عدد گیاه انتخاب و نمونه‌های گیاهی همراه با ریشه و خاک اطراف آن از زمین کنده شد و به درون گلدان منتقل و نمونه‌ها در کمتر از ۲٤ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس، خاک اطراف ریشه‌ها به آرامی شسته شد و بدون اینکه آسیبی به ریشه‌های فرعی و گرهک‌ها وارد شود. ریشه‌ها از خاک جدا شدند. گرهک‌هایی که به رنگ صورتی و یا قرمز کمرنگ بوده و به‌طور عمده بر روی ریشه فرعی قرار داشتند جداسازی و به تفکیک ریزی و درشتی درون پتریهای حاوی آب مقطر استریل قرار داده شدند.

استریل کردن گرهک

گرهک‌های ریز به مدت ۱۰ ثانیه در اتانول ۹۵ درصد قرار داده شدند و در ادامه یکبار با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس به مدت ۲ دقیقه در کلرید جیوه ۰/۱ درصد قرار گرفتند و در خاتمه پنج بار با آب مقطر استریل شستشو شدند. گرهک‌های درشت به‌مدت ۳۵ ثانیه در اتانول ۹۵ درصد غوطه‌ور و پس از آن یکبار با آب مقطر استریل شستشو شدند. سپس به مدت ۵ دقیقه در محلول کلرید جیوه ۰/۱ درصد قرار گرفته و در خاتمه پنج بار با آب مقطر استریل شستشو شدند تا اثر کلریدجیوه کاملاً از بین برود (افشاری علی‌آباد، ۱۳۷۵).

جداسازی باکتری از گرهک‌ها

بسته به بزرگی و کوچکی گره‌های فعال صورتی رنگ، جداسازی به دو روش انجام گرفت: الف- گرهک‌های ریز را درون پتری‌دیش استریل قرار داده، یک قطره آب مقطر استریل بر روی آنها ریخته و بوسیله میله شیشه‌ای توپر که روی شعله استریل شده بود به آرامی فشار داده و مایع بدست آمده روی محیط CYMA کشت داده شد. ب- گرهک‌های درشت را بر روی پتری استریل قرار داده با تیغ استریل از وسط

برش و بوسیله لوپ استریل قسمت برش خورده روی محیط CYMA قرار داده شد (افشاری علی‌آباد، ۱۳۷۵).

شناسایی ریزوبیوم‌ها به روش بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی

باکتری ریزوبیوم کشت شده بر روی محیط CYMA پس از ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد به رنگ سفید یا صورتی کم‌رنگ ظاهر شدند. حاشیه کناری به‌دلیل مصرف گلوکز کمی زرد رنگ بنظر می‌رسید. کلنیهای خالص حاصل از نمونه‌های استخراجی تهیه و جهت رنگ‌آمیزی گرم، تست تحرک، قابلیت جذب رنگ قرمز کنگو (Red congo) و همچنین آزمایشهای تکمیلی میکروب‌شناسی نظیر، مصرف منبع کربن، رشد در غلظتهای مختلف نمک، واکنش لیتموس میلک، مقاومت به آنتی‌بیوتیک و ایجاد گرهک در گیاه میزبان مورد استفاده قرار گرفتند (Holt *et al.*, 2000).

شناسایی باکتری با آزمایش آلوده‌سازی گیاهان میزبان (Infection test)

جهت تشخیص اختصاصی بودن باکتریهای جداسازی شده، از آزمون آلوده نمودن گیاه میزبان با باکتری استخراج شده استفاده شد. روش آزمایش به شرح زیر می باشد:

نحوهٔ استریل و کشت بذر: بذرهای سالم *M. rigidula* را که از مناطق طالقان، الموت و آبعلی جمع‌آوری شده بودند ابتدا بوسیله دو صفحه سمباده خراش داده و سپس با آب جاری چندین بار شستشو گردیدند. در ادامه، به مدت ۳ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد قرار گرفتند. اتانول تخلیه و بذرها سه بار با آب مقطر استریل شستشو و به مدت ۲۰ دقیقه در محلول تجاری هیپوکلریدسدیم ۳۵ درصد قرار داده شدند. از این مرحله به بعد بذرها در زیر هودلامینارفلو با آب مقطر استریل ۳ بار شستشو گردیدند. بذرها را با پنس استریل برروی محیط $\frac{1}{2}$MS قرار داده و به انکوباتور ۲۳°C منتقل گردیدند تا مراحل جوانه‌زنی را طی نمایند.

تهیه باکتری جهت تلقیح: باکتری جدا شده از یونجه‌های یکساله و چندساله به‌مدت ۲٤ ساعت در محیط مایع CYMA کشت، پس از رسیدن به مرحله رشد تصاعدی با غلظت حدود ۹ مک فارلند با سانتریفیوژ ۳۵۰۰ دور ته‌نشین شد. باکتری ته‌نشین شده با افزودن یک میلی‌لیتر محیط مایع CYMA به‌صورت سوسپانسیون سلولی در آمدند.

تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری: بذرها با روشی که در بالا توضیح داده شد استریل و روی محیط $\frac{1}{2}$MS قرار گرفته و پس از ٤ روز که طول ریشه‌چه به ۳-۲ سانتیمتر رسید گیاهچه‌ها به درون لوله‌های آزمایش (۱۰×۲۲) حاوی محیط جامد اسلنت رشد توأم ریزوبیوم و یونجه (Beck *et al.*, 1993) منتقل شدند. به لوله‌های حاوی گیاهچه *M. sativa* ۲۰۰ میکرولیتر باکتری جدا شده از یونجه *M. rigidula* تلقیح و همین مقدار باکتری جدا شده از *M. sativa* به لوله حاوی یونجه یکساله *M. rigidula* تلقیح گردید (Cross infection). همچنین باکتری جدا شده از یونجه *M. rigidula* به مقدار یاد شده به لوله‌های حاوی گیاهچه یونجه یکساله *M. rigidula* تلقیح گردید. لوله‌ها در انکوباتور ۲۷°C با طول شبانه روز ۱۲/۱۲ قرار گرفتند. ایجاد گره و تعداد آنها بعد از ۳ هفته بررسی گردید.

صفات مورد بررسی

در گیاهان تلقیح شده با باکتریهای مختلف و همچنین گیاهان تلقیح نشده (شاهد)، صفات شامل، طول ریشه

(سانتیمتر)، وزن ریشه (گرم)، تعداد برگ گیاهچه و تعداد گره تشکیل شده بر روی ریشه گیاهچه اندازه‌گیری و داده‌های حاصل ثبت گردید.

تجزیه آماری طرح

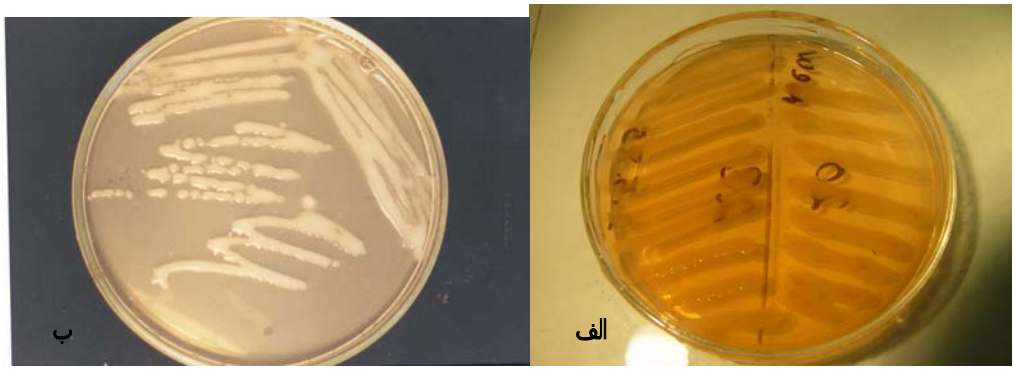
در پایان آزمایش، داده‌های جمع‌آوری شده از لحاظ نرمال بودن مورد آزمون قرار گرفتند و در مواردی که توزیع داده‌ها نرمال نبود تبدیل روی آنها انجام شد و سپس مبادرت به تجزیه آنها گردید. تجزیه واریانس یک‌طرفه به تفکیک بر روی اثر باکتریها بر گونه‌های یونجه انجام شد و پس از تأیید معنی‌دار بودن نتایج تجزیه واریانس، میانگین تیمارها به روش آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند. برای تجزیه آماری داده‌ها از نرم‌افزار SAS9 و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

جداسازی باکتری از گرهک‌ها

از گرهک‌های ریشه یونجه یکساله *M. rigidula* و یونجه چندساله *M. sativa* کشت شده در محیط YMA، بعد از ۷۲–٤۸ ساعت کلنی‌های درشت به رنگ شیری–کرم بدست آمد. قطر کلنی‌ها حدود ٤/۵–۲/۵ میلیمتر و دانه‌های پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات بر روی آنها نمایان بود (شکل ۱– الف).

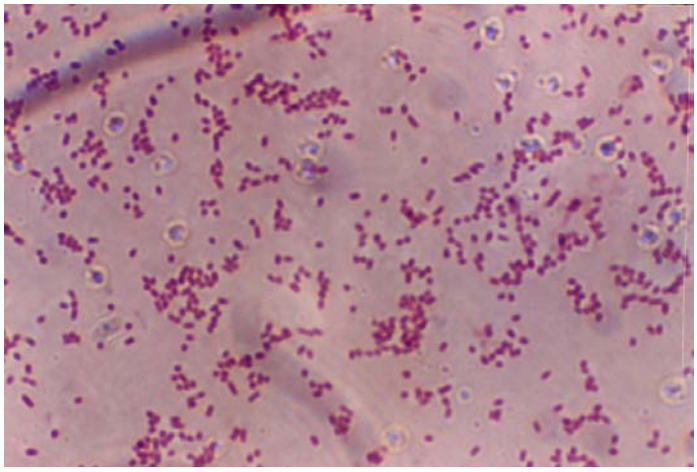
باکتریها بر روی محیط CYMA که حاوی رنگ قرمز کنگو (Red Congo) بود، به خوبی رشد کرده و تشکیل کلنی دادند. بعضی از سویه‌ها رنگ را به میزان ضعیفی جذب کرده و به رنگ صورتی بسیار کم‌رنگ نمایان گردیدند (شکل ۱– ب) .



شکل ۱– باکتریهای جدا شده از گرهک‌ها، روی محیط CYMA (الف). کشت باکتری روی YMA محیط حاوی Red Congo (ب).

شناسایی سویه‌های باکتری از طریق آزمایشهای بیوشیمیایی

همان‌گونه که در مواد و روشها اشاره شد، باکتریهای استخراج شده از گیاهان مناطق مختلف، تحت آزمایشهای مختلف بیوشیمیایی قرار گرفتند. باکتریها پس از رنگ‌آمیزی، گرم باسیل و کوکوباسیل گرم منفی بودند (شکل ۲)، تست تحرک در همه آنها مثبت بود. دانه‌های پلی‌بتاهیدروکسی‌بوتیرات در همه آنها وجود داشت.



شکل ۲- رنگ‌آمیزی گرم، که نشانه گرم منفی بودن باکتری می‌باشد.

کلیه باکتریهای مناطق سه‌گانه بر روی محیط حاوی NaCl تست شدند و در هر سه منطقه، غلظت نمک ۰/۵، ۱ و ۲/۵ درصد بررسی گردیدند. این باکتریها تا ۲/۵٪ غلظت NaCl را تحمل کرده و رشد خوبی داشتند.

باکتریهای مناطق مختلف در محیط لیتموس میلک تلقیح و پاسخ مثبت در مناطق مختلف بدست آمد که حاکی از تغییر pH در این محیط‌ها بود.

باکتریها از نظر مصرف قندهای مانیتول، دگلوکز، دگالاکتوز، گزیلوز، مانوز و آرابینوز بطور کلی در مصرف قند مثبت بودند.

استفاده از آنتی‌بیوتیکها به‌عنوان مارکری مناسب در شناسایی و تشخیص سوشهای ریزوبیوم (Beck *et al.* 1993) بکار می‌رود، که در این بررسی حساسیت باکتریها به آنتی‌بیوتیکهای کانامایسین، استرپتومایسین، تتراسیکلین و ونکومایسین مورد بررسی قرار گرفت. باکتریهای استخراج شده از گونه‌های گیاهی به آنتی‌بیوتیکهای مختلف حساسیت نشان دادند. در این میان، بیشترین حساسیت که با بررسی هاله عدم رشد باکتری مشخص شد، نسبت به تتراسیکلین و با هاله عدم رشد ۱/۵ سانتیمتر و کمترین حساسیت نسبت به استرپتومایسین با هاله عدم رشد ۰/۳ سانتیمتر دیده شد، علاوه بر این، در حدود ۹۰ درصد سویه‌های بدست آمده نسبت به تتراسیکلین مقاوم و تنها ۱۰ درصد حساسیت نشان دادند.

نتایج حاصل از آزمایشهای بیوشیمیایی، مقاومت به نمک و آنتی‌بیوتیکها، نشان می‌دهد که گونه باکتری استخراج شده از گونه‌های گیاهی *M. sativa* و *M. rigidula* باکتری *Sinorhizobium meliloti* می‌باشد.

تأثیر سوش باکتری بر گره‌زایی و سایر صفات در گیاه میزبان

نتایج مقایسه میانگین صفات مورد بررسی شامل وزن ریشه، طول ریشه، تعداد برگ و تعداد گره ایجاد شده بر روی گیاه میزبان توسط باکتری، در جدول ۱ ارائه گردیده است. براساس نتایج حاصل، وزن ریشه گیاهان تلقیح شده و گیاهان شاهد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. دلیل تفاوت قابل توجه وزن ریشه در گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح شده وجود گرهک در گیاهان، انشعاب ریشه و تولید ریشه‌های فرعی و ضخیم بودن قطر ریشه

گیاهان تلقیح شده با باکتری سینوریزوبیوم بود، اما طول ریشه در گیاهان شاهد رشد کمتری نسبت به گیاهان تلقیح شده با باکتری دارند. تعداد برگ در گونه‌های *M. rigidula* و *M. sativa* که با باکتری جدا شده از *M. rigidula* تلقیح گردیده‌اند، تعداد برگ و تعداد گره کمتری نسبت به گیاه *M. rigidula* که با باکتری جدا شده از *M. sativa* تلقیح شده‌اند، نشان می‌دهد. گیاهان شاهد ضمن اینکه در آنها گره ایجاد نگردیده، تعداد برگ کمتری نسبت به تیمارهای تلقیح داشته‌اند. تشکیل نشدن گره در گیاهان شاهد، الزام به وجود باکتری برای تشکیل گره بر روی ریشه را نشان می‌دهد.

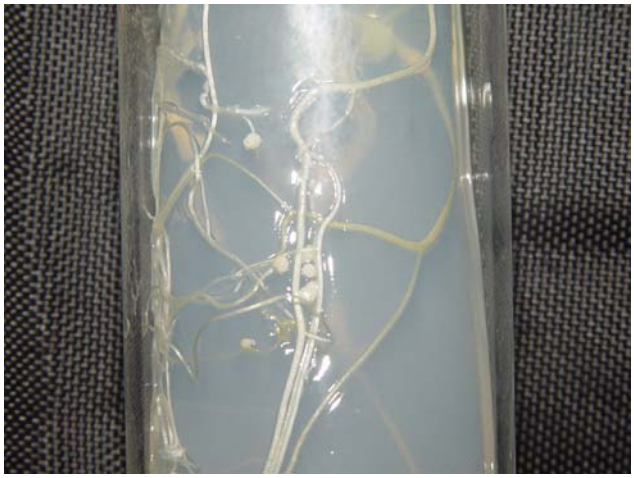
نکته حائز اهمیت در شکلهای ۳ و ٤ ایجاد گره بیشتر و تولید تعداد برگ بیشتر در گیاهان *M. rigidula* است که با باکتری جدا شده از یونجه *M. sativa* تلقیح گردیده‌اند. در همین رابطه، مشاهده می‌گردد گیاهان *M. rigidula* که با باکتری جدا شده از همین گونه تلقیح گردیده‌اند، به طور معنی‌داری تعداد گره و برگ کمتری نسبت به باکتری جدا شده از *M. sativa* تولید کرده‌اند (جدول ۱ و شکل ۵). به این ترتیب، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که باکتری جدا شده از *M. sativa*، کارآیی بیشتری از باکتری جدا شده از *M. rigidula* داشته و ضمن امکان حمله به گونه دیگر، کارآیی معنی‌داری در تولید گره بر روی ریشه گیاه میزبان و تولید برگ در قسمت هوایی گیاه دارد. در مقابل، باکتری جدا شده از یونجه *M. rigidula*، توان و کارآیی کمتری در ایجاد گره و تولید برگ در گونه یکساله و چندساله دارد. نکته مهم اینکه، به‌رغم کارآیی پایین‌تر باکتری جدا شده از *M. rigidula* در تشکیل گره و تولید برگ، این باکتریها با کارآیی نسبتاً کمتری قادر به استقرار بر روی ریشه یونجه چندساله یا *M. sativa* می‌باشند (شکل ٦).

از نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه‌گیری نمود که باکتری استخراج شده از گونه *M. Sativa* به خوبی می‌تواند بر روی ریشه *M. rigidula* مستقر و با میزبان فعالیت همزیستی را ادامه دهد، در مقابل، باکتری جدا شده از *M. rigidula* نیز با کارآیی نسبتاً کمتر بر روی گونه *M. sativa* مستقر و فعالیت همزیستی را ادامه دهد.

دلیل کارآیی کمتر باکتری جدا شده از *M. rigidula* احتمالاً شرایط سخت محیطی، دورهٔ رشد بسیار کوتاه گونه میزبان، استرس شدید گونه میزبان و تحمل دوره طولانی گرم و خشک توسط باکتری باشد که به دلیل این تنشهای شدید و طولانی، باکتری از بنیه و توان مناسبی برخوردار نمی‌باشد. در مقابل، باکتری مستقر بر روی ریشه *M. sativa*، در طول دورهٔ رشد از شرایط ایده‌آلی برخوردار بوده و طی سالهای طولانی می‌تواند بر روی میزبان استقرار یافته و بدون تنش به رشد و فعالیت خود ادامه دهد.

شکل ۳- ایجاد گره بر روی ریشه *M. rigidula*

نتایج حاصل از این بررسی نشان می‌دهد، گونه باکتری در هر دو میزبان گیاهی، باکتری *Sinorhizobium meliloti* بوده و بحث اختصاصی بودن میزبان گیاهی برای باکتریهای استخراج شده از گونه *M. sativa* و *M. rigidula* منتفی بوده و باکتریهای این دو گونه گیاهی می‌توانند گونه گیاهی دیگر را آلوده و بر روی ریشه مستقر گردند.



شکل ٤- ایجاد گره در تلقیح یونجه یکساله *M. rigidula* با باکتری جدا شده از *M. sativa*

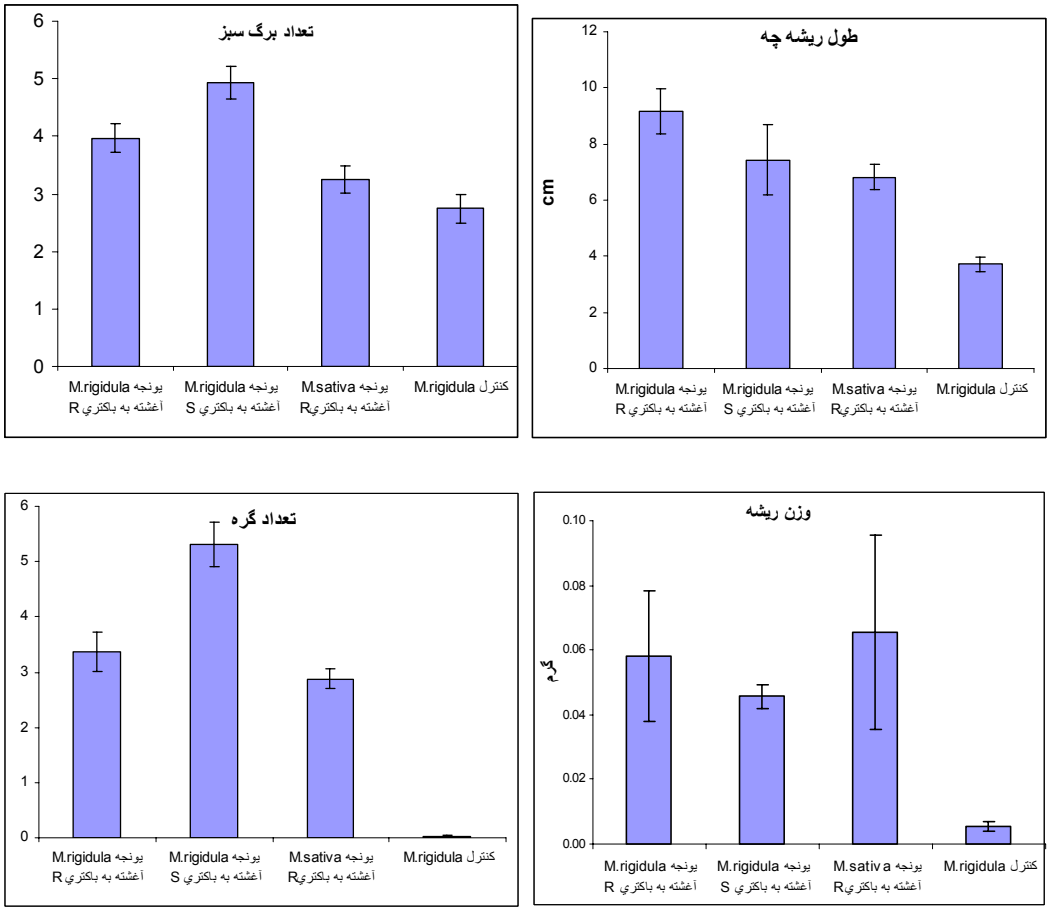
شکل ۵- ایجاد گره در گیاه *M. sativa* تلقیح شده با باکتری جدا شده از گیاه *M. rigidula*

بحث

نتایج آزمایشهای بیوشیمیایی، آنتی‌بیوتیکها در *in vivo* و همچنین بررسی واکنش باکتریها در مقابل میزبانهای گیاهی از گونه‌های مختلف، آزمایشهای تلقیح گیاهان میزبان با باکتری جدا شده از همان گونه گیاهی و گونه دیگر نشان دهنده یکسان بودن گونه‌های باکتری جدا شده از گونه *M. sativa* و *M. rigidula* بوده و به عبارت دیگر، باکتری همزیست با گونه‌های گیاهی یاد شده، همان *Sinorhizobium meliloti* است، با این تفاوت که کارآیی باکتری جدا شده در *M. rigidula* ضعیف‌تر از باکتری جدا شده از *M. sativa* می‌باشد. دلیل این امر را می‌توان به شرایط بسیار سخت و تنش‌زای محیطی که در آن گیاه *M. rigidula* و به‌طبع باکتری مستقر در ریشه گیاه در آن رشد نموده، ربط داد.

در ارتباط با امکان استقرار باکتری *Sinorhizobium* یک گونه یونجه بر روی گونه دیگر، Braclay و همکاران (۱۹۹٤) گزارش نمودند امکان استقرار باکتری یک گونه از جنس یونجه بر روی گونه دیگر وجود دارد، اما، تعداد ریزوبیوم‌های استقرار یافته بر روی گونه گیاهی غیر میزبان اصلی به‌شدت کاهش می‌یابد. در بعضی بررسیها، گزارشهایی مبنی بر اختصاصی بودن سوشهای باکتری *Sinorhizobium* برای هر یک گونه‌های یونجه یکساله وجود دارد (میرزایی‌ندوشن، ۱۳۸۰) که نتایج بدست آمده در این آزمایشها با نتایج حاصل از این بررسی متفاوت است که دلیل آن‌را می‌توان به شرایط و روشهای آزمایش و گونه‌های مورد آزمایش گیاهی مربوط دانست.

با اینکه در آزمایش حاضر کاهش گره‌زایی باکتری جدا شده از *M. rigidula* بر روی *M. sativa* مشاهده شد، اما استقرار باکتری جدا شده از گونه *M. sativa* بر روی گیاه *M. rigidula* بیشتر و اندازه گره‌ها نیز بزرگتر از باکتری جدا شده از گونه گیاهی میزبان اصلی (*M. rigidula*) بود.



شکل ٦- تفاوت بین واکنش گیاهان یونجه تیمار شده با باکتری و گیاهان شاهد

جدول ۲- مقایسه بین میانگین صفات مورد بررسی در گیاهان تلقیح شده با باکتری و گیاهان شاهد، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن

تیمار	وزن ریشه		طول ریشه		تعداد برگ		تعداد گره	
یونجه *M. rigidula* آغشته به باکتری R	۰/۰۵۸	a	۹/۱۷	a	۳/۹۷	b	۳/۳۸	b
یونجه *M. rigidula* آغشته به باکتری S	۰/۰٤٦	a	۷/٤٤	a	٤/۹٤	a	۵/۳۱	a
یونجه *M. sativa* آغشته به باکتری R	۰/۰٦٦	a	٦/۸۱	a	۳/۲۵	bc	۲/۸۸	b
کنترل *M. rigidula*	۰/۰۰۵	b	۳/۷۱	b	۲/۷۵	c	۰/۰	c

منابع مورد استفاده

افشاری علی‌آباد، م.، ۱۳۷۵. ارزیابی تثبیت بیولوژیک نیتروژن بوسیله ریزوبیوم فازئولی و تعیین حامل مناسب برای آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد میکروبیولوژی. دانشگاه تهران. دانشکده علوم.

ملکی فراهانی، س.، ۱۳۸۳. تأثیر سوشهای مختلف ریزوبیوم بر روی رشد و تثبیت نیتروژن یونجه‌های یکساله. پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته زراعت. دانشکده کشاورزی-دانشگاه تهران.

میرزایی‌ندوشن، ح.، ۱۳۸۰. یونجه‌های یکساله (ژنتیک و اصلاح). انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور. تهران.

Athar, M. and Johanson, D.A., 1996. Influence of drought on competition between selected *Rhizobium meliloti* strains and naturalized soil Rhizobium in alfalfa. Plant Soil. 184: 231 – 241.

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

Braclay, R.M., Hebb, M.D. and Brockwell, J., 1994. Differential rhizobial colonization of the roots of sown and volunteer annual species of Medicago in an acid soil. Australian Journal of Experimental Agriculture. 34: 745 – 752.

Herridge, D. and Rose, I., 2000. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. Field Crops Res. 65: 229 – 248.

Holt, G.J., Krieg, R.N, Sneath, H.A.P., Staley, T.J and Williams, T.S., 2000. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition, Williams and Wilkins. USA. 787p

Krall, J., Groose, R.W., Sobels, J. and Janick, J., 1996. Winter survival of Austrian winter pea and annual medic on the western high plains. In: Progress in New Crops: Proceedings of the Third National Symposium Indianapolis, Indiana. Alexandria, USA: American Society for Horticultural Science, 237 – 240.

Larsson, C.M., Matlison, M., Duarte, P., Samuelson, M., Ohlen, E., Oscarson, P., Ingermarsson, B., Larsson, M. and Lundborg, T., 1992. Uptake and assimilation of nitrate under nitrogen limitation. In: Nitrogen Metabolism of Plants. K. Mengel and D. J. Pilbeam. (Eds). pp. 71 - 90. Oxford. U. K.

Michiels, J. and Vanderleyden, J., 1994. Molecular basis of the establishment and functioning of a N_2 – fixing root nodule. World J. Microbiol. and Biotech. 10: 612 – 630.

Stephens, J.H.G. and Rask, H.M., 2000. Inoculants production and formulation. Field Crops Res. 65: 249 – 258.

Young, R. and Brockwell, R., 1992. Influence of soil pH on the development of symbiosis in field – grown acid – sensitive and acid – tolerant annual medics. Australian Journal of Experimental Agriculture. 32: 167 – 173.

Vance, C.P., 1997. Enhanced agricultural sustainability through biological nitrogen fixation. In: Legocki, A., Bothe, H. and Puhler, A. (Eds.). Biological fixation of nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture. Springer, Berlin. 179 – 186.

Study of similarities between bacteria isolated from *Medicago sativa* and *M. rigidula*

M. Jebelli[1], M.A. Naderi Shahab[1], A.A. Porbabaei[2] and A. Ghamari Zare[1]

1- Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box: 13185-116, Tehran, Iran. E-mail: jebeli@rifr-ac.ir
2- Azad university, Gom.

Abstract

Medicago rigidula L. plants were collected from 3 different sites with 1450-2000m above sea level. Symbiotic *Sinorhizobium* bacteria were isolated from the collected plants. In addition, the symbiotic bacteria were isolated from alfalfa (*Medicago sativa*) as a forage crop. The isolated bacteria from *M. rigidula* and *M. sativa* L. species were identified *via* various biochemical characteristics, utilization of different sugars and litmus milk, tests. Responses of the bacteria to some antibiotics and different NaCl concentrations were evaluated. The *in vivo* experiments, including inoculation of *M. rigidula* seedlings with bacteria isolated from *M. sativa* plants, inoculation of *M. sativa* with bacteria isolated from *M. rigidula* (cross infection) as well as inoculation of *M. rigidula* seedlings with bacteria isolated from this species, were carried out. The results showed similarity between bacteria isolated from the annul medic and alfalfa. Further more, bacteria extracted from one species, can easily establish in root of the other species, and produce nodule. Based on the results obtained from various tests and experiments, the above mentioned bacteria isolated from the both species are *sinorhizobium melliloti*. However, number and size of the nodule produced by bacterium of one species differed from the *Sinorhizobium melliloti* isolated from the other species.

Key words: *Sinorhizobium melliloti, Medicago rigidula, Medicago sativa*, cross infection and nodulation.