فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات مرتع و بیابان ایران
جلد ۱۷، شمارهٔ ٤، صفحهٔ ۵۳۷-۵۲۷ (۱۳۸۹)

جمع‌آوری و شناسایی سوش‌های ریزوبیوم همزیست با شبدرهای استان خوزستان

کورش بهنام‌فر[1]*، ابراهیم رحمانی [2]، حسین حیدری شریف‌آباد[3] و محمدحسن صالحه شوشتری[4]
۱*- نویسنده مسئول، دانشجوی دکترای فیزیولوژی دانشگاه رامین و کارشناس‌ارشد پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان
پست الکترونیک: Ko_behnamfar@ yahoo.com
۲- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان
۳- استاد، بخش تحقیقات مرتع، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور
٤- کارشناس پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

تاریخ دریافت: ۸۷/۰۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۲

چکیده

نیتروژن یکی از مهمترین عناصر غذایی پرمصرف در گیاهان بوده که کمبود آن در خاک از عوامل اصلی محدودکننده رشد گیاهان می‌باشد. این درحالیست که در حدود ۸۰ درصد از گاز موجود در اتمسفر گاز مولکولی نیتروژن بوده که بصورت مستقیم برای گیاهان قابل جذب نمی‌باشد. یکی از مهمترین راه‌های تثبیت نیتروژن موجود در اتمسفر از طریق برقراری همزیستی بین گیاهان تیره بقولات و باکتریهای ریزوبیوم می‌باشد. کودپاشی مراتع بخصوص در مناطق خشک و نیمه‌خشک که همواره با عامل محدودکننده رطوبت مواجه است، موجب می‌گردد تا مقدار کمی از این کودها مورد استفاده قرار گیرد و از طرفی ضمن تحمیل هزینه‌های سنگین سبب آلودگی محیط‌زیست (خاک و آب) شوند. از مهمترین گونه‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در مراتع استان خوزستان، شبدرهای بومی می‌باشند که در این تحقیق به‌مدت ۳ سال با پیمایش‌های صحرایی اقدام به جانمایی و جمع‌آوری نمونه‌هایی از گونه‌های مختلف این شبدرها گردید و در کل تعداد ۷۰ نمونه از ۱۲ گونه شبدر جمع‌آوری و در بررسی‌های آزمایشگاهی ضمن شناسایی گونه‌های شبدر، پس از ریشه‌شویی و جداسازی گره‌های ریشه محتویات آنها بر روی محیط کشت Y.M.A کشت گردید. سپس باکتریهای جداسازی شده طی کشت‌های متوالی خالص‌سازی شدند و براساس خصوصیات مورفولوژیکی و میزان رشد تعداد ۹ سوش از *Rhizobium trifolli* از روی شبدرهای بومی استان خوزستان شناسایی گردید.

واژه‌های کلیدی: سوش ریزوبیوم، شبدر، همزیستی و استان خوزستان.

مقدمه

تخمین زده شده که حدود ٦۵ درصد ازتی که در حال حاضر در کشاورزی مصرف می‌شود از طریق تثبیت بیولوژیک حاصل می‌شود و انتظار می‌رود که در آینده اهمیت بیشتری در این زمینه پیدا کند (Salim sheik et al., 2000). البته تثبیت ازت در گیاهان شامل تبدیل ازت موجود در اتمسفر به آمونیوم می‌باشد. این واکنش تنها به وسیلهٔ میکروارگانیسم‌های پروکاریوت و با استفاده از آنزیم نیتروژناز صورت می‌گیرد. میکروارگانیسم‌های تثبت‌کننده ازت در بیشتر رویشگاه‌های گیاهی یافت

می‌شوند. به‌طوری‌که مهمترین آنها از نظر میزان تثبیت سالانه ازت، در عرصه‌های کشاورزی آنهایی هستند که در تشکیل گره روی ریشه گیاهان نقش دارند که برترین آنها را *Rhizobium* و *B Bradyrhizobium* تشخیص داده‌اند که به طور عمده روی ریشه لگوم‌های تشکیل گره می‌دهند. بنابراین میزان تثبیت سالانهٔ ازت توسط این میکروارگانیسم‌ها با توجه به گیاه میزبان، نوع خاک و شرایط محیطی متفاوت بوده و بین ۳۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم در هکتار در هر سال تخمین زده شده است (Beringer, 1974). میزان تثبیت بیولوژیک ازت در بقولات مرتعی سالانه در حدود ٦٨-۱۳ کیلوگرم در هکتار برآورد می‌شود (محمودی، ۱۳۷٤).

Fred *et al.*, (1932) مسئله اختصاصی بودن میزبان در سوش‌های ریزوبیوم را کشف و هشت گروه اصلی از خانواده ریزوبیاسه (*Rhizobiaceae*) را به‌همراه میزبان‌های مربوطه بشرح زیر معرفی کردند:

۱- گروه یونجه برای کلیه گونه‌ها و واریته‌های یونجه با نام *Rhizobium meliloti*

۲- گروه شبدر برای کلیه گونه‌های شبدر با نام *R. trifolli*

۳- گروه نخود و ماشک برای گونه‌های نخود، ماشک، عدس، خلر و باقلا با نام *R. leguminosarum*

٤- گروه لوبیا با نام *R. phaseoli*

۵- گروه سویا با نام *R. japonicum*

٦- گروه لوبیا چشم بلبلی

۷- گروه لوپن

۸- گروه متفرقه (به نقل از کریمی، ۱۳٦۹)

Pater van *et al.*, (1995) جدیدترین گروه‌های ریزوبیومی را مشتمل بر ۱۹ گروه به‌همراه گیاهان میزبان معرفی کردند.

رحمانی (۱۳۸۰) توانست ۲٦ سوش ریزوبیوم را از روی لگوم‌های مرتعی در استان‌های کردستان، لرستان، تهران و آذربایجان‌غربی جداسازی و شناسایی نماید که عمدتاً سوش‌های ریزوبیوم ملیلوتی روی یونجه‌ها و ریزوبیوم تریفولی روی شبدرها بودند. شعبان‌زاده و همکاران (۱۳۸٤) موفق به استخراج و شناسایی ۷ سوش باکتری *Rhizobium meliloti* از روی یونجه و اسپرس‌های مرتعی استان اصفهان شدند. همچنین آسترکی و همکاران (۱۳۸٤) در طی ۳ سال بررسی‌های خود موفق به معرفی مجموعه‌ای از سوش‌های بومی ریزوبیوم همزیست با ماشک موجود در استان لرستان شدند. در بررسی دیگری که توسط خاورزی و صالح راستین (۱۳۷٤) انجام شد ۳۵ سویه ریزوبیوم تریفولی از استان‌های مازندران، لرستان، مرکزی و فارس جمع‌آوری نمودند و پس از بررسی توان تثبیت ازت این سویه‌ها، اعلام نمودند که در خاک‌های کشور سویه‌های خوبی از ریزوبیوم تریفولی با قدرت بالای تثبیت ازت وجود دارد که میزان تثبیت از آنها در محیط گلخانه در حدود ۲۰٦ تا ۱۸٦ کیلوگرم ازت در هکتار برای شبدر مصری و ایرانی تخمین زده می‌شود.

Fabiano *et al.*, (1994) نیز نسبت به جمع‌آوری ٦۷ ایزوله از ریزوبیوم‌های همزیست با لگوم‌های مختلف (یونجه‌ها، شبدرها، لوتوس‌ها و یونجه گل زرد) از مناطق مختلف اوروگوئه اقدام نمودند و پس از بررسی میزان تثبیت ازت آنها اعلام داشتند که بالاترین میزان تثبیت ازت مربوط به ریزوبیوم‌های همزیست با یونجه‌ها و شبدرها می‌باشد، هرچند که باکتریهای همزیست با لوتوس نیز از وضعیت خوبی برخوردار بودند. اما از طرفی مطابق نتایج بررسی‌های بعمل‌آمده توسط Materon (1991)

ریزوبیوم‌های موجود در خاک‌ها به چهار گروه خیلی مؤثر، کمی مؤثر، مؤثر جزئی و بدون تشکیل گره تقسیم شدند که می‌توان نتیجه گرفت که بسیاری از خاک‌ها ممکن است حاوی ریزوبیوم‌های مؤثر نباشند، بنابراین لازم است تا قبل از هر گونه برنامه‌ریزی جهت استفاده از قابلیت تثبیت بیولوژیک ازت در مراتع نسبت به بررسی وضعیت همزیستی این باکتریها با گونه‌های مرتعی اقدام نمود.

Charman & Ballard, (2000) همزیستی ۱۱ گونه یونجه یکساله را در ۲۸ منطقه از جنوب استرالیا مورد بررسی قرار دادند، نتایج حکایت از آن داشت که بین گونه‌های مختلف یونجه یکساله در برقراری ارتباط همزیستی اختلاف معنی‌دار وجود دارد. به‌طوری‌که گونه (*M. praecox*) با ٦٧٪ بیشترین و گونه(*M.rigidulodes*) با ۳٪ کمترین مقدار همزیستی را ایجاد کردند، همچنین گزارش نمودند که ریشه‌های گونه *(M. laciniata)* فاقد غده بود. در این بررسی تعداد باکترهای موجود در خاک نیز شمارش شد بطوری‌که تعداد باکتری موجود در یک گرم خاک بین ٤٠ تا ۱۵۰۰۰۰۰ عدد تخمین زده شد.

دشتی و همکاران (۱۳۸۲) کاربرد باکتریهای تثبیت‌کننده نیتروژن را به‌عنوان راهکاری جهت کاهش آلودگی آب و خاک مورد بررسی قرار دادند و با بررسی نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از مناطق مختلف استان خراسان (ترجیحاً مناطق خشک و شور) در یک آزمایش گلخانه‌ای دریافتند که تنها در دو نمونه خاک، تلقیح مصنوعی بذرها یا خاک ضروری بوده و در سایر خاک‌ها باکتریهای بومی حضور دارند.

اسدی رحمانی و همکاران (۱۳۸۲) با جمع‌آوری ۸۳ سویه ریزوبیوم همزیست از گره‌های ریشه‌ای لوبیا از سراسر کشور، دریافتند که میان سویه‌های بومی ریزوبیوم اختلافاتی از نظر میزان تأثیر بر افزایش عملکرد لوبیا وجود دارد و می‌توان با انتخاب سویه‌های برتر ریزوبیوم همزیست با لوبیا، سبب افزایش عملکرد با مصرف حداقل کود ازتی گردید.

اصغرزاده و همکاران (۱۳۸۲) در مقایسه‌ای که بین سویه‌های خارجی، سویه‌های برتر داخلی و ایزوله‌های بومی باکتری *Mesorhizobium ciceri* از نظر تثبیت بیولوژیک ازت بر روی گیاه نخود در ۱۰ استان کشور انجام دادند؛ نتایج آزمایش را این‌گونه اعلام کردند: در آزمایش‌های دیم و آبی همیشه حداقل یک تیمار ریزوبیومی وجود دارد که نه‌تنها می‌تواند جایگزین کود ازته گردد بلکه حتی گاهی افزایش محصولی بیشتر از کود ازته نیز دارد. مضافاً اینکه در بیشتر موارد باکتریهای بومی ایران بر باکتریهای خارجی برتری داشتند.

باپیری و همکاران (۱۳۸۲) در تحقیقی که بر روی تحمل به خشکی ۲۵ جدایهٔ *Sinorhizobium* در دو حالت آزادزی و همزیستی انجام دادند دریافتند که میان جدایه‌های مختلف واکنش‌های متفاوتی در مقابل تنش‌های مختلف خشکی وجود دارد که این واکنش در حالت همزیستی و حالت آزادزی از الگوهای مستقلی تبعیت می‌نماید.

جنس شبدر (*Tirifolium*) جزء مهمترین گیاهان علوفه‌ی خانواده بقولات بوده که از نظر علوفه‌ای و مرتعی دارای ارزش بسیار زیادی است و در تغذیه دام نیز اهمیت به‌سزایی دارد. ارزش این جنس از لحاظ علوفه بدلیل تنوع گونه‌ای، دامنهٔ سازگاری آن با شرایط اقلیمی وسیع و درصد پروتئین بالای موجود در اندام‌های هوایی آن می‌باشد. تعداد گونه‌های شبدر در جهان حدود ۲۵۰ گونه

بوده که بیشتر در آسیا، اروپا، آفریقا و آمریکا گسترش دارند (کفاش و رجامند، ۱۳٦۲). در منابع مختلف حدود ٤٤ گونه از این جنس در نقاط مختلف ایران با وضعیت اقلیمی متنوع و انواعی از خاک‌ها گزارش شده است.

استان خوزستان با داشتن حدود ۳/۸ میلیون هکتار اراضی مرتعی که بخش عمده‌ای از آن در مناطق نیمه‌استپی‌گرم بوده رویشگاه طبیعی حدود ۱۲ تا ۱۳ گونه شبدر می‌باشد (مظفریان، ۱۳۷۸). وجود مشکلاتی در زمینه کودپاشی این اراضی (به‌منظور بهبود وضعیت پوشش گیاهی) به‌دلیل وضعیت نامناسب رطوبت از یک طرف و سازگاری گونه‌های مختلف شبدر در این مناطق از طرف دیگر باعث شد که تفکر بر روی استفاده از قابلیت تثبیت بیولوژیک ازت، درصورت حضور کافی باکتریهای ریزوبیوم در خاک این عرصه‌ها قوت بگیرد. بنابراین با اجرای این تحقیق، ضمن اطمینان از حضور باکتریهای *R. trifolli* در سطح مراتع استان، اقدام به شناسایی و جانمایی آنها شد تا در تحقیقات بعدی توانایی تثبیت نیتروژن آنها مورد بررسی قرار گرفته و در برنامه‌های کلان جهت کمک به احیاء پوشش گیاهی مراتع مورد بهره‌برداری قرار گیرند.

مواد و روشها

استان خوزستان دارای ۳/۸ تا ٤ میلیون هکتار مرتع بوده که در مناطق سه‌گانهٔ آب و هوایی استپی‌گرم، نیمه‌استپی‌گرم و جنگل‌های خشک و مراتع ییلاقی بصورت مراتع مشجر و غیرمشجر پراکنده می‌باشند. براساس بررسی‌های بعمل‌آمده با توجه به خواستگاه اکولوژیکی جنس شبدر، حدود ۱۳ گونه (مطابق جدول یک) از آن در قسمت‌های نیمه‌استپی‌گرم، جنگل‌های خشک و مراتع ییلاقی که به‌ترتیب دارای متوسط بارندگی ٤۰۰ تا ۲۳۰ میلی‌متر و بیش از ٤۰۰ میلی‌متر و ارتفاع ۹۰۰ تا ۱۵۰ متر و بیش از ۹۰۰ متر از سطح دریا بوده پراکنده می‌باشند، زیرا در این قسمت از مراتع استان خاک از نظر Ec و pH دارای کمترین محدودیت بوده و همچنین وضعیت آب و هوایی و بارندگی از شرایط بهتری برخوردار می‌باشند.

با توجه به کثرت گونه‌های شبدر استان و نیز گستردگی رویشگاه‌های آنها (قسمت عمدهٔ مراتع استان) و نیز برای داشتن یک برنامه نسبتاً منظم در مراجعات صحرایی، ابتدا به کمک نمونه‌های هرباریومی و فلورهای موجود اقدام به شناسایی گونه‌های مختلف شبدر شد. سپس با بررسی نقشه‌های پوشش گیاهی و منابع دیگر (فلورها، گزارشها، اطلاعات هرباریوم و ...) محدودهٔ پراکنش هرگونه تا حدودی مشخص گردید و در هر منطقه رویشی محدوده‌هایی جهت نمونه‌برداری انتخاب شد. به‌طوری‌که کوتاه بودن دورهٔ گلدهی شبدرها در استان خوزستان موجب محدود شدن زمان نمونه‌برداری می‌گردد، زیرا از یک طرف به دلیل تنوع گونه‌ای، وجود گل جهت شناسایی گونه‌ها امری الزامی بشمارآمده و از طرف دیگر گرمای زودرس در اوایل بهار موجب ریزش گل‌ها و تقریباً خشک‌شدن گیاهان مورد نظر خواهد شد. بنابراین در زمان مناسب (حدوداً ۲۰ اسفندماه لغایت ۲۰ فروردین‌ماه) پس از حضور در عرصه‌های مرتعی اقدام به پیمایش‌های صحرایی برای یافتن و شناسایی گونه‌های شبدر گردید که پس از یافتن گونه‌های مورد نظر، گیاه کامل همراه با خاک اطراف ریشه خارج و به‌منظور جلوگیری از خشک‌شدن خاک و قطع ریشه‌ها، بلافاصله نمونه‌ها در کیسه‌های نایلونی قرار داده شد و مقداری آب

به خاک مذکور اضافه و اقدام به اتیکت‌گذاری و ثبت مشخصات محل جمع‌آوری گردید. پس از آن جهت انجام عملیات بعدی به آزمایشگاه منتقل شدند.

در آزمایشگاه ابتدا عملیات ریشه‌شویی نمونه‌ها با جریان آب ملایم انجام شد و اندام‌های هوایی به هرباریوم جهت شناسایی دقیق گونه‌های شبدر انتقال داده شد. سپس غده‌های روی ریشه جداسازی و به کمک الکل ۹۰٪ و Hg_2cl_2 سترون شدند و محتویات آنها در شرایط کاملاً سترون بر روی محیط کشت Y.M.A[1]، کشت گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بمدت ۲ تا ۵ روز در اتاقک رشد قرار داده شدند، خالص‌سازی باکتری‌های رشد کرده برروی محیط کشت تا حصول کلنی‌های تک ادامه یافت و درنهایت کشت نمونه‌های خالص در شیشه‌های درب‌دار به‌منظور شناسایی باکتریهای جمع‌آوری شده انجام شد.

نتایج

در طول ۳ سال اجرای این تحقیق با مراجعه به رویشگاه‌های گزارش شده و احتمالی در زمان مناسب جمع‌آوری نمونه و جستجو در قسمت‌های آبگیر و نقاطی که دور از دسترس دام‌ها بود حدوداً ۷۰ نمونه از ۱۲ گونه شبدر جمع‌آوری گردید (جدول ۲).

پس از جداسازی و ضدعفونی غده‌های روی ریشه‌های آنها و کشت محتویات آنها بر روی محیط کشت Y.M.A مطابق روش استاندارد، حضور باکتری *Rhizobium trifolli* در آنها به اثبات رسید و درنهایت تعداد ۹ سوش ریزوبیوم تریفولی از گونه‌های مختلف شبدرهای مرتعی استان خوزستان (۱۲ گونه) استخراج و شناسایی شدند که همگی قادر به برقراری فعالیت‌های همزیستی با میزان‌های خود بودند.

این نکته قابل ذکر است که شکل، اندازه و تراکم غده‌های روی ریشه در گونه‌های مختلف با یکدیگر متفاوت بود (شکل ۱). در این میان، تنها یک نمونه *Tirifolium tomentosa* که از کنار دریاچهٔ برمه‌شور هفتگل جمع‌آوری شد، فاقد غده‌های تثبیت‌کننده و نیز فاقد هر گونه باکتری در بافت‌های ریشهٔ خود بود که احتمالاً علت آن شوری خاک رویشگاه بود.

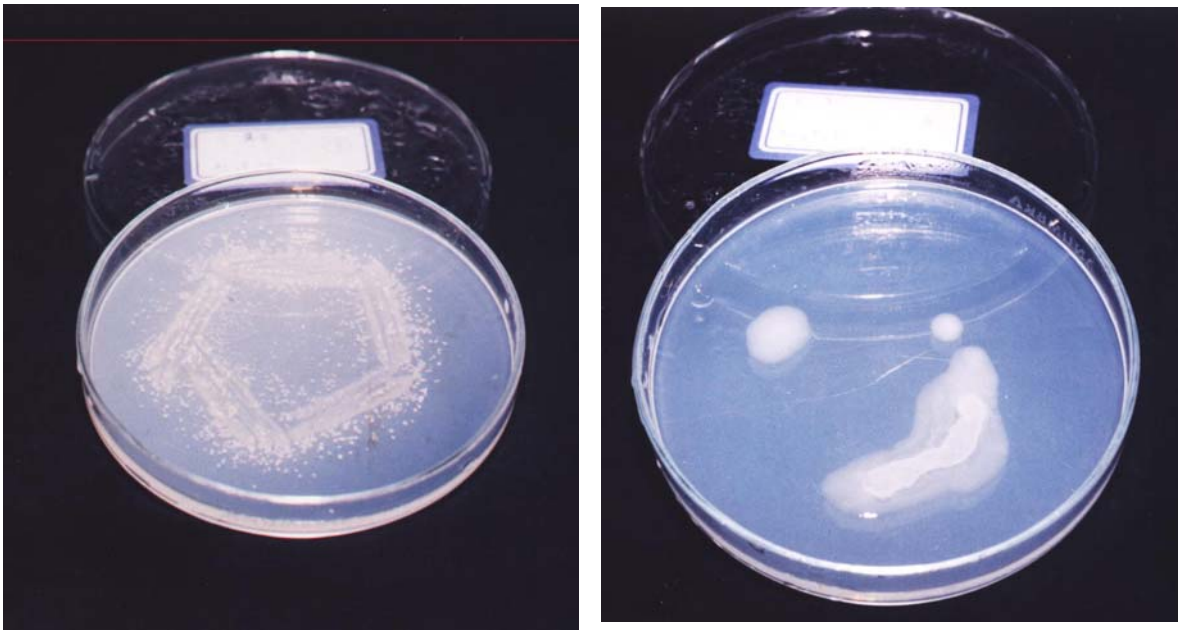
بررسی مدت زمان رشد کلنی‌های خالص‌شده بر روی محیط کشت نشان داد که تقریباً بیش از ۹۵ درصد از نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در فاصله زمانی ٤۸ تا ۷۲ ساعت رشد نمودند (شکل۲).

بیشترین تعداد نمونهٔ جمع‌آوری شده مربوط به گونه‌های *T.Compestre* و *Tirifolium tomentosa* بود که دارای دامنهٔ پراکنش گسترده‌تری نسبت به سایر گونه‌های شبدر در استان می‌باشد و گونه‌های *T.angustifolium* ، *T.echinatum* و *T.purpureum* که رویشگاه‌های آنها عمدتاً مناطق کوهستانی بوده دارای کمترین تعداد نمونه بودند (جدول ۲).

به‌طوری‌که بیشترین تعداد نمونه جمع‌آوری شده مربوط به شهرستان‌های مسجدسلیمان و دزفول بود که در محدودهٔ آب و هوایی نیمه‌استپی گرم استان خوزستان قرار دارند و کمترین تعداد نمونه مربوط به شهرستان‌های هفتگل و رامهرمز بود که از نظر وضعیت خاک تا حدودی دارای محدودیت (بخصوص از نظر Ec) می‌باشند. جدول ۳ نقاط جمع‌آوری گونه‌های مختلف شبدر در طول آزمایش را نشان می‌دهد.

1-Yeast Manitol Agar

شکل۱- نمونه‌هایی از شبدرهای جمع‌آوری‌شده استان همراه با غده‌های تثبیت ازت ریشه
(بالا: *Tirifolium campestre*؛ پایین راست : *T. stellatum*؛ پایین چپ: *T. tomentosum*)



شکل۲- نمونه‌هایی از باکتریهای *Rhizobium trifolli* استخراج شده که بر روی محیط‌کشت Y.M.A رشد نموده‌اند.

جدول ۱- گونه‌های مختلف شبدر گزارش شده برای استان خوزستان (مظفریان، ۱۳۷۸)

ردیف	نام گونه	ردیف	نام گونه
۱	*Tirifolium ongustifolium*	۸	*T. loppaceum*
۲	*T. bullatum*	۹	*T. purpureum*
۳	*T. clusii*	۱۰	*T. resupinatum*
٤	*T. campestre*	۱۱	*T. scabrum*
۵	*T. dasyurum*	۱۲	*T. stellatum*
٦	*T. echinatum*	۱۳	*T. tomentosum*
۷	*T. grandiflorum*		

جدول ۲- تعداد نمونه گونه‌های مختلف شبدر جمع‌آوری شده در طول اجرای طرح

ردیف	نام گونه	تعداد نمونهٔ جمع‌آوری شده			
		سال ۷۹	سال ۸۰	سال ۸۱	جمع کل
۱	*Tirifolium tomentosum*	٤	۵	۷	۱٦
۲	*T. compestre*	۲	٤	۵	۱۱
۳	*T. lappaceum*	۱	۲	۵	۸
٤	*T. resupinatum*	۳	۱	۳	۷
۵	*T. stellatum*	۲	۱	۲	۵
٦	*T. scabrum*	۱	۱	۳	۵
۷	*T. grandiflorum*	–	–	۳	۳
۸	*T. dasyurum*	–	–	۳	۳
۹	*T. clusii*	–	–	۳	۳
۱۰	*T. purpureum*	–	–	۲	۲
۱۱	*T. angustifolium*	۱	۱	–	۲
۱۲	*T. echinatum*	۲	–	–	۲

جدول ۳- مناطق جمع‌آوری گونه‌های مختلف شبدر در طول اجرای آزمایش

ردیف	نام گونه شبدر	مناطق جمع‌آوری سال ۱۳۷۹	مناطق جمع‌آوری سال ۱۳۸۰	مناطق جمع‌آوری سال ۱۳۸۱
۱	*Tirifolium compestre*	بهبهان کیلومتر ۱۰ ـ ایذه مال آقا	مسجدسلیمان لالی ـ مسجدسلیمان دره خرسان ـ شوشتر آب بید ـ دزفول سردشت	شوشترعقیلی ـ دزفول شهیون بیشه‌بزان ـ دزفول شهیون لیوس ـ مسجدسلیمان اندیکا حسن‌آباد ـ باغملک کیلومتر ۲۰ جاده ایذه
۲	*T.tomentosum*	مسجدسلیمان اندیکا رستم آباد ـ بهبهان ـ مسجدسلیمان لالی امامزاده ابوالقاسم ـ دزفول دره دیونی	مسجدسلیمان لالی ـ مسجدسلیمان دو دره ـ شوشتر آب بید ـ هفتگل آسماری ـ دزفول سردشت	دزفول شهیون بیشه بزان ـ مسجدسلیمان قلعه خواجه ـ باغملک ـ مسجدسلیمان سلطان ابراهیم ـ بهبهان جایزان ـ شوشتر عقیلی علی آباد ـ شوشتر عقیلی امامزاده زید
۳	*T.resupinatum*	لالی امامزاده ابوالقاسم ـ شوشتر عقیلی امامزاده زید ـ مسجدسلیمان قلعه خواجه	رامهرمز زبیده موسی	مسجدسلیمان لالی ـ دزفول سردشت ـ دزفول شهیون
٤	*T.stellatum*	مسجدسلیمان اندیکا حسن آباد ـ مسجدسلیمان لالی امامزاده ابوالقاسم	مسجدسلیمان لالی	دزفول شهیون ـ مسجدسلیمان لالی سلطان ابراهیم
۵	*T.Lappaceum*	باغملک امامزاده عبداله	مسجدسلیمان دره خرسان ـ دزفول شهیون	مسجدسلیمان‌آب‌بهار ـ مسجدسلیمان‌دوآب‌اندیکا ـ مسجدسلیمان شین بار ـ مسجدسلیمان دو دره ـ دزفول سردشت
٦	*T.scabrum*	ایذه دهدز بلوط بلند	ایذه اتابکی	دزفول سد دز ـ مسجدسلیمان شین بار ـ مسجدسلیمان دودره
۷	*T.grandiflorum*	ـ	ـ	ایذه آبخوگان ـ ایذه دهدز بلوط بلند ـ باغملک دشت گل
۸	*T.dasyurum*	ـ	ـ	دزفول سد دز ـ بهبهان ـ مسجدسلیمان لالی
۹	*T.purpureum*	ـ	ـ	اندیمشک پل زال ـ دزفول سد دز
۱۰	*T.clusii*	ـ	ـ	رامهرمز قیطاس ـ بهبهان جایزان ـ باغملک سلطان ابراهیم
۱۱	*T.angustifolium*	دزفول سد دز	مسجدسلیمان لالی	ـ
۱۲	*T.echinatum*	ایذه دهدز بلوط بلند ـ ایذه دهدز کوه سفید	ـ	ـ

بحث

باتوجه به گستردگی دامنه پراکنش گونه‌های جنس شبدر در مراتع نیمه‌استپی گرم استان خوزستان و نیز مطابق نتایج بدست‌آمده روشن شد که به‌رغم بهره‌برداریهای بی‌رویه و تغییرات فاحش ایجادشده در وضعیت این مراتع (خاک و پوشش گیاهی) هنوز هم در نقاطی که امکان رویش و استقرار گونه‌های مختلف شبدر وجود دارد می‌توان حضور باکتریهای ریزوبیوم تریفولی را که عامل اصلی تثبیت ازت بصورت همزیست با شبدرها است را انتظار داشت. بی‌شک تأمین ازت مورد نیاز گونه‌های مرتعی یکی از راه‌های کمک به احیاء پوشش گیاهی مراتع است و از طرفی در مناطق خشک و نیمه‌خشک به‌دلیل اینکه هیچ‌گونه تضمینی جهت تأمین رطوبت مطلوب در زمان مناسب کودپاشی وجود ندارد، بنابراین بهترین راه برای افزایش حاصل‌خیزی خاک مراتع، وارد نمودن بقولات مرتعی در ترکیب پوشش گیاهی این عرصه‌هاست تا علاوه بر افزایش کیفیت علوفه تولید شده از سطح مرتع (به‌دلیل ارزش بالای غذایی این گونه‌ها) بتوان از قابلیت تثبیت‌بیولوژیک نیتروژن توسط این گیاهان و باکتریهای همزیست، جهت تقویت خاک و افزایش رشد سایر گونه‌های مرتعی و در نتیجه بهبود وضعیت تولید علوفه مرتع بهره جست.

به طور کلی تعداد نمونه‌های جمع‌آوری شده حاوی گره‌های ریشه، از مناطق مختلف استان متأثر از وضعیت خاک رویشگاه‌ها بود، بنحوی که در مناطقی که خاک تا حدودی دارای محدودیت شوری بود تعداد نمونه‌ها بشدت کاهش یافت که این خود می‌تواند مؤید حساس‌بودن این باکتری‌ها به شوری باشد. جلال زاده و همکاران (۱۳۸٤) نیز با بررسی جدایه‌های ریزوبیوم تریفولی با گونه‌های مختلف شبدر از نمونه‌های خاک‌های هفت منطقه کشور (استان‌های: لرستان، اصفهان، خراسان، همدان، کرمانشاه، کردستان و آذربایجان‌غربی) اعلام داشتند که هیچ‌یک از سویه‌های جدا شده نسبت به درجات بالای شوری مقاوم نمی‌باشند. بنابراین می‌توان از گونه‌های مختلف این جنس به‌عنوان یکی از عناصر اصلی در برنامه‌های احیاء پوشش گیاهی این مراتع بخصوص در نقاطی که محدودیت شوری وجود ندارد استفاده نمود.

سپاسگزاري

این مقاله مستخرج از نتایج طرح تحقیقاتی «جمع‌آوری سوش‌های ریزوبیوم همزیست با شبدرهای استان خوزستان» با شماره مصوب ۰۳-۰۳۱۰۲٦۰۰۰-۷۸ بوده که نگارندگان برخود لازم می‌دانند از رهنمودهای ارزشمند استادان ارجمند جناب آقای دکتر عباسعلی سندگل و آقای دکتر ولی‌ا.. مظفریان کمال تشکر و قدردانی را بنمایند. همچنین از رؤسای محترم وقت و پیشین مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به‌جهت فراهم‌آوردن امکان اجرای این تحقیق بخصوص جناب آقای دکتر محمدحسن عصاره که با فراهم‌آوردن شرایط و محیط مناسب آزمایشگاهی ادامه راه را هموار نمودند سپاسگزاری می‌نماییم. از همکاران ارجمند مهندس فرزاد صباغ‌زاده و آقای رجبعلی محمدی که در طول اجرای این تحقیق ما را یاری نمودند تشکر و قدردانی می‌نمائیم. همچنین از زحمات سرکار خانم ژیلا آل‌خمیس بدلیل تایپ رایانه‌ای این مقاله تشکر می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- آسترکی، ح.، سپهوند، ع.، محمدیان، ع. و ولیزاده، ن.، ۱۳۸٤. بررسی تثبیت بیولوژیک نیتروژن در گونه‌های ماشک. مجموعه مقالات اولین همایش ملی حبوبات، شهد مقدس - پژوهشکده

علـوم گیـاهی دانشـگاه فردوسـی مشـهد ۲۹ و ۳۰ آبـان ۱۳۸٤، صفحات ۳۸۰- ۳۷۸.

- اسدی رحمانی، ه.، افشاری، م.، نورقلی‌پور، ف.، خلفی، ه. و ۱۳۸۲. اثر تلقیح بذر لوبیا با سویه‌های ریزوبیومی بومی ایران بر عملکرد و خصوصیات کیفی لوبیا. ۳۰۹-۳۰۸. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. خلاصه مقالات سومین همایش ملی توسعه‌ی کاربرد مواد بیولوژیک و استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی. تهران نشر آموزشی کشاورزی، ۷۸۰ صفحه.
- اصغرزاده، الف.، افشاری، م.، توشیع، و.، توسلی، ع.، دانشی، ن.، قاسم‌زاده گنجه‌ای، م.، شریعمتداری، م.، محمودی، ح.، اسدی، م.، سلیمانی، ر.، رستمی، الف.، کلهر، م. و بلسون، و.، ۱۳۸۲. تلقیح ریزوبیومی نخود *(Cicer arietinum)* در ایران آری یا خیر. ۳۱۳- ۳۱۲. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. خلاصه مقالات سومین همایش ملی توسعه کاربردی مواد بیولوژیک و استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی تهران. نشر آموزش کشاورزی، ۷۸۰ صفحه.
- باپیری، الف.، خاوازی، ک. و ارزانش، م.، ۱۳۸۲. بررسی تحمل به خشکی در بعضی از جدایه‌های *Sinorhizobium meliloti*. ۳۰۱. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی خلاصه مقالات سومین همایش ملی توسعهٔ کاربردی مواد بیولوژیک و استفادهٔ بهینه از کود و سم در کشاورزی تهران. نشر آموزش کشاورزی، ۷۸۰ صفحه.
- جلال زاده مقدم شهری، ب.، بهـار، م. و رزمجـو، خ.، ۱۳۸٤. بررسـی تنوع ژنتیکی ریزوبیوم‌های بومی همزیست با شبدر در ایران . پایـان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی اصفهان، دانشکده کشاورزی .
- خـاورزی، ک. و صـالح راسـتین، ن.، ۱۳۷٤. بررسـی تثبیـت ازت مولکولی و تولید سیدروفور توسط سویه‌های ریزوبیوم تریفـولی بومی خاک‌هایی از ایران. پایان نامه کارشناسـی ارشـد، دانشـگاه تربیت مدرس تهران، ۱۸۰ صفحه.
- دشتی، م.، لکزیان، الف. و حیدری‌شریف‌آبادی، ح.، ۱۳۸۲. استفاده از باکتریهای تثبیت‌کنندهٔ نیتروژن راهکارهای مناسب جهت کاهش آلودگی آب و خاک. ۳٤۸-۳٤۷. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، خلاصه مقالات سومین همایش ملی توسعه کاربرد مواد بیولوژیک و استفاده‌ی بهینه از کود و سم در کشاورزی. تهران. نشر آموزش کشاورزی، ۷۸۰. صفحه.
- رحمانی، ا.، ۱۳۸۰. گزارش نهایی طرح پژوهشی (جمع‌آوری و شناسایی سویه‌های ریزوبیم همزیست با مهم‌ترین بقولات مرتعی) مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.
- شفیع زاد، ش.، سیف الهی، الف. و اسکندری، ذ.، ۱۳۸٦. استخراج و شناسایی سوش‌های ریزوبیوم همزیست با مهم‌ترین لگوم‌هـای مرتعی از استان اصفهان. فصلنامه علمـی - پژوهشـی تحقیقـات مرتع و بیابان ایران، جلد ۱٤ف شماره ۳، صفحات ۳۱۲-۳۰۲.
- کریمی، ه.، ۱۳٦۹. زراعت و اصلاح گیاهان علوفه‌ای. تهران انتشارات دانشگاه تهران، ٤۱٤ صفحه.
- کفاشی، ذ. و رجامند، م.، ۱۳٦۲. معرفی شبدرهای ایران و روش‌های شناسایی آنها، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور.
- محمـودی، م.، ۱۳۷٤. بررسـی پراکنـدگی طبیعـی بـاکتری‌هـای ریزوبیوم و تأثیر بعضی شاخص‌های اکولوژیکی مؤثر

بر رشد آنها در منطقه اصفهان. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشـکده علوم دانشگاه اصفهان.

- مظفریان، و.، ۱۳۷۸. فلور خوزستان، اهواز. مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام خوزستان، ۲۸۲ صفحه.

- Ballard, R.A. and Charman, N., 2000. Nodulation and growth of pasture legumes with naturalized soil rhizobia .1. Annual *Medicago* spp. Australian Journal of Experiment Agriculture 40(7) 939-948.
- Beringer, J.E., 1974. R factor transfor in Rhizobium Leguminosarum. Jornal Gen.

Microbiology , 84 , 188-198.

- Fabiano, E., Gualtierj, G., Pritsch, C., pollA, G. and Arias, A., 1994. Extent of high – affinily iron transport systems in field isolates of rhizobia. Plant and Soil J. , vol. 164, n°2, pp. 177-185.
- Fred, E.B., Baldwin, I.L. and Nccov, E., 1932. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. U.S.A: University of Wisconsin studies In. Science Number: 5 MADISON. Available: http:// chlalibrary. Cornell. edu/cgi/t/text- idx? C= cha; idno= 3069238, accessed 2 November 2005.
- Materon, L.A., 1991. 5 Symbiotic characteristics of Rhizobium meliloti in west asian soil. Soil Biology and Biochemistry , 23, 429-434.
- Pater van, B., Fuhrmann, J.J. and Eardly, B.D., 1995. Nitrogen Fixation : From Molecules to Crop Productivity. Netherland: Springer Netherland.
- Salim sheikh, A.A., Shaukat, H., Oamar, I.A. and Kan, B.R., 2000. Breeding Food and forage Legumes for enhancement of nitrogen fixation :A review. Science Vision, Islamabad, Pakistan. 6 (1): 49-57.

Collection and Identification of Symbiotic Rhizobium with *Trifolium* species in Khuzestan province

Behnamfar, K.*[1], Rahmani, E.[2], Heidari Sharifabad, H.[3] and Salehe Shoshtari, M.H.[4]

1*-Ph.D. student of Physiology, Ramin University & Senior Research Expert, Research Center of Agriculture and Natural Resources, Khuzestan, Iran, Email: Ko_ behnamfar@ yahoo.com
2-Assistant Professor, Research Center of Agriculture and Natural Resources, Lorestan, Iran.
3-Professor, Research institute of forests and rangelands, Tehran, Iran.
4- Research Expert, Research Center of Agriculture and Natural Resources, Khuzestan, Iran.

Received:02.12.2008 Accepted:03.03.2010

Abstract:

Nitrogen is one of the most important macro nutrients in plants which its shortage in soil is the main factor limiting plant growth. Nitrogen molecular gas comprises about 80 % of the atmospheric gases whereas it is not directly absorbable in plants. A symbiosis of legumes and rhizobia is one of the most important ways in nitrogen fixation. Fertilizer application in rangelands especially in arid and semi arid regions which always faces limiting moisture will result in small efficiency of the fertilizer and also imposes heavy costs due to environmental pollution (soil and water). Native *Trifolium species* are of utmost nitrogen fixers in Khuzestan rangelands. This experiment was carried out in 3 years to isolate, identify and introduce *rhizobium strain* of the native *Trifolium species* in Khuzestan. A total number of 70 samples were collected from 12 *Trifolium* species and after root washing and separation of root nodules in laboratory, the *rhizobium* bacteria were planted and isolated on YMA. Finally, 9 strains of *Rhizobium trifolli* were identified based on morphological characteristics and growth rate.

Key words: *Rhizobium, Trifolium*, symbiosis, Khuzestan.