مجله تحقیقات آب و خاک ایران (۴۲) ۱، ۱۳۹۰ (۱۶۱-۱۵۵)

بررسی توان تحمل به شوری وخشکی جدایه های ریزوبیومی همزیست عدس در شرایط درون شیشه ای

حسینعلی علیخانی

دانشیار، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۵/۱۴- تاریخ تصویب: ۱۳۸۹/۱۱/۱۹)

چکیده

در این پژوهش ۲۲۰ جدایه ی ریزوبیومی از دو دشت کشت دیم عدس (مغان و کوهین) نمونه‌برداری و مورد آزمون قرار گرفت. با انجام آزمایشات آزمایشگاهی و گلخانه ای(انجام آزمون PIT) از صحت جنس،گونه و خلوص۱۸۹ سویه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه* (lenti) *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciea* (*Rlv*) همزیست عدس اطمینان حاصل شد. تست تحمل به شوری جدایه های ریزوبیومی با استفاده از محیط کشت YMA+ BTB و نمک NaCl در شوری های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و۵۰ dS/m انجام شد. از بین۱۸۹سویه ی ریزوبیومی همزیست عدس تعداد ۱۰۱ سویه ریزوبیومی کاملاً حساس (EC=10 dS/m) و تعداد ۲۵ سویه به عنوان خیلی متحمل و ۱۰ سویه به عنوان سویه های برتر (سوپر استرین های) کاملا" متحمل به شوری در EC=50 بودند. تعداد باکتریهای ریزوبیومی رشد یافته مربوط به دشت کوهین در شوری های ۱۰ تا ۵۰ به ترتیب ۵۵، ۵۱، ۵۰، ۲۷ و ۳۷ سویه بود در صورتیکه در دشت مغان این اعداد به ترتیب برابر ۴۶، ۴۲، ۲۱، ۸ و ۸ سویه بود، بطور کلی تحمل به شوری باکتریهای ریزوبیومی دشت کوهین بیشتر از باکتریهای ریزوبیومی دشت مغان بود. دراین پژوهش میزان تحمل به خشکی سویه های ریزوبیومی در محیط کشت YMB +PEG انجام پذیرفت. در این آزمون میزان خشکی بر اساس دانستیه ی نوری (O.D) سوسپانسیون باکتریایی تعیین گردید. میزان تحمل به خشکی باکتریهای ریزوبیومی در چهار سطح کاملاً متحمل، متحمل ، حساس و کاملاً حساس به خشکی ترتیب برابر با O.D> 0.5 , O.D=0.4-0.5, O.D=0.3-0.4 و O.D < 0.3 گروه بندی شد. از بین ۱۰ سوپراسترین (سویه های کاملا" متحمل) انتخاب شده در آزمون میزان تحمل به خشکی، باکتری های برتر دشت مغان شامل ۶ سویه در صورتی که باکتریهای برتر مربوط به دشت کوهین ۲ سویه بود. در نهایت امید است که سوپراسترین های انتخابی این مرحله از پژوهش از نظر تحمل به شوری و خشکی بتواند در مراحل بعدی طرح مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اراضی نیمه خشک، پلی اتیلن گلیکول، *ریزوبیوم* ، سدیم کلراید

مقدمه

حدود یک سوم از اراضی جهان در اقالیم خشک و نیمه خشک قرار دارند و تقریباً ۱۵درصد از این اراضی متاثر از نمک هستند (Alikhani, 1994; Singleton and Bohlool, 1994). تولیدات گیاهی در بسیاری از اراضی نیمه خشک و به خصوص شور اغلب به دلیل کمبود یا فقدان عناصر غذایی خصوصاً نیتروژن دارای محدودیت است (Bernstein and Francois, 1983) و افزایش کودهای شیمیایی نیتروژن دار در این اراضی خود افزایش شوری خاک‌ها را به دنبال دارد به علاوه ممکن است مصرف این کودها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نباشد. لذا اهمیت کاربرد کودهای زیستی تثبیت کننده‌ی نیتروژن مولکولی افزایش می‌یابد گرچه شوری و خشکی رشد و تکثیر باکتری‌های ریزوبیومی را محدود می‌سازد ولی سویه‌هایی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک و خشکی را به خوبی تحمل کرده و زنده باقی می مانند.

شوری خاک نتیجه انحلال نمکهای معدنی محلول در آب خاک (محلول خاک) می باشد (Vincent, 1982; Singleton and Bohlool, 1994). کاتیون های محلول در خاک شور غالبا" شامل Na^{+}، Ca^{+2}، Mg^{+2} و آنیون های محلول شامل Cl^{-} , SO_4^{-}، HCO_3^{-}، $CO3^{-2}$ و NO^{-3} می باشد (Vincent, 1982). مجموع انواع خاکهای شور در ایران بیش از ۱۵ میلیون هکتار است که نزدیک ۱۰٪ از کل مساحت کشور را شامل می شود و هر ساله بدلیل انجام آبیاری های بی رویه، مصرف آبهای شور و استفاده ناصحیح از کودهای شیمیایی بر میزان این شوری افزوده می شود(Salardini, 1987; Alikhani, 1994).

تولیدات گیاهی در بسیاری از اراضی نیمه خشک و شور اغلب بدلیل فقدان نیتروژن دارای محدودیت است (Salardini,

* پست الکترونیک نویسنده: halikhan@ut.ac.ir

1987; Worrall and Roughly 1976) و افزایش نیتروژن در این اراضی ممکن است موجب افزایش مقاومت به شوری گیاهان گردد، ولی استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژن دار در این اراضی خود شور شدن بیشتر خاکها را بدنبال دارد. بعلاوه ممکن است مصرف این کودها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نباشد (Worrall and Roughly, 1976 ; Hafeez, et, al., 1998) لذا اهمیت تثبیت بیولوژیک نیتروژن ملکولی و مصرف کودهای بیولوژیک خصوصاً کودهای میکروبی در این شرایط افزایش می یابد (Pessaraki and Tucker, ;2005; Sprent and Sprent 2000; Subbarao, 1998) شوری خاک ممکن است هر کدام از طرفین همزیست و یا روابط متقابل بین آنها را متأثر ساخته و موجب کاهش رشد و فعالیت آنها گردد (Bhardwaj, 1985; Kfck, et. al., 1994; Lbernstein and gata, 1976; Materon, 2001) گرچه شوری و خشکی تکثیر باکتریهای ریزوبیومی را محدود می سازد ولی سویه‌هایی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک و خشکی را به خوبی تحمل کرده و زنده باقی می مانند (Lakshmi-Kumari and Subbarao, 1984; Vmanchand and Garg, 2008; Worrall and Roughly, 1976) نمک‌های کلراید و سولفات از نمک‌های غالب خاک‌های شور به حساب می‌آیند. در شرایط شور، رشد گیاه، توسعه سیستم ریشه‌ایی، جذب عناصر غذایی، متابولیسم‌های سلولی وسنتز بسیاری از پروتئین و آنزیم‌ها به شدت آسیب می‌بینند (Pardovilla, et. al., 2001). تأخیر در جوانه زنی و رشد گیاه موجب کاهش عملکرد محصول خواهد شد که یکی از آسیب‌های جدی شوری خاک‌ها برای تولید محصولات زراعی به شمار می‌آید (Pessaraki and Tucker, 2005). ریزوبیوم‌های جدا شده از خاک‌های شور سطوح بالا و بازدارنده را بیشتر از سویه‌های تهیه شده از مناطق غیرشور تحمل کرده و قادرند تا در شرایط شور کلنیزاسیون موفق‌تری داشته باشند (Materon, 2001). سویه‌های ریزوبیومی که قادر به ایجاد یک همزیستی مؤثر در شوری‌های بالا بوده‌اند الزاماً منشاء یافته از خاک‌های شور نیستند (Subbarao, et. al., 1999) در پژوهش دیگری نشان داده شده است که ایزوله‌های نمونه‌برداری شده از اراضی خشک و شور برای ایجاد گره‌های ریشه‌ای در شرایط شور موفق‌ترند (Worrall and Roughly, 1976). گیاهان لگوم طیف وسیعی از مقاومت در برابر شوری دارند، در بین آنها از گونه‌های حساس تا انواع نسبتاً مقاوم دیده می‌شود (Hanson and Hill, 1998; Mass, 1996; Zahran, 1999). در اکثر گیاهان لگوم با افزایش شوری و خشکی میزان رشد و عملکرد محصول کاهش می‌یابد، این کاهش در رشد ممکن است در نتیجه سمیت ناشی از تجمع املاح در بافت‌های گیاهی، افزایش فشار اسمزی و کاهش جذب آب توسط ریشه‌ها و یا اثرات سوء نمک بر فعالیت بعضی از آنزیم‌های گیاهی باشد. همچنین کاهش درصد جوانه‌زنی بذور و یا صدمات وارد بر هیپوکتیل در هنگام عبور از لایه‌های نمکی خاک از دیگر عوامل هستند (Hanson and Hill, 1998; Subbarao, et. al., 1999). توانایی سویه‌های ریزوبیومی برای ایجاد گره‌های تثبیت کننده نیتروژن مولکولی در شرایط شور و خشک بسیار متفاوت گزارش شده است (Dioxon and Wheeler, 1995; Sprent and Sprent, 2000). سویه‌های ریزوبیومی از لحاظ تثبیت نیتروژن ملکولی در شرایط شور با یکدیگر تفاوت دارند و این تفاوت بسیار زیاد بوده و از کاملاً حساس تا کاملاً مقاوم می‌باشد و دیگر اینکه در شرایط شور، تلقیح گیاه یونجه با استفاده از سویه‌های کاملاً مقاوم به شوری موجب موفقیت بیشتر همزیستی و افزایش عملکرد محصول می‌شود (Alikhani, 1994). فراوانی جمعیت باکتری‌های ریزوبیومی در خاک‌های خشک و فعال بودن گره‌ها و رشد گیاه همگی تأکیدی بر این موضوع است که باکتری‌های ریزوبیومی می‌توانند در خاک‌هایی با رطوبت کم حضور داشته باشند، گرچه میزان جمعیت این باکتری‌ها با افزایش خشکی کاهش می‌یابد ولی با بهبود رطوبت خاک مجدداً افزایش می‌یابد (Worrall and Roughly, 1976).

عدس از جمله محصولات زراعی در مناطق خشک است که اغلب به صورت دیم کشت می‌شود به طوری که از کل سطح زیر کشت عدس (۲۲۰۲۱۴ هکتار)؛ مقدار کشت دیم ۲۰۵۴۴۶ هکتار و تنها ۱۴۷۶۸ هکتار به صورت آبی کشت می‌شود (آمار نامه کشاورزی، سال زراعی ۱۳۸۲-۱۳۸۳؛ انتشارات دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت کشاورزی) لذا این تحقیق به منظور ارزیابی و برآورد میزان تحمل به شوری وخشکی باکتری‌های *ریزوبیوم لگومینوزارم* بیوواریسیه همزیست گیاه عدس از طریق غربالگری وانتخاب سویه‌های برتر و یا سوپر استرین‌ها انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و تهیه ایزوله های ریزوبیومی

در ابتدا دو منطقه عمده از دیم‌زارهای کشت عدس کشور در استان‌های اردبیل و نیز قزوین - زنجان شامل دشت مغان و دشت کوهین انتخاب و اقدام به برداشت ریشه‌های بوته‌های عدس شاداب و سپس جداسازی و شستشوی گره‌های ریشه‌ای شد. گره‌های هر بوته عدس (هر نمونه) درون یک دسیکاتور کوچک دستی حاوی سلیکوژل قرار داده شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و کد گذاری گردید. نمونه‌های شماره ۱ الی

۱۱۰ مربوط به دشت مغان و نمونه‌های شماره ۱۱۱ الی ۲۲۰ مربوط به دشت کوهین می‌باشد. مراحل اولیه شامل خیساندن مجدد گره‌ها، له کردن گره‌ها و تهیه سوسپانسیون ریزوبیومی، کشت بر روی محیط کشت" YMA+ کنگورد " و نیز محیط کشت " YMB+ بر موتیمول بلو، BTB " همچنین رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی و آزمون توان آلوده‌سازی گیاه Plant Infection Test (PIT) به روش Winsent (1982) انجام پذیرفت. طی عمل باز کشت‌های متوالی جدایه‌های باکتری بر روی محیط کشت YMA از خالص‌سازی جدایه‌ها اطمینان کافی حاصل شد.

آزمون توان آلوده‌سازی گیاه (PIT) که درون لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت مناسب لگوم‌های ریز دانه به مدت ۶۰ روز درون گلخانه انجام شد. جدایه‌های خالص شده به طور همزمان به دو شکل متفاوت تهیه و ذخیره شدند، یکسری درون لوله‌های آزمایش درپیچ دار به صورت اوریب (Slant) حاوی محیط کشت YMA درون یخچال در دمای ۵°c-۲ و سری دیگر جدایه‌ها که در محیط کشت YMA+ گلیسرول (۳۰٪) درون فریزر در دمای ۸۰°c- بود. دلیل نگهداری ایزوله‌ها در دمای ۸۰°c- ، به دلیل طول مدت نگهداری و محافظت بیشتر از جدایه‌ها است که قرار است در مراحل بعدی پژوهش به کار گرفته شوند.

تعیین میزان تحمل به شوری سویه‌های ریزوبیومی همزیست عدس

در این آزمون محیط کشت پایه مورد استفاده YMA بود که به آن معرف BTB اضافه شده است در صورت رشد باکتری رنگ آبی محیط کشت به زرد تبدیل می شود. برای شور کردن محیط کشت YMA+ BTB از نمک NaCl استفاده شد. پتری‌های حاوی محیط کشت استریل YMA + BTB با شوری ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ و ۵۰ دسی زیمنس بر متر شوری آماده و هر پلیت توسط یک ایزوله تلقیح گردید. سپس پتری‌های تلقیح شده درون انکوباتور در دمای ۲۸ °C گرماگذاری و پس از ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و در صورت رشد باکتری و تشکیل کلنی مشخص و زرد شدن رنگ محیط کشت به عنوان مثبت و در غیر این صورت به عنوان ناتوان از رشد در آن سطح از شوری درنظر گرفته شد. ابتدا جدایه‌ها در شوری ۱۰ دسی زیمنس بر متر مورد بررسی قرار گرفتند و سپس به ترتیب توان رشد باکتری‌ها بر اساس قطر کلنی تشکیل شده در شوری‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ دسی زیمنس مورد ارزیابی واقع شد.

تعیین میزان تحمل به خشکی سویه‌های ریزوبیومی

برای تعیین میزان تحمل باکتری به سطوح مختلف خشکی از روش Burlyn E. Michel and merrill R. Kaufmann (1973) استفاده شده است. در این روش از ماده PolyEthylene Glycol 6000 (PEG) برای تأمین پتانسیل آبی مورد نیاز بر حسب بار (Bar) در محیط کشت YMB استفاده گردید (Zahran, 1999).

پتانسیل آبی ۰، ۵-، ۱۰-، ۱۵- (Bar) به ترتیب با افزودن مقادیر ۰، ۱۰/۸، ۱۶/۲ و ۲۰/۶ گرم از ماده PEG در هر لیتر از محیط کشت YMB مطابق فرمول زیر ایجاد شده است.

$$\text{Waterpotential(wp)} = (1018e\ \ 2)c\ \ (1.18e\ \ 4)c^{8}2 + (2.67e\ \ 4)ct + (8.39e\ \ 7)c^{8}2T \qquad (1)$$

(T= دمای گرما گذاری بر حسب کلوین، c= غلظت پلی اتیلن گلیکول، t = دمای محیط، e =ضریب ثابت، *wp*= پتانسیل آبی)

محیط کشت حاوی PEG+YMB در ظروف ۱۰۰ ml توزیع و سپس درون اتوکلاو استریل شد. آن گاه پس از تلقیح در شرایط استریل با سویه مورد نظر به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر دورانی در دمای ۲۹°C قرار گرفتند. پس از این مدت در هر نمونه مقدار دانسیته نوری (O.D) در طول موج ۵۷۰nm قرائت گردید. بدیهی است افزایش مقادیر PEG موجب افزایش پتانسیل آبی و کاهش رشد باکتری شده و لذا مقدار O.D اندازه‌گیری شده کمتر خواهد بود. نتایج حاصله در نرم افزار Excel جمع‌آوری و اقدام به تهیه میانگین و گروه‌بندی شدند. درجه بندی سویه‌ها به کاملاً متحمل، متحمل، حساس و کاملاً حساس بر اساس میزان O.D آنها در محیط کشت PEG+YM در پتانسیل آبی ۱۵ - بار می‌باشد.

نمونه برداری از خاک تحت کشت مزارع گیاه عدس در دشت مغان و دشت کوهین همزمان با تهیه نمونه‌های گیاهی انجام پذیرفت. نمونه‌برداری از خاک یک محل بدین صورت بود که در هر منطقه از کشتزارها اقدام به برداشت یک نمونه مرکب خاک که نماینده خاک آن منطقه باشد، گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و pH ,EC هر نمونه خاک اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول (۱) منعکس می‌باشد.

نتایج و بحث

تعداد نمونه‌های گیاهی برداشت شده از دیمزارهای عدس دشت مغان در استان اردبیل و نیز دیمزارهای عدس موجود در استان‌های قزوین- زنجان (دشت کوهین) برابر یکدیگر و جمعاً معادل ۲۲۰ نمونه بود. از تعداد کل نمونه‌های برداشت شده (گره‌های ریشه‌ای عدس)، به جز ۶ نمونه تعداد ۲۱۴ جدایه

باکتری از روی محیط‌های کشت YMA+ کنگورد و نیز BTB+YMA جداسازی شد، کلنی‌های جدا شده از محیط کشت YMA+ کنگورد به صورت بی رنگ، لعابی، لزج با قطر ۳-۵mm شامل باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی بود که در مقابل کلنی‌های آلودگی با رنگ قرمز ناشی از کاربرد رنگ کنگورد بودند، به علاوه اینکه کلنی‌های جدا شده رنگ محیط کشت BTB+YMA را به زرد تبدیل کرده بودند.

جدول ۱- میزان pH ,EC خاک نمونه برداری شده از دشت های مغان و کوهین

شماره خاک	محل نمونه برداری	EC(dS/m)	pH
۱	دشت مغان	۱/۱	۸/۱
۲	دشت مغان	۲/۳	۷/۹
۳	دشت مغان	۱/۱	۷/۶
۴	دشت مغان	۱/۳	۷/۸
۵	دشت مغان	۱/۳	۷/۴
۶	دشت مغان	۱/۲	۷/۵
۷	دشت مغان	۲	۸
۸	دشت مغان	۲/۵	۷/۶
۹	دشت مغان	۱/۴	۷/۲
۱۰	دشت مغان	۱/۲	۷/۱
۱۱	دشت مغان	۱/۴	۷/۵
		میانگین	میانگین
		۱/۵۳	۷/۶۱

ادامه جدول ۱

شماره خاک	محل نمونه برداری	EC(dS/m)	pH
۱۲	دشت کوهین	۱/۸	۷/۵
۱۳	دشت کوهین	۲/۳	۷/۲
۱۴	دشت کوهین	۲	۷/۰
۱۵	دشت کوهین	۳/۹	۷/۴
۱۶	دشت کوهین	۲/۵	۷/۵
۱۷	دشت کوهین	۲/۶	۷/۷
۱۸	دشت کوهین	۲/۴	۷/۷
۱۹	دشت کوهین	۲/۳	۷/۲
۲۰	دشت کوهین	۲/۵	۷/۵
۲۱	دشت کوهین	۳/۶	۷/۲
۲۲	دشت کوهین	۳/۲	۷/۵
		میانگین	میانگین
		۲/۷۴	۷/۴۱

آزمون توان آلوده‌سازی گیاه (PIT) نیز نشان داد که از بین ۲۱۴ جدایه باکتری مورد آزمون تنها تعداد ۲۵ جدایه از جنس و گونه *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciea* (*Rlv*) (Lenti) نبودند. انجام این آزمون به منظور اطمینان نهائی از باکتری ریزوبیومی همزیست یک گیاه لگوم خاص می باشد.

نتایج آزمون تعیین میزان تحمل به شوری جدایه‌های ریزوبیومی نشان داد که از بین ۱۸۹ سویه ریزوبیومی همزیست گیاه عدس (*Rlv*) تعداد سویه‌های رشد یافته در سطوح مختلف شوری به صورت: ۱- EC=۱۰ dS/m برابر ۱۰۱ سویه معادل ۵۴/۸۹٪ به عنوان کاملاً حساس، ۲- EC=۲۰ dS/m برابر ۹۳ سویه معادل ۵۰/۵۴٪ به عنوان حساس، ۳- EC=۳۰ dS/m برابر ۷۱ سویه معادل ۳۸/۵۹٪ به عنوان نسبتاً متحمل ۴- d/ Sm EC=۴۰ برابر ۳۵ سویه معادل ۱۹/۰۲٪ به عنوان متحمل، ۵- EC=۵۰ dS/m برابر ۲۵ سویه معادل ۱۳/۲۳٪ به عنوان خیلی متحمل بودند. این سویه‌ها علی رغم اینکه رنگ محیط کشت خود را از آبی به زرد تبدیل کرده بودند ولی دارای رشد قوی، به صورت لعابی و لزج بر روی سطوح محیط کشت درون ظروف پتری نبودند که به عنوان سویه‌های خیلی متحمل دسته بندی شدند، به علاوه در این سطح شوری (۵۰ dS/m) تعداد ۱۰ سویه ریزوبیومی (۵/۲۹٪)دارای رشد بسیار خوب و کلنی‌های رشد یافته به صورت لعابی و لزج با قطر حدود ۳-۵ mm بودند که به عنوان سوپر استرین (سویه)های کاملا" متحمل به شوری دسته بندی گردید.

نتایج حاصله نشان داد که از جدایه‌های مربوط به دشت مغان در شوری ۱۰dS/m، از تعداد کل ۱۱۰ جدایه تنها ۴۶ جدایه (۴۱/۸۲٪) رشد کرده در صورتی که تعداد جدایه‌های رشد یافته در همین شوری در دشت کوهین برابر ۵۵ جدایه (۵۰٪) می باشد.

بر اساس جدول شماره (۳) به ترتیب در شوری های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰و ۵۰ دسی زیمنس بر متر، تعداد جدایه‌های رشد یافته مربوط به دشت مغان برابر۴۶(۴۱،۸۲٪)؛ ۴۲ (۳۸/۲٪)، ۲۱ (۱۹/۱٪)، ۸ (۷/۳٪) و۶ (۵/۵٪) جدایه در صورتی که تعداد جدایه‌های رشد یافته مربوط به دشت کوهین در شوری‌های ۱۰ و بیشتر به ترتیب معادل ۵۵ (۵۰٪)؛ ۵۱ (۴۶/۴٪) ، ۵۰ (۴۵/۵٪)، ۲۷ (۲۴/۵٪) و ۲۹ (۲۶/۴٪) می باشد. به علاوه اینکه از بین ۱۰ سویه سوپراسترین کاملا" متحمل به شوری ، تنها ۲ سویه مربوط به دشت مغان و ۸ سویه دیگر مربوط به دشت کوهین است.

گرچه شوری و نمک، رشد و تکثیر باکتری‌های ریزوبیومی را محدود می‌سازد، ولی سویه‌هایی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک را به خوبی تحمل کرده و زنده باقی می مانند (Lakshmi-Kumari and Subbarao, 1984; Vmanchanda and Garg, 2008; Zahran, 1999).

جدول۲- فراوانی سویه‌های ریزوبیومی رشد یافته در سطوح مختلف شوری

فراوانی سویه‌های ریزوبیومی رشد یافته		سطوح مختلف شوری EC (dSm^{-1})	توان تحمل به شوری سویه های *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه همزیست گیاه عدس*
درصد	تعداد		
۵۳/۴۴	۱۰۱	۱۰	کاملاً حساس
۴۹/۲۱	۹۳	۲۰	حساس
۳۷/۵۷	۷۱	۳۰	نسبتاً متحمل
۱۸/۵۲	۳۵	۴۰	متحمل
۱۳/۲۳	۲۵	۵۰	خیلی متحمل
۵،۲۹	۱۰	۵۰	کاملاً متحمل(سوپر استرین)

اختلاف بسیار زیادی در میزان رشد سویه‌های مختلف ریزوبیومی کشت شده بر روی یک محیط کشت شور Y.M.A مشاهده شده است (Subbarao, 1999; Allen, et. al., 1995). ولی در هر حال مقاومت باکتری‌های ریزوبیومی در برابر شرایط شور به مراتب بیشتر از گیاهان میزبان آنها می‌باشد (Bhardwaj, 1985; Hafeez, et. al., 1998; Singleton and Bohlool, 1994).

به طور کلی می‌توان گفت که در نمونه‌های برداشت شده از دشت کوهین فراوانی سویه‌های متحمل به شوری خصوصاً در شوری‌های بالا (۳۰، ۴۰ و ۵۰ دسی زیمنس بر متر) بسیار بیشتر از جدایه‌های مربوط به دشت مغان است (جدول۴).

جدول۳- فراوانی سویه های ریزوبیومی مربوط به دشت‌های مغان و کوهین در شوری های مختلف

فراوانی سویه‌های ریزوبیومی رشد یافته در دشتهای مختلف				سطوح مختلف شوری EC (dSm^{-1})	توان تحمل به شوری سویه های *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه همزیست گیاه عدس*
دشت مغان		دشت کوهین			
درصد	تعداد	درصد	تعداد		
۴۱/۸۲	۴۶	۵۰	۵۵	۱۰	کاملاً حساس
۳۸/۲	۴۲	۴۶/۴	۵۱	۲۰	حساس
۱۹/۱	۲۱	۴۵/۵	۵۰	۳۰	نسبتاً متحمل
۷/۳	۸	۲۴/۵	۲۷	۴۰	متحمل
۵/۷	۶	۲۶/۴	۲۹	۵۰	خیلی متحمل
۱/۸	۲	۷/۳	۸	۵۰	کاملاً متحمل(سوپر استرین)

Subbarao, et al. (1999) نیز اعلام کرده‌اند که سویه‌های ریزوبیومی که قادر به ایجاد یک همزیستی مؤثر در شوری‌های بالا بوده‌اند الزاماً منشاء یافته از خاک‌های شور نیست. در مقابل برخی پژوهش‌ها نشان داده است که ایزوله‌های نمونه‌برداری شده از اراضی خشک و شور برای ایجاد گره‌های ریشه‌ای در شرایط شور موفق‌ترند به علاوه تحقیقات به خوبی نشان داده‌اند که برخی از باکتری‌های ریزوبیومی به صورت آزادزی (در شرایط ساپروفیتی) قادرند در شرایط تنش خشکی و یا پتانسیل آبی پایین به حیات خود ادامه دهند (Worrall and Roughly, 1976). گاهی یک سویه ریزوبیومی جدا شده از خاک‌های خشک قادر است شرایط خشک خاک را تا حدود یک ماه تحمل نموده و رشد نماید. این در صورتی است که برخی سویه‌های تجاری قادر نیستند در این شرایط رشد نمایند(Zahran, 1999).

یکی از علائم سریع تنش آبی بر باکتری‌های ریزوبیومی تغییرات مورفولوژیکی باکتری می‌باشد. یکی از سویه‌های جنس *ریزوبیوم* و *سینوریزوبیوم ملیلوتی* مورفولوژی غیرعادی از خود نشان دادند، تغییرات سلول‌های *ریزوبیومی* در نتیجه‌ی اثر تنش آبی در عاقبت منجر به کاهش آلودگی و گره‌زایی لگوم‌ها می‌گردد (Worrall and Roughly, 1976).

جدول ۴- میزان تحمل به خشکی سویه های ریزوبیومی همزیست گیاه عدس

تعداد سویه	درجه تحمل به خشکی	میزان O.D
۶	کاملاً حساس	O.D <0.3
۸	حساس	O.D = 0.3-0.4
۱۵	مقاوم	O.D = 0.4-0.5
۵	کاملاً مقاوم	OD > 0.5

نتایج تعیین میزان تحمل باکتری‌های ریزوبیومی همزیست عدس به خشکی نشان داد که از بین ۳۴ سویه کاملاً متحمل و سوپر استرین‌های فوق العاده متحمل به شوری انتخاب شده از آزمون تعیین میزان تحمل به شوری، تعداد ۶ (۱۷/۶۵٪) سویه ریزوبیومی کاملاً حساس به خشکی می‌باشند که تنها یکی از آنها (ایزوله ۶۳) مربوط به دشت مغان می‌باشد و مابقی مربوط به دشت کوهین هستند. همچنین تعداد ۸ سویه (۲۳/۵٪) در محدوده حساس قرار دارند که ایزوله‌های ۱۷، ۲۳ و

۲۹ جمعاً ۳ ایزوله (۸/۸۲٪) مربوط به دشت مغان و مابقی (۵ سویه ۱۴/۷٪) مربوط به دشت کوهین می‌باشند باکتریهای متحمل به خشکی شامل ۱۵ ایزوله می‌باشد که ۲۴، ۵۸، ۶۹ و ۷۰ (۴ جدایه ۱۱/۷۶٪) مربوط به دشت مغان و مابقی ۱۱ سویه ریزوبیومی (۳۲/۳۵٪) سویه‌های مربوط به دشت کوهین می‌باشند و در نهایت از بین ۵ سویه (۱۴/۷٪) که کاملاً متحمل به خشکی بودند فقط ایزوله ۶۴ (۲/۹۴٪) مربوط به دشت مغان و مابقی ۴ سویه (۱۱/۷۶٪) متعلق به دشت کوهین هستند که در جداول (۲) و (۳) منعکس می‌باشد .

جدول ۵- فراوانی سویه های ریزوبیومی در سطوح مختلف خشکی

O.D	فراوانی سویه ها			
	دشت مغان		دشت کوهین	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد
O.D> 0.5	۱	۲/۹۴	۵	۱۴/۷
O.D = 0.3-0.4	۳	۸/۸۳	۵	۱۴/۷
O.D = 0.4-0.5	۴	۱۱/۷۶	۱۱	۳۲/۳۵
O.D < 0.3	۱	۲/۹۴	۴	۱۱/۷۶

خشکی یکی از فاکتورهای محیطی است که اغلب محصولات را تحت تأثیر خود قرار داده و موجب کاهش عملکرد می شود (Vmanchanda and Garg, 2008). در شرایط خشک با کاهش رطوبت از جمعیت باکتری‌های خاکزی کاسته می شود ولی هیچ گاه این جمعیت به صفر نمی‌رسد، لذا برخی از سویه‌های باکتری‌های خاکزی شرایط فوق‌العاده خشک را تحمل می‌کنند. این باکتری‌ها از آب نگاهداری شده منافذ ریز خاک بهره‌مند شده، زنده مانده و با حداقل فعالیت‌های متابولیکی به حیات خود ادامه می دهند (Zahran, 2001). بقای یک سویه ی *برادی ریزوبیوم* در خاک‌های لوم شنی بسیار ضعیف بود این سویه توانایی ادامه حیات تا کشت بعدی را نداشت، لذا حیات و فعالیت ریز موجودات ممکن است تابع نحوه‌ی توزیع باکتری‌ها در درون مکان‌های میکروسکوپی خاک و تغییرات رطوبت خاک قرار بگیرد. فراوانی باکتری‌های جنس *ریزوبیوم لگومینوزارم* در خاک‌های شن لومی و لوم سیلتی متأثر از میزان رطوبت اولیه‌ی خاک می‌باشد. رطوبت‌های متوسط موجب کاهش حرکت باکتری *ریزوبیوم تریفولی* شد. حرکت باکتری‌ها زمانی که حفرات خاک در نتیجه استرس آبی خالی می‌باشد کند می‌شود (Worrall and Roughly, 1976).

در نهایت نتایج جداول (۳) و (۵) در درجه اول نشان می‌دهند که در دیمزارهای تحت کشت عدس ایران سوپر استرین‌های ریزوبیومی فوق العاده متحمل به شوری وهمچنین سویه‌های ریزوبیومی کاملا" مقاوم به خشکی (با قدرت رشد در پتانسیل آبی ۱۵- بار) را می‌توان جداسازی و خالص سازی کرد. به علاوه اینکه سویه‌های ریزوبیومی جدا شده از دشت مغان همان طور که مقاومت اندکی به شوری نشان دادند و اکثراً در گروه‌های کاملاً حساس (۴۶ ایزوله) و حساس (۴۲ ایزوله) قرار گرفتند در آزمون میزان مقاومت به خشکی نیز توان بالایی از خود نشان ندادند و در تمامی گروه‌های کاملاً حساس تا کاملاً متحمل تعداد این سویه‌ها کمتر از سویه‌های دشت کوهین می‌باشد، این موضوع می‌تواند ثابت کند که تحمل به خشکی با تحمل به شوری باکتری‌های ریزوبیومی تقریباً در یک راستا می‌باشد. همچنین Zahran (1999) نشان داد که سویه‌های باکتری حساس به شوری سطوح بالای خشکی را نیز تحمل نمی‌کند و به طور کلی پدیده‌های شوری و خشکی به نوعی با یکدیگر مرتبط می‌باشند. امید است با انجام پژوهش‌های تکمیلی به صورت آزمون‌های گلخانه و مزرعه‌ای بتوان سویه‌های برتر و اختصاصی این محصول را به بخش صنعت جهت تولید انبوه کود بیولوژیک همزیست عدس معرفی نمود.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح تحقیقاتی تحت عنوان «تولید انبوه زاد مایه باکتری های محرک رشد گیاه عدس مناسب مناطق خشک وشور» به شماره پرونده ۸۳۱۷۱ از محل برنامه تحقیقات صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشورمصوب جلسه مورخ ۱۳۸۵/۳/۱۱ انجام پذیرفته است که بدین وسیله تشکر و قدردانی می گردد.

REFERENCES

Salardini, A. (1987). *Soil fertility*. University of Tehran.

Alikhani, H. (1994). MSc Thesis, *The symbiotic indices assessment of Rhizobium Meliloti Strains in indigenous Iranian soil and the study of its variations in different levels of salinity*. University of Tehran (In Farsi).

Allen, S.G., Dobrenz A.K., Schonhorst M.H. and Stonr, G.E., (1995). Heritability of NaCl tolerance in germinating alfalfa seeds, *Agronomy journal*, 77, 99-101

Bernstein, L. and Francois, L.E. (1983). Leaching requirement studies: Sensivity of alfalfa to salinity of irrigation and drainage water. *SoilSociety Journal American Proceeding*, 37, 931-943

Bhardwaj, K. K. R. (1985). Survival and symbiotic characteristics of Rhizobium in saline alkaline soils. *Plant and Soil*, 43, 377-385.

Dioxon, R.O.D and Wheeler, C.T. (1995). *Nitrogen Fixation in Plants*, Chapman and Hall.

Hafeez, Y., ASLAM, Z. and Malik, K. A. (1998).

Effect of salinity and inoculation growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of Vigna Radiata (L.) Wilczek. *Plant and Soil*. 106, 3-8.

Hanson, A. D. K. and Hill, R. (1998). Alfalfa and alfalfa improvement (ASA).

Kfck, T.G., Wagenet, R.G., Campbell W.F. and Knightonr, E. (1994). Effects of water and saline stress on growth and acetylene production in alfalfa, *Soil Science Society of American Journal* 48, 1310-1316.

Lakshmi-Kumari, M.S. and Subbarao, N.S., (1984). Root hair infection and nodulation Lucerne as influenced by salinity and alkalinity. *Plant and Soil*. 40, 261-268.

Lbernstein, L. and gata, O. (1976). Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of Soybeans and Alfalfa. *Agronomy Journal,* 58, 201-203.

Materon, L.A., (2001). Symbiotic characteristic of *Rhizobium meliloti* in west Asian soil. *Soil Biology and Biochemistry,* 23(5), 429-434.

Mass, E.V., (1996). *Salt tolerance of plant U.S Salinity laboratory*. USDA.

Pardovilla, M.P., Francisco, L. and Carmen, L., (2001). Effects of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of Faba beans (*Vicia faba* L.). *Applied soil Ecology*. 11,1-7.

Pessaraki, M. and Tucker, T.C. (2005). Ammonium (15N) metabolism in cotton under salt stress. *Journal of Plant Nutrition,* 8, 1025-1045.

Singleton, P.W. and Bohlool, B. (1994). Effects of salinity on nodule formation by Soybean, *Journal of Plant physiology,* 74,72-76.

Sprent, J. and Sprent. P. (2000). *Nitrogen fixing organisms*, Chapman and Hall.

Subbarao, N.S. (1998). *Soil Microorganisms and Plant Growth*,Oxford & IBH Publishing CO.PVT.LTD. Kalkata. India.

Subbarao, G.V., Johnseng, C., Kumarrao, J.V.D.K and Jana., M.K. (1999). Response of the Pigeon pea *Rhizobium* symbiosis to salinity stress: variation among *Rhizobium* strain in symbiotic ability. *Biology and Fertility of Soil,* 9, 49-53.

Vincent, J. M. (1982). *A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria.* (Handbook NO.15), Academic Press INC., san diego California 92101.

Vmanchanda, I. and Garg, N. (2008). Salinity and its effects on the functional biology of legumes. *Journal of Plant Physiology*. 7, 1-45.

Worrall, V.S. and Roughly, R. J. (1976). The effects of moisture stress on infection of Trifolium subteerraneum L. by Rhizobium trifoli Dang . *Journal of Experimental Botany,* 27, 1233-1241.

Zahran, H.H. (2001). Condition for successful *Rhizobium*-Legume symbiosis saline environment. *Biology and Fertility of Soils,* .12, 73-80.

Zahran, H.H. (1999). *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(4), 1003-1011.