آیا مایه‌زنی همزمان نخود با باکتری ریزوبیوم و قارچهای میکوریز می‌تواند بر گره‌بندی ریزوبیومی و کلنیزاسیون میکوریزی در ریشه تاثیر گذار باشد؟

علیرضا توسلی[1]، ناصر علی اصغر زاد[2]، غلامرضا صالحی جوزانی[3]، احمد اصغر زاده[4] و محسن مردی[5]

1- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی

2- استاد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

3 و5- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

4- استادیار موسسه تحقیقات خاک و آب تهران
ar.tavasolee@yahoo.ca

چکیده

گیاهان لگوم از همزیستی سه جانبه با قارچهای میکوریز آربوسکولار (AMF) و ***Rhizobium***ها بهره‌مند می‌شوند. حضور یکی از این همزیست‌ها می‌تواند برفعالیت دیگری تأثیرگذار باشد واثرات متقابل هر دو همزیست میکروبی و قارچی بر گیاه میزبان قابل مشاهده می‌باشد. در این تحقیق 6 جدایه باکتری ***Mesorhizobium ciceri*** و سه گونه قارچ میکوریز آربوسکولار با بذور نخود مایه‌زنی شده و اثر آنها بر گره‌بندی باکتری و کلنیزاسیون قارچی در ریشه گیاه بررسی گردید. نتایج مایه‌زنی باکتریایی نشان می-دهد، جدایه‌های مختلف یک گونه باکتری تاثیرات متفاوتی بر کلنیزاسیون AMF در ریشه گیاه نخود دارند، با این وجود در اکثر حالات مایه‌زنی باکتریایی اثر افزایشی بر کلنیزاسیون میکوریزی در ریشه گیاه داشته است.

کلمات کلیدی: همزیستی سه جانبه، قارچ میکوریز، ریزوبیوم، کلنیزاسیون قارچی، گره‌بندی ریشه

مقدمه

همزیستی یک پدیده بیولوژیکی در ارتباط با تغییرات دینامیکی در ژنوم، متابولیسم و شبکه سیگنالی بوده و وقتی که میکروارگانیسم همزیست را مطالعه می‌کنیم، درک جامع چند جهتی از این اثرات متقابل لازم می‌باشد. در اثرات متقابل میکروب– گیاه، دو سیستم همزیستی برای سالیان متوالی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. یکی از این‌ها همزیستی میکوریزی آربوسکولار (AM[1]) و دیگری همزیستی گره‌های ریشه‌ای (RN[2]) می‌باشد (ماسایوشیکا و اگوچی، 2010). باکتری ***Mesorhizobium ciceri*** جزء باکتریهای ایجاد کننده گره در نخود می‌باشد. تحقیقات نشان داده جدایه‌های مختلف این باکتری توانایی مختلفی در برقراری همزیستی و تثبیت نیتروژن دارند (اصغر زاده و صالح راستین، 1375). بیشتر گیاهان لگوم از همزیستی سه جانبه با قارچهای میکوریز آربوسکولار (AMF) و ***Rhizobium***ها بهره‌مند می‌شوند. حضور یکی از این همزیست‌ها می‌تواند برفعالیت دیگری تأثیرگذار باشد واثرات متقابل هر دو همزیست میکروبی و قارچی بر گیاه میزبان قابل مشاهده می‌باشد (لیست و همکاران، 2003؛ آنتونز و همکاران، 2006). مطالعات مولکولی و ژنتیکی نشان داده، فرآیند برقراری همزیستی ***Rhizobium*** و قارچ AM در ریشه گیاهان لگوم به طور چشمگیری بخصوص در جنبه‌های عمومی از تبادل سیگنالی اولیه مشابه می‌باشد (اولدروید و همکاران، 2005).

[1] Arbuscular Mycorrhiza
[2] Root Nodule

لذا این امکان وجود دارد جدایه‌های مختلف باکتری بر الگوی استقرار گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز در ریشه تأثیرگذار باشند و بتوان جدایه‌هایی یافت، که ضمن توان بالای تثبیت نیتروژن، میزان بهره‌گیری گیاه از همزیستی میکوریزی را افزایش دهند.

مواد و روشها

این آزمایش در قالب طرح بلوکهای تصادفی و بصورت فاکتوریل با دو فاکتور A (باکتری) و B (قارچ) و در سه تکرار بر روی گیاه نخود و در گلخانه به اجراء در آمد. 6 جدایه باکتری همزیست نخود، 1 تیمار مخلوط 6 جدایه و 1 تیمار بدون باکتری در نظر گرفته شد، که در مجموع 8 تیمار باکتری را شامل شدند. جدایه‌های باکتریایی پس از انتخاب در محیط کشت اختصاصی تکثیر یافتند. تیمار قارچی شامل سه گونه[3] از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شامل (GI) *G. intraradices* ، (GM) *G. mosseae* و (GE) *G. etunicatum* بود که جهت تهیه زادمایه آنها از سورگم به عنوان گیاه میزبان استفاده شد. یک تیمار بدون قارچ، و یک تیمار مخلوط سه گونه قارچی در مجموع 5 تیمار قارچی را تشکیل دادند.

واحد آزمایشی (گلدان) 120 = 3 (تکرار) × 5 (قارچ) × 8 (باکتری)

کشت گلخانه‌ای با استفاده از نخود سفید (*Cicer arietinum* cv. ILC482) و در گلدانهای 2 کیلوگرمی و با ماسه استریل انجام گردید. برای تیمارهای GI، GM و GE به ترتیب مقادیر100، 150 و 50 گرم از زادمایه قارچی بر اساس پتانسیل MPN محاسبه شده (به ترتیب240، 160 و 480 پروپاگول به ازاء هر سانتیمتر مکعب از زادمایه) برای هر کیلوگرم ماسه به گلدان‌های مربوطه اضافه و با بستر شنی مخلوط گردید. برای تیمار کشت مخلوط قارچها نیز به ترتیب مقادیر 33، 50 و 17 گرم از زادمایه قارچی با همدیگر مخلوط و به ازاء هر کیلوگرم ماسه به گلدان‌های مربوطه اضافه و با بستر شنی مخلوط گردید. برای تیمار شاهد بدون مایه‌زنی قارچی مقدار 100 گرم از مخلوط زادمایه‌ها که استریل شده بود به گلدان‌های شاهد اضافه و مخلوط گردید. بذرهای نخود پس از ضدعفونی و جوانه‌زنی در گلدانها کشت گردیدند. سپس از سوسپانسیون باکتری به میزان 10 میلی‌لیتر با جمعیت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر بر روی بذور ریخته شده و جهت جلوگیری از آلودگی سطحی و همین‌طور انجام آبیاری یکنواخت، لایه یک سانتی‌متری از سنگریزه شسته استریل در سطح گلدان‌ها قرار داده شد. حدود 2 ماه پس از انجام کشت گلخانه‌ای اقدام به برداشت قسمت هوایی گیاهان گردید، و میزان کلنیزاسیون قارچی در ریشه گیاه به روش تقاطع خطوط[4] تغییر یافته و وزن تازه گره‌ها در ریشه تعیین گردید.

نتایج و بحث

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس تیمارهای قارچ و باکتری تاثیر معنی‌داری ($p<0/01$) بر وزن تر گره در ریشه داشتند. مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمارهای مختلف قارچی نشان می‌دهد که در نتیجه‌ی مایه‌زنی با قارچ میکوریز، گونه GI بیشترین وزن تر گره (1/77 g/pot) را نسبت به تیمار GM و مخلوط سه گونه قارچی (به ترتیب، g/pot 1/35 و 1/51) موجب شد و با GE و بدون مایه‌زنی قارچی اختلاف معنی‌داری نشان نداد. مقایسه میانگین اثرات اصلی تیمار جدایه‌های باکتری نشان می‌دهد جدایه‌های 1، 3، 4، 5، و مخلوط جدایه‌های باکتری (به ترتیب، g/pot 2/14، 2/31، 1/83، 2/01 و 2/17) افزایش معنی‌داری در وزن تر گره نسبت به جدایه‌های 2، 6 و شاهد (به ترتیب، g/pot 0/76، 1/21 و 0) داشتند.

[3] این گونه‌ها از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه شدند

[4] Modified grid line intercept method

تیمارهای قارچ و باکتری و اثر متقابل آنها تاثیر معنی‌داری ($p<0/01$) بر کلنیزاسیون ریشه به روش تقاطع خطوط داشتند. میزان کلنیزاسیون قارچی در تیمارهای بدون مایه‌زنی قارچی صفر بود. وقتی گیاهان با قارچ میکوریز مایه‌زنی شدند باکتری‌ها تاثیرات متفاوتی بر کلنیزاسیون قارچی در ریشه به روش تقاطع خطوط داشتند. وقتی گیاهان با GE مایه‌زنی شدند باکتری‌ها تاثیر معنی‌داری بر کلنیزاسیون قارچی نشان ندادند، وقتی گیاهان با GI، GM و مخلوط جدایه‌ها مایه‌زنی شدند باکتری‌ها تاثیر معنی‌داری در سطح 1 درصد بر کلنیزاسیون قارچی در ریشه داشتند. نتایج تفکیک SS نشان می‌دهد در حالت مایه‌زنی با GI جدایه 2 میزان کلنیزاسیون بیشتری (66/77 درصد) در ریشه نسبت به جدایه‌های 1، 4، 5 و مخلوط جدایه‌ها (به ترتیب 50/4، 50/4، 45/33 و 44/57 درصد) داشت و اختلاف معنی‌داری با جدایه‌های 3، 6 و بدون مایه‌زنی با باکتری نداشت. در حالت مایه‌زنی با GM جدایه 6 میزان کلنیزاسیون بیشتری (54/77 درصد) در ریشه نسبت به بدون مایه‌زنی باکتریایی و مخلوط جدایه‌ها (38/5 و 33/97 درصد) داشت و اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها نداشت. در حالت مایه‌زنی با مخلوط قارچها جدایه‌های 2 و 6 (به ترتیب 64/73 و 64/47 درصد) کلنیزاسیون بیشتری نسبت به جدایه‌های 1، 4، 5، مخلوط جدایه‌ها و بدون مایه‌زنی (به ترتیب 46، 45/23، 39/67، 42/7 و 35/55 درصد) در ریشه گیاه داشتند و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نداشتند.

نتایج کلنیزاسیون میکوریزی نشان می‌دهد باکتری‌ها تاثیرات متفاوتی بر کلنیزاسیون گونه‌های مختلف قارچی در ریشه دارند، به همین دلیل اثر متقابل قارچ و باکتری معنی‌دار شده است. همانطور که نتایج نشان می‌دهد جدایه‌های مختلف باکتری تاثیر معنی‌داری بر کلنیزاسیون قارچ گونه GE در ریشه نداشتند، شاید پایین بودن میزان کلنیزاسیون قارچی در این گونه موجب شده که کلنیزاسیون این گونه کمتر به ترشحات ریشه‌ای واکنش دهد و یا شاید این گونه قارچی کمتر تحت تاثیر ترشحات ریشه‌ای گیاه قرار می‌گیرد. تیمار باکتریایی تاثیر معنی‌داری بر کلنیزاسیون قارچی گونه‌های GI، GM و مخلوط سه گونه قارچی داشتند. الولدروید و همکاران (2005) گزارش کردند در همزیستی گیاهان لگومینوز، همزیستی تثبیت کننده نیتروژن (SNF) و میکوریز آربوسکولار (AM) در جنبه‌های عمومی از تبادل سیگنالی اولیه مشترک هستند. همانطور که نتایج نشان می‌دهد در گونه‌های قارچی GI، GM و مخلوط سه گونه قارچی، جدایه‌های باکتری 2، 3 و 6 بیشترین تاثیر را بر افزایش کلنیزاسیون قارچی نسبت به سایر جدایه‌ها و تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی در ریشه گیاه دارند. همچنین با بررسی نتایج گره‌بندی ملاحظه می‌گردد که جدایه های 2 و 6 کمترین وزن تر گره و جدایه 3 بیشترین وزن تر گره دارند. بنابراین ملاحظه می‌گردد افزایش کلنیزاسیون میکوریزی تحت تاثیر دو گروه متفاوت از جدایه‌های باکتری صورت گرفته است. یک گروه جدایه‌هایی هستند که موجب افزایش گره‌بندی باکتری در ریشه گردیده‌اند. نتایج کارهای زای و همکاران (1995) اثر تحریک کنندگی فاکتورهای Nod را بر روی کلنیزاسیون AM ریشه نشان می‌دهد. علی اصغرزاد و همکاران (1375) نشان دادند اثرات سینرژیستی بین قارچهای میکوریز VA و باکتری برادی ریزوبیوم موجب افزایش تثبیت نیتروژن و وزن گره‌های ریشه‌ای گردید. براساس آزمایشات به عمل آمده تنها فاکتورهای Nod که میزان ترشح فلاوونوئیدها را از ریشه افزایش می‌دهند، اثر تحریک کنندگی بر روی کلنیزاسیون AM ریشه نشان می‌دهند (زای و همکاران، 1995).

گروه دیگر جدایه‌هایی هستند که در تحقیق حاضر تاثیر کمی بر گره‌بندی باکتری در ریشه دارند و می‌توان آنها را به عنوان باکتری‌های ***Rhizobium*** که فاقد توانایی گره‌بندی در ریشه هستند (Nod^-) در نظر گرفت. در یک مطالعه وقتی که سویاهای Nod^- (سویای موتانت که قادر به تشکیل گره نیست) با باکتری ***Rhizobium*** مایه‌زنی شدند، کلنیزاسیون ریشه بوسیله AMF افزایش یافت (زای و همکاران، 1995). این داده‌ها بطور واضحی اثرات تحریک کنندگی باکتری ***Rhizobium*** بر روی کلنیزاسیون AM ریشه را ثابت می‌کنند و عمدتا مرتبط با تثبیت نیتروژن نیست و بیشتر در ارتباط با وقایع قبل از گره‌زایی می‌باشد. بنابراین بطور مشخصی می‌توان ملاحظه کرد که برخی

جدایه‌های باکتری ***Rhizobium*** چه آنهایی که توانایی گره‌بندی در ریشه دارند و چه آنهایی که فاقد این توانایی هستند دارای تاثیرات تحریک‌کنندگی بر کلنیزاسیون قارچی AM در ریشه گیاه نخود می‌باشند. اثر متقابل بین قارچ AM و ***Rhizobium*** برای مثال ممکن است درمرحلهٔ قبل از کلنیزاسیون وقتی که هر دو میکروارگانیسم در میکوریزوسفر قرار دارند، یا در زمانی که همزیستی سه جانبه در حال توسعه یافتن است به وقوع بپیوندد.

در تیمار مایه‌زنی قارچی با GI جدایه 5 و مخلوط جدایه‌ها میزان کلنیزاسیون قارچی کمتری از تیمار شاهد بدون مایه‌زنی با باکتری داشتند. این کاهش کلنیزاسیون در اثر مایه‌زنی باکتریای توسط محققین مختلفی گزارش گردیده است. ویرحیلیگ و پیه (2002) اظهار داشتند که تشکیل گره یک فرایند پرهزینه برای گیاه میزبان است، و غیر منتظره نمی‌باشد که فرایند گره‌زایی بوسیله مکانیسم خود تنظیمی توسط گیاه میزبان کنترل گردد، و این خود تنظیمی یک مکانیسم سیستمیک می‌باشد. از طرف دیگر توسعه همزیستی میکوریزی از جنبه گیاه نیز یک فرایند پر هزینه می‌باشد، بنابراین بعد از اینکه کلنیزاسیون ریشه به یک حد بحرانی رسید، توقف کلنیزاسیون بیشتر ریشه بوسیله AMF، احتمالا در جهت کاهش هزینه همزیستی برای گیاه (به صورت کاهش مصرف ترکیبات کربنه) رخ می‌دهد (پیرسون و همکاران، 1994). بررسی کلی نتایج مایه‌زنی باکتریایی نشان می‌دهد، جدایه‌های مختلف یک گونه باکتری تاثیرات متفاوتی بر کلنیزاسیون قارچی AM در ریشه گیاه نخود دارد، با این وجود در اکثر حالات مایه‌زنی باکتریایی اثر افزایشی بر کلنیزاسیون قارچی در ریشه گیاه داشته است.

منابع

علی‌اصغرزاد ن و صالح راستین ن، 1375. اثرات تلقیح سویا با قارچ‌های میکوریز VA و باکتری Bradyrhizobium بر رشد و جذب عناصر غذایی در چند خاک اطراف کرج. مجله خاک و آب، جلد 10، شماره 10.

اصغرزاده ا و صالح راستین ن، 1375. بررسی پتانسیل تثبیت نیتروژن در همزیستی سویه‌های بومی Rhizobium با دو رقم نخود. پایاننامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس.

Aliasgharzadeh N, Saleh Rastin N, Towfighi H, Alizadeh A, 2001. Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of the Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. Mycorrhiza 11:119-122.

Antunes PM, Rajcan I, Goss MJ, 2006. Specific flavonoids as interconnecting signals in the tripartite symbiosis formed by arbuscular mycorrhizal fungi, Bradyrhizobium japonicum (kirchner) Jordan and soybean (Glycine max (L.) Merr.). Soil Biology & Biochemistry 38: 533-543.

Kawaguchi M, Minamisawa K, 2010. Plant–microbe communications for symbiosis. Plant Cell Physiology, 51(9):1377–1380.

Lisette J, Xavier C, Germida J, 2003. Selective interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobium leguminosarum bv. viceae enhance pea yield and nutrition. Biology & Fertility of Soils, 37: 261– 267.

Oldroyd GED, Harrison MJ, Udvardi M, 2005. Peace talks and trade deal. Keys to long – term harmony in legume- microbe symbiosis. Plant Phisiology, 137:1205-1210.

Pearson JN, Abbott LK, Jasper DA, 1994. Mediation of competition between two colonizing VA mycorrhizal fungi by the host plant. New Phytologist, 123:93–98.

Vierheilig H, Pihe Y, 2002. Signaling in arbuscular mycorrhiza: Facts and hypotheses, Kluwer Academic/Plenum Publishers, NewYork.

Xie ZP, Staehelin C, Vierheilig H, Wiemken A, Jabbouri S, Broughton WJ, Vögeli-Lange R, Boller T, 1995. Rhizobial nodulation factors stimulate mycorrhizal colonization of nodulating and nonnodulating soybeans. Plant Physiology, 108:1519–1525.