شانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

دانشگاه زنجان، ۵ تا ۷ شهریور ۱۳۹۸

محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی و شناسایی جدایه‌های Anabaena و اندازه‌گیری فاکتورهای محرک رشد آن‌ها

صاحب سودایی مشایی[۱*]، ناصر علی‌اصغرزاد[۲]، ندا سلطانی[۳]

[۱] دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، محقق بخش خاک و آب، موسسه تحقیقات برنج کشور در مازندران

[۲] استاد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[۳] استاد پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی

چکیده

سیانوباکتری‌ها، ساده‌ترین و یکی از بارزترین موجودات فتوسنتزی هستند که در فسیل‌های مربوط به دو میلیارد سال پیش حضور داشته‌اند. این پژوهش به منظور جداسازی و شناسایی جنس *آنابنا* بومی مزارع شالیزری استان گیلان و بررسی پتانسیل‌های محرک رشد آنها اجرا گردید. پس از خالص‌سازی، ۱۰ جدایه انتخاب و توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی با روش احیاء استیلن به اتیلن، توانایی تولید اکسین، انحلال فسفر معدنی و توانایی تولید سیدروفور با محیط Cas-Agar مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین جدایه‌های مختلف از نظر توانایی تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات، تولید اکسین و سیدروفور تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان تثبیت نیتروژن در جدایه GGuCy-42 (۳۸/۵۶ نانومول اتیلن برساعت) و کمترین میزان آن در جدایهGGuCy-21 (۱۰/۵۲ نانومول اتیلن برساعت) مشاهده شد. بیشترین میزان تولید اکسین برای تیمار ۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان در جدایه GGuCy-42 برابر ۱۰/۸۳، ۱۵/۸۱ و ۹/۲۱ میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a بود، همچنین بیشترین میزان حل‌کنندگی فسفر در جدایهGGuCy-42 (۶۴۱ میلی‌گرم فسفر برلیتر) و کمترین میزان آن در جدایه GGuCy-41 (۴۵/۶ میلی‌گرم فسفر برلیتر) و از لحاظ تولید سیدروفور جدایه GGuCy-21 حداکثر (۶/۶۹ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز) و در جدایه GGuCy-49 حداقل (۲/۵۶ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز) مشاهده شد.

کلمات کلیدی: ایندول استیک اسید، تثبیت نیتروژن اتمسفری، سیانوباکتری، سیدروفور، PGPR

مقدمه

پیش‌بینی‌ها نشان می‌دهد که تولید جهانی محصولات اصلی بایستی تا حدود ۷۰۰ میلیون تن افزایش یابند. سرعت چنین تغییرات جمعیتی با توجه به پیامدهای این تقاضا، اجازه حفظ و نگهداری قابلیت تولید خاک را نمی‌دهد (Denison و همکاران، ۲۰۱۱). به منظور بهبود عملکرد محصولات کشاورزی کودهای شیمیایی در سالهای گذشته بطور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است. اگرچه استفاده از کودهای شیمیایی عملکرد محصول را افزایش می‌دهد، بطور همزمان کیفیت خاک را تخریب کرده، ساختار طبیعی جامعه میکروبی خاک و چرخه طبیعی عناصر غذایی را بهم ریخته و مفهوم تولید پایدار را مختل کرده است. این مسائل ایجاب می‌نماید تا شیوه‌های جدیدی جهت افزایش تولید با توجه به توانایی بیوسفر ارائه شوند تا منابع تجدیدپذیر احیا و از طبیعت بطور بهینه استفاده گردد (Sharma و همکاران، ۲۰۱۱). تحقیقات مختلف محققین نشان می‌دهد که میکروب‌ها از جمله سیانوباکتری‌ها نقش ارزشمندی در تغذیه گیاه به‌واسطه تثبیت نیتروژن، حل‌کنندگی فسفات و سولفات، تولید هورمون‌های محرک رشد، افزایش

مقاومت به تنش‌ها، تولید ویتامین‌ها و مواد بیوکنترل بیماری‌زای گیاهی ایفا می‌کنند (Prakash و همکاران، ۲۰۱۵). سیانوباکتری‌ها با نام‌های جلبک-های سبز-آبی، سیانوفایتا و میکسوفایت شناخته می‌شوند. آنها فاقد کلروپلاست سازمان‌یافته بوده دارای دانه‌های کروماتوفور می‌باشند. طبقه‌بندی تاکسونومیک سیانوباکتری‌ها بسیار پیچیده است. سیانوباکتری‌ها در گذشته تنها بر اساس صفات ریخت شناسی طبقه بندی می‌شدند (Casamatta و همکاران، ۲۰۰۵)، از سوی دیگر سیانوباکتری‌ها براساس کدهای بین‌المللی نام‌گذاری پروکاریوتی نیز طبقه‌بندی شده‌اند. امروزه این طبقه‌بندی بر اساس روشهای مولکولی و ویژگی‌های فنوتیپی، شموتیپی و ژنوتیپی یک کشت خالص از سیانوباکتری‌هاست که به اصطلاح روش پلی‌فازیک نامیده می‌شود (Mishra و همکاران، ۲۰۱۳). سیانوباکتری‌ها می‌توانند نیتروژن هوا را تثبیت کنند و فراوانی آنها در برنجزارها اهمیت بسیاری دارد (Prassana و همکاران ۲۰۱۲).

* ایمیل نویسنده مسئول: ssoodaie78@gmail.com

اثبات شده که نزدیک ۴۰ درصد نیتروژن تثبیت شده سیانوباکتری‌ها توسط گیاه برنج مصرف می‌شود (Vaishampayan و همکاران ۱۹۹۸). نقش سیانوباکتری‌ها در حفظ نیتروژن خاک از طریق تثبیت نیتروژن (Hendrayanti و همکاران، ۲۰۱۸) و افزایش فعالیت فسفاتازی که فسفر نامحلول را به فرم محلول متحرک کرده (Mishra و همکاران، ۲۰۰۵)، بخوبی اثبات شده است.

یکی از راه های تأثیر باکتری ها بر رشد و نمو گیاهان سنتز فیتوهورمون ایندولی (IAA) است. این هورمون باعث توسعهٔ سیستم جذب توسط ریشهٔ گیاه و به دنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی به وسیلهٔ گیاه می شود (Sergeeva و همکاران، ۲۰۰۲). سیانوباکترها نیز کلات‌کننده‌های ویژه آهن با وزن مولکولی کم ۴۰۰ تا ۱۲۰۰ دالتون را تحت شرایط محدودیت آهن تولید میکنند. اسچیزوکینن یک سیدروفور مشتق شده از سیترات است که نخستین بار از سیانوباکتری Anabaena PCC 7120 گزارش شده است (Rastogi وSinha، ۲۰۰۹). متابولیسم نیتروژن و تولید سیدروفور بطور متقابل فرآیندهای منحصربفردی در سیانوباکتری‌ها هستند. در واقع رشد Anabaena variabilis در غیاب منبع نیتروژن نسبت به رشد در محیط حاوی نیترات سبب تولید میزان بیشتری از سیدروفور می‌شود (Sahu و همکاران، ۲۰۱۲). با نگاه به نقش بسیار مهم سیانوباکتری‌ها در تثبیت و فراهم آوردن نیتروژن مولکولی و سایر خصوصیات محرک رشد گیاه، در این پژوهش تلاش شد تا ضمن جداسازی و شناسایی جدایه‌های سیانوباکتری بومی شالیزارهای استان گیلان، خصوصیات تحریک کنندگی رشد گیاه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

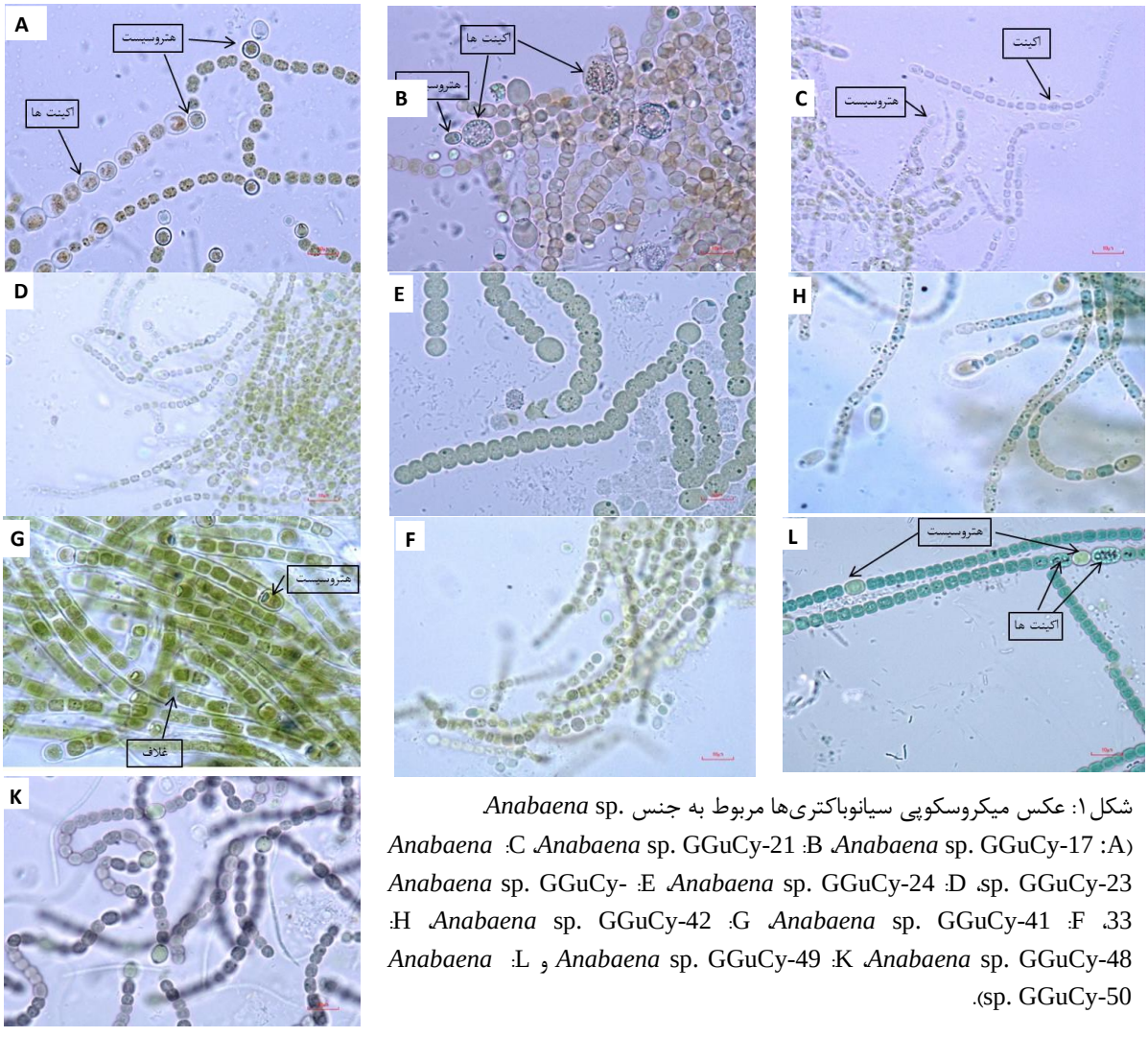
در پژوهش حاضر جداسازی سیانوباکتری‌ها از نمونه‌های خاک بر اساس روش کوشیک (۱۹۸۷) با محیط کشت BG11 (با نیتروژن) و BG110 (بدون نیتروژن) انجام گرفت. بعد از ظهور کلنی‌های سیانوباکتری بر روی سطح خاک حاوی محیط کشت، با انجام واکشت‌های مکرر در محیط کشت جامد نمونه‌های سیانوباکتری خالص شدند. برای شناسایی جدایه‌ها به روش مورفولوژیک، با تهیه لام نیمه دائمی از کلنی‌ها و با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی سیانوباکتری‌ها، مشخصات میکروسکوپیک و ماکروسکوپیک نمونه‌های مورد نظر شناسایی و تعیین شدند (Desikhachary، ۱۹۵۹; John و همکاران، ۲۰۰۳). توان تثبیت نیتروژن مولکولی با روش احیا استیلن به اتیلن (ARA) با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) اندازه‌گیری شد (سلطانی و همکاران، ۲۰۰۶). فعالیت حل‌کنندگی فسفات جدایه‌های سیانوباکتری‌ها، ابتدا محیط کشت مایع سیانوباکتریایی (BG11 و BG110) فاقد فسفر تهیه شده و بعد از کشت سیانوباکتری‌ها، به مدت دو هفته در اتاقک رشد نگهداری شد. سپس محیط کشت مایع (BG11 و BG110) جدید حاوی تری‌کلسیم فسفات (۰/۳ درصد) تهیه شده (Yandigeri و همکاران، ۲۰۱۱) و در هر ارلن مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شده و با ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتری تلقیح گردید. سوسپانسیون سیانوباکتری با تراکم جمعیتی OD750=0.5 بکار رفت. در آنها تلقیح شدند. پس از ۱۵ و ۳۰ روز نگهداری این محیط‌های کشت در اتاقک رشد، سوسپانسیون سیانوباکتری در دور ۶۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار فسفر معدنی محلول در مایع روشناور به روش اسید اسکوربیک (علی‌اصغرزاد، ۱۳۸۹) اندازه-گیری شدند. برای اندازه‌گیری کمی تولید IAA، محیط‌های کشت مایع سیانوباکتری‌ها (BG11 و BG110) آماده و به آنها اسیدآمینه ال‌تریپتوفان سترون شده با فیلتر (با غلظت‌های ۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه گردید، سپس مقدار مشخصی از سیانوباکتری‌ها (OD750=0.5) به ارلن‌های حاوی محیط کشت افزوده شده و در شرایط کشت قرار داده شدند. پس از ۱۵ روز از زمان کشت، مقداری از محیط کشت را برداشته و به مدت ۱۰ دقیقه و با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و یک میلی‌لیتر از محیط کشت سانتریفوژ شده با دو میلی‌لیتر از محلول سالکووفسکی (شامل ۱ میلی-لیتر از FeCl3 نیم مولار در ۵۰ میلی‌لیتر از پرکلریک اسید (HClO4) ۳۵ درصد مخلوط شدند. این ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت. و در نهایت با ایجاد رنگ صورتی تا قرمز و قرائت جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر (در طول موج ۵۳۰ نانومتر) و رسم منحنی استاندارد، غلظت IAA در نمونه‌های سیانوباکتری بصورت کمی و بر حسب میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a [µg IAA/(µg.Chla)] برآورد شده است. میزان کلروفیل a معیاری از مقدار زیست‌توده سیانوباکتری در سوسپاسیون است (Ahmad و همکاران، ۲۰۱۰). اندازه‌گیری تولید سیدروفور با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام گردید. به این منظور، ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر از محلول CAS را با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه مخلوط کرده و ۱۰ میلی‌لیتر از این محلول رقیق شده را به لوله‌های آزمایش اسیدواش اضافه کرده و به آن ۲ میلی‌لیتر مایع شفاف رویی محیط کشت سیانوباکتری اضافه گردید. سپس بعد از گذشت یک ساعت در جذب ۶۹۸ نانومتر اندازه‌گیری شد. منحنی استانداردسازی با DTPA حاوی ۰ ، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰

[1]Acetylene Reduction Assay

میکرومول DTPA بر لیتر به نسبت یک به پنج با محلول CAS مخلوط شده و با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان جذب قرائت گردید (Aliasgharzad و همکاران، ۲۰۰۹).

نتایج و بحث

به منظور شناسایی جدایه‌ها، مهمترین صفات رویشی و زایشی که در شناسایی مورفولوژیک نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفت، شکل و رنگ کلنی؛ شکل و رنگ و اندازه تالس؛ طول و عرض تریکم‌ها؛ شکل و اندازه و رنگ سلول‌های رویشی، هتروسیست و اکینت‌ها؛ بافت و تزئینات دیواره‌های سلول اکینت؛ موقعیت اکینت نسبت به هتروسیست؛ شکل سلول‌های رأسی، وجود یا عدم وجود غلاف موسیلاژی بودند. اعضای جنس Anabaena، سیانوباکتری‌های رشته‌ای هستند. اغلب بصورت دسته‌ای بوده برخی در توده‌های ژلاتینی بی‌شکل واقع‌اند. تعداد کمی از گونه‌ها نیز بصورت منفرد و پلانکتونیک (بصورت شناور) هستند، اغلب ایجاد لایه ژلاتینی توسعه یافته‌ای بر سطح بستره مرطوب می‌نمایند. تریکم‌ها تک ردیفه و در غالب موارد دانه تسبیحی بوده، مستقیم، خمیده یا بصورت مارپیچ هستند که ممکن است بصورت غلافدار یا فاقد غلاف مشاهده گردند. سلول‌ها اندکی متورم و در تعدادی از گونه‌ها استوانه‌ای شکل‌اند. اکینت‌ها پاراهتروسیتیک بوده، مدور، تخم مرغی یا استوانه‌ای و در پاره‌ای از موارد به شکل بیضی کشیده‌اند و در مجاورت هتروسیست یا بصورت فاصله‌دار واقع شده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱: عکس میکروسکوپی سیانوباکتری‌ها مربوط به جنس *Anabaena* sp. (A: *Anabaena* sp. GGuCy-17، B: *Anabaena* sp. GGuCy-21، C: *Anabaena* sp. GGuCy-23، D: *Anabaena* sp. GGuCy-24، E: *Anabaena* sp. GGuCy-33، F: *Anabaena* sp. GGuCy-41، G: *Anabaena* sp. GGuCy-42، H: *Anabaena* sp. GGuCy-48، K: *Anabaena* sp. GGuCy-49 و L: *Anabaena* sp. GGuCy-50).

چهار خصوصیات محرک رشدی شامل فعالیت نیتروژنازی، حل‌کنندگی فسفات، تولید اکسین و سیدروفور در این تحقیق درنظر گرفته شده است. در بین ۱۰ جدایه آنابنا مورد بررسی ۴۰ درصد جدایه‌ها توان تثبیت نیتروژن مولکولی بهتری از خود نشان دادند. بیش‌ترین مقدار فعالیت نیتروژنازی یا احیاء استیلن به اتیلن در جدایه GGuCy-42 و به میزان ۳۸/۵۶ نانومول اتیلن بر ساعت و کمترین آن در جدایه GGuCy-21 و به میزان ۱۰/۵۲ نانومول اتیلن بر ساعت مشاهده شد. Rana و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که جنس Anabaena و Calothrix روی کیفیت تغذیه‌ای دانه گندم از لحاظ محتوی پروتئین و عناصر ریزمغذی مهم (آهن، روی و منگنز) تاثیر گذاشته که نشان دهنده جریان مثبت تثبیت نیتروژن از مایه تلقیحی سیانوباکتری به گندم جهت بهبود تولید بوده است. محققان نشان دادند که سیانوباکتری‌های آزادزی می‌توانند حدود ۲۰-۳۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در سال به خاک اضافه نمایند (Issa و همکاران، ۲۰۱۴). بالاترین میزان تثبیت نیتروژن مولکولی جدایه‌های ازتوباکتر توسط رجایی و همکاران (۲۰۰۷) و دولتی و همکاران (۱۳۹۱) به ترتیب ۸/۳ و ۴۲۸/۲ نانومول اتیلن بر ساعت گزارش نمودند.

جدول ۱: مقادیر فعالیت نیتروژنازی، حل‌کنندگی فسفات، تولید اکسین و سیدروفور در جدایه‌های Anabaena ssp

جدایه سیانوباکتری	انحلال فسفر (mgP/l)		سیدروفور	اکسین* (µg/µg Chla)			فعالیت نیتروژنازی
	۱۵ روز	۳۰ روز	(µmol/ml.day)	0 (µg/mL) Trp	100 (µg/mL) Trp	500 (µg/mL) Trp	(nmol C_2H_4/h)
Anabaena sp. GGuCy-17	۶۴۱/۰a	۲۸۱/۳a	۳/۹۵cde	+	++	+	۲۲/۶۳b
Anabaena sp. GGuCy-21	۶۰/۴gh	۱۰/۹hl	۶/۶۹a	+	+	+	۱۰/۵۲e
Anabaena sp. GGuCy-23	۱۰۲/۲b	۲۳/۴gh	۳/۴۴de	+	-	-	۲۲/۹۲b
Anabaena sp. GGuCy-24	۸۲/۸d	۱۷/۲gh	۴/۳۱bcd	-	+	+	۱۱/۷۷de
Anabaena sp. GGuCy-33	۹۸/۴bc	۹۹/۵bc	۳/۰۷def	-	+	+	۲۱/۱۱b
Anabaena sp. GGuCy-41	۴۵/۶h	۲۰/۰gh	۴/۹۴bc	+	+	+	۱۴/۶۳cd
Anabaena sp. GGuCy-42	۷۹/۶de	۱۶/۲gh	۳/۳۸de	+	++	+	۳۸/۵۶a
Anabaena sp. GGuCy-48	۹۵/۳cd	۲۷/۹gh	۵/۷۵ab	-	-	+	۱۴/۴۰cd
Anabaena sp. GGuCy-49	۷۹/۴de	۱۷/۳gh	۲/۵۶fg	+	+	+	۱۰/۶۲e
Anabaena sp. GGuCy-50	۹۶/۷cd	۲۲/۱gh	۳/۴۴de	+	+	+	۱۲/۵۷de

*علائم: +++ (گروه ۱: توان بالا با تولید بیش از ۲۰ µg/µg Chla)، ++ (گروه ۲: توان متوسط با تولید ۱۰-۲۰ µg/µg Chla)، + (گروه ۳: توان ضعیف با تولید کمتر از ۱۰ µg/µg Chla) و ـ (گروه ۴: بدون تولید IAA).

مقایسه میانگین انحلال فسفر در محلول روشناور بعد از گذشت ۱۵ و ۳۰ روز بعد تلقیح در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۱). غلظت فسفر محلول در ۱۵ روز بعد از تلقیح جدایه‌های مورد آزمایش، بین ۴۵/۶ تا ۶۴۱ میلی‌گرم فسفر بر لیتر متغیر بود. جدایه Anabaena sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه جدایه‌ها از لحاظ مقدار حل‌کنندگی فسفات (۶۴۱ میلی‌گرم فسفر بر لیتر) برتری قابل ملاحظه‌ای را نشان داد. تولید اسید فتالیک، عامل عمده برای انحلال فسفات بوسیله سیانوباکتری‌ها توسط یاندجری و همکاران (۲۰۱۱) معرفی شده است.

سنجش کمی تولید IAA توسط سیانوباکتری‌ها در مقادیر مختلف اسیدآمینه ال-تریپتوفان و در ۱۵ روز بعد از تلقیح، برای جدایه‌های مختلف آنابنا در جدول ۱ نشان داده شد. جدایه‌های مختلف سیانوباکتری از نظر توان تولید IAA به چهار گروه شامل (گروه ۱ با توان تولید بالا (۲۰ ≤ میکروگرم IAA در میکروگرم کلروفیل a)، گروه ۲ با توان تولید متوسط (۲۰-۱۰ میکروگرم IAA در میکروگرم کلروفیل a)، گروه ۳ با توان تولید پایین (۱۰ > میکروگرم IAA در میکروگرم کلروفیل a) و گروه ۴ با عدم توانایی تولید IAA) تقسیم‌بندی شده‌اند (Torres-Rubio و همکاران، ۲۰۰۰). در تیمار بدون تریپتوفان ۷۰ درصد از جدایه‌ها در گروه ۳ (توان تولید پایین) قرار گرفتند و بقیه جدایه‌ها در گروه ۴ (عدم توان تولید) جای گرفتند. در تیمار ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ال-تریپتوفان ۲۰ درصد جدایه‌ها در گروه ۲ (توان تولید متوسط)، ۶۰ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین) و ۲۰ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) قرار گرفتند. در تیمار ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ال-تریپتوفان ۹۰ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین) و ۱۰ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) جای گرفتند. آزمون کمی توان تولید IAA برای تیمار بدون ال-تریپتوفان در جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 برابر ۱۰/۸۳ میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a، در تیمار ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 برابر ۱۵/۸۱ و ۹/۲۱ میکروگرم IAA بر میکروگرم کلروفیل a، بیشترین مقادیر اکسین (IAA) را نشان دادند. گزارشات متعددی تولید فیتوهورمون IAA توسط سویه‌های سیانوباکتریایی آزادزی و همزیست را نشان داده‌اند (Prassana و همکاران، ۲۰۰۹). Mazhar و Hasnain (۲۰۱۱) در غلظت‌های

مختلف ال-تریپتوفان مقدار تولید IAA را برای دو سویه سیانوباکتری بدست آوردند و نشان دادند که تا غلظت حدود ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقدار تولید IAA افزایش یافته و بعد از آن تا غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مقدار تولید کاهش یافته است. بنابراین افزودن مقدار مناسب ال-تریپتوفان به محیط تا حدی می‌تواند باعث تولید اکسین گردد و افزودن بیش از حد تأثیری در تولید اکسین ندارد و سرعت تشکیل اکسین را پایین می‌آورد و می‌تواند موجب تحریک و تولید اتیلن تنشی شود.

همه جدایه‌های Anabaena قادر به تولید سیدروفور بودند (جدول۱). تولید سیدروفور در جدایه‌های GGuCy-21 و GGuCy-48 بیشترین مقدار به ترتیب ۶/۶۹ و ۵/۶۹ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز حاصل گردید (جدول ۱). ۴۰ درصد از جدایه‌ها تولید سیدروفور بیش از حد متوسط (۴/۱۵ میکرومول بر میلی‌لیتر در روز) داشتند. بررسی Trick و Kerry (۱۹۹۲) نشان داد که دو جدایه Synechococcus sp. PCC 7492 و Aanbaena variabilis به‌ترتیب سیدروفوری با وزن مولکولی ۳۱۰ و ۵۲۰ دالتون از نوع کاتکول تولید می‌کنند. در سال‌های اخیر، نمونه‌هایی از جذب آهن بواسطه سیدروفور در میان سیانوباکتری‌ها دوباره مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند، در واقع مطالعات بیوشیمیایی و ژنتیکی نشان داد که همه سیانوباکتری‌ها دارای یک سیستم جذب مبتنی بر سیدروفور نیستند و مسیرهای جایگزین برای جذب آهن در آنها وجود دارد (Lis و همکاران، ۲۰۱۵). اهمیت احیای آهن بواسطه سوپراکسید به عنوان روش جایگزین در سیانوباکتری Lyngbya majuscule به اثبات رسیده است. همچنین هزینه متابولیکی بیوسنتز و انتقال سیدروفور زیاد است (Lis و همکاران، ۲۰۱۴).

نتیجه‌گیری

سیانوباکتری‌ها نقش مهمی در محیط زیست بعنوان فراهم‌کننده عناصر غذایی در کشاورزی ایفا می‌کنند. مطالعات تنوع و فراوانی نشان دادند که سیانوباکتری‌های هتروسیست‌دار Nostoc و Anabaena با گستره حدود ۴۰ تا ۹۰ درصد در خاک‌های شالیزاری غالب هستند. با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت که سیانوباکتری‌های جنس آنابنا قطعاً بر رشد گیاه تاثیر می‌گذارند. آنها به رشد و نمو گیاهان با انتقال مستقیم یا غیرمستقیم نیتروژن تثبیت شده یا از طریق بهبود کیفیت خاک و وضعیت عناصر غذایی و انحلال فسفات‌ها و همچنین تولید هورمون‌ها و مواد محرک رشد کمک می‌کنند. در آزمایش حاضر جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 دارای قدرت تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات معدنی بالایی بوده که می‌توان کاربرد عملی آنها به‌عنوان منبع کود زیستی برای برنج را پیشنهاد داد. بیشترین مقدار اکسین در غلظت صفر تریپتوفان توسط جدایه Anabaena sp. GGuCy-42 تولید شد (جدول ۱)، بنابراین مسیرهای مستقل از تریپتوفان در آنها وجود دارند یا تغییر مسیر بیوسنتز اکسین می‌تواند علت آن باشد. برای کاربردی شدن این جدایه‌های برتر در جهت توسعه زاد مایه آنها در منطقه نیاز است این جدایه‌ها بتوانند به خوبی در آشیان اکولوژیک خود مستقر شوند و حداکثر مزایا را برای محصول فراهم کنند. بدیهی است برای نیل به این هدف، نیاز به انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای با این جدایه‌ها می‌باشد.

منابع

Aliasgharzad N, Shirmohamadi E and Oustan S. 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. Soil and Environment. 28(2): 119-123.

Casamatta D.A., Johansen J.R., Vis M.L., Broadwater S.T. Molecular and morphological characterization of ten polar and near-polar strains within the Oscillatoriales (Cyanobacteria). Journal of Phycology 2005; 41: 421- 38.

Denison RF and Kiers ET. 2011. Life histories of symbiotic rhizobia and review Mycorrhizal fungi, Current Biology, 21: 775–785.

Hendrayanti, D., Khoiriyah, I., Fadilah, N. and Salamah, A. 2018. Diversity of N2-fixing cyanobacteria in organic rice field during the cycle of rice crops. Inventing Prosperous Future through Biological Research and Tropical Biodiversity Management. https://doi.org/10.1063/1.5050107.

Issa, A.A., Abd-Alla, M.H., Ohyama, T., 2014. Nitrogen fixing cyanobacteria: future prospect. In: Ohyama, T. (Ed.), Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation. In Tech, p. 282.

Lis H, Kranzler C, Keren N and Shaked Y. 2015. A Comparative Study of Iron Uptake Rates and Mechanisms amongst Marine and Fresh Water Cyanobacteria: Prevalence of Reductive Iron Uptake. Life, 5:841-860.

Mazhar S and Hasnain S. 2011. Screening of native plant growth promoting cyanobacteria and their impact on Triticum aestivum var. Uqab 2000 growth. African Journal of Agricultural Research, 6(17): 3988-3993.

Mishra A.K., Shukla E., Singh S.S. Phlogenetic comparison among the heterocystous cyanobacteria based on a polyphasic approach. Protoplasma 2013; 250 (1):77- 94.

Mishra Y, Bhargava P, Chaurasia N and Rai LC. 2013. Proteomic evaluation of the non-survival of *Anabaena doliolum* (Cyanophyta) at elevated temperatures. European Journal of Phycology, 44(4): 551–565.

Prakash O, Sharma R, Rahi P and Karthikeyan N. 2015. Role of Microorganisms in Plant Nutrition and Health. In: Rakshit A., Singh HB. and Sen A. (eds.), Nutrient Use Efficiency: from Basics to Advances, 125-140.

Prasanna R, Jaiswal P, Shrikrishna J, Joshi M, Nain L, Rana A and Shivay YS. 2012. Evaluating the potential of rhizo-cyanobacteria as inoculants for rice and wheat. Journal of Agricultural Technology. 8(1): 157-171.

Rana, A., Joshi, M., Prasanna, R., Shivay, Y.S., Nain, L., 2012. Biofortification of wheat through inoculation of plant growth promoting rhizobacteria and cyanobacteria. Eur. J. Soil Biol. 50, 118–126.

Rastogi R.P. and Sinha R.P. 2009. Biotechnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. Biotechnology Advances, 27: 521-539.

Sahu D., Priyadarshani I. and Rath B. 2012. Cyanobacteria- as potential biofertilizers. CIBTech Journal of Microbiology. 1(2-3): pp.20-26.

Sharma NK, Tiwari SP, Tripathi K and Rai AK. 2011. Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): facts and challenges. Journal of Applied Phycology, 23:1059–1081.

Soltani N, Khavari-Nejad R, Tabatabaie M, Shokravi SH and Valiente EF. 2006. Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium Fischerella ambigua strain FS18 under different irradiance and pH. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 22 (6): 571-576.

Torres-Rubio MG, Astrid S, Castillo J and Martiners P. 2000. Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. And Pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and Siderophores, from colombian rice rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 42: 171-176.

Trick CG and Kerry A. 1992. Isolation and Purification of Siderophores Produced by Cyanobacteria, Synechococcus sp. PCC 7942 and Anabaena variabilis ATCC 29413. Current Microbiology, 24: 241-245.

Vaishampayan A, Sinha RP and Häder DP. 1998. Use of genetically improved nitrogen-fixing Cyanobacteria in rice paddy fields: Prospects as a source material for engineering herbicide sensitivity and resistance in plants. Botanica Acta, 111: 176–190.

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation and identification of *Anabaena* spp and evaluation of their plant growth promoting properties

Saheb Soodaee Mashaee[1*], Naser Aliasgharzad[2], Neda Soltani[3]

[1] Ph.D. of soil biology and biotechnology, Researcher of Rice Research Institute in Mazandaran, Iran

[2] Professor of soil biology, department of soil science, University of Tabriz, Iran

[3] Professor, Department of Biology, Research Institute of Applied Science, University of Shahid Beheshti, Iran

Abstract

Cyanobacteria are the simplest and one of the most visible photosynthetic organisms that have been present in fossils about two billion years ago. This research aimed the isolation of local Anabaena under cultivation of paddy field in Gilan province and their potential growth promoting-ability. After isolation, 10 isolates selected and their ability to molecular nitrogen fixation were tested with Acetylene to Ethylene reduction method. Their ability in auxin production and solubilizing the mineral P were tested with colorimetric method and siderophore production potential was tested with Cas-agar medium. The results showed that among of isolates being significant difference in terms of nitrogen fixation ability, phosphate solubilizing, oxin and siderophore production. The maximum nitrogen fixation was in GGuCy-42 (38.56 nmol. Ethylene. h^{-1}) and minimum in GGuCy-21 (10.56 nmol. Ethylene. h^{-1}). Auxin production was highest for 0, 100 and 500 (mgL-Trp ml^{-1}) in GGuCy-42 isolate equal to 10.83, 15.81 and 9.21 µg/µg Chla. Also maximum phosphate solubilizing was in GGuCy-42 isolate (641 mgP/l) and minimum in GGuCy-41 isolates (45.6 mgP/l), in terms of siderophore production was observed in GGuCy-21 (6.69 µmol/ml.day) and minimum in GGuCy-49 (2.56 µmol/ml.day).

Keywords: IAA, Atmospheric Nitrogen fixation, Cyanobacteria, Siderophore, PGPR

[1]Corresponding author: ssoodaie78@gmail.com