شناسایی استرینهای متحمل به شوری و خشکی سینوریزوبیوم ملیلوتی

مجید دشتی[۱]، امیر لکزیان[۲] و الهه بینش [۳]

۱- عضو هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی

majiddashti@yahoo.com و dashti@kanrrc.ac.ir

۲- عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی مشهد

۳- کارشناس میکروبیولوژی مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی مشهد

مقدمه

سطح قابل توجهی از مساحت ایران را خاکهای شور و خشک تشکیل می‌دهد ، شوری در اراضی کشاورزی در اثر عواملی چون آبیاری با آبهای شور و استفاده غیر علمی از کودهای شیمیایی تشدید می‌شود، علاوه براین سطوح بسیار پائین مواد آلی و نیتروژن در خاکها بزرگترین عوامل برای عملکرد پائین در خاکهای شور ایران می‌باشند. کودهای شیمیایی بطور معمول به منظور جبران کمبود نیتروژن استفاده می‌شوند، اما این امر علاوه بر افزایش مشکلات شوری خاک، باعث غیر اقتصادی شدن تولید علوفه‌می‌شود. بهترین شیوه جهت رفع این مشکلات استفاده از میکروارگانیسم های تثبیت کننده ازت سازگار به شرایط خشک و شور خاک است که ضمن بهبود باروری، شرایط مناسبی برای خاک فراهم سازند. یونجه یکی از میزبانهای باکتری *Sinorhizobium meliloti* بوده که بیشترین پتانسیل تثبیت نیتروژن را دارا می‌باشد [۴ و ۷] علیرغم این پتاسیل، عملکردو ظرفیت تثبیت نیتروژن در شرایط شوری کاهش می‌یابد. شوری خاک بر روی روابط همزیستی در شروع رشد یونجه و باکتری تأثیر گذاشته و نیز درهمزیستی، باعث جلوگیری از تشکیل گره و تثبیت نیتروژن می‌شود [۶ و۹] .گالشی و اخوان [۲] نتیجه گرفتند که باکتریهای *Sinorhizobium meliloti* در محیط کشت کنترل شده آگار، تا حدود ۲ درصد کلرور سدیم افزایش رشد نشان می دهند ولی پس از آن رشدشان کاهش می‌یابد. سویه‌های تجاری ریزوبیوم معمولاً قادر به تحمل سطوح بالای تنش اسمزی حاصل از خشکی با شوری نمی‌باشند [۵]، با وجود این ممکن است میزان تثبیت نیتروژن بیشتری در شرایط بدون تنش داشته باشند [۱]. این تحقیق با هدف جداسازی، شناسائی وخالص سازی سویه‌های سینو ریزوبیوم ملیلوتی مقاوم به شوری و خشکی جهت تلقیح به بستر کشت واریته های یونجه محلی ، در مناطق خشک و شور در انجام گردیده است.

مواد و روشها

جداسازی باکتریها از گره‌های ریشه وآزمون شناسائی اولیه سویه‌ها با استفاده از روشهای معمول صورت گرفت [۱۰و۱۱] . در این مرحله از آزمایش ۸۰ سویه باکتری جمع آوری و نگهداری شدند. به منظور اثبات گره زائی بذور گونه‌های یکساله و چند ساله یونجه پس از جوانه زنی در شرایط کاملاً استریل به لوله های آزمایش محتوی محلول غذائی فاقد ازت هویت منتقل شدند. یک سی‌سی از سوسپانسیون هر یک از سویه ها ، در زمان ظهور برگهای لپه‌ای، روی سطح محلول غذائی ریخته شد. در این مرحله از آزمایش ۴۴ سویه موفق به گره‌زائی شدند.

به منظور مطالعه مقاومت به خشکی و شوری در لوله‌های آزمایش (۱۵۰ * ۱۴ میلیمتری) محتوی ۳ سی سی محیط کشت YEMB، تیمارهای مختلف شوری NaCl (صفر ، ۱۵۰ ، ۳۰۰ ، ۴۵۰ ، ۶۰۰ و۷۵۰میلی مولار) و خشکی (صفر، ۰/۲- ،۰/۴- ، ۰/۶- ،۰/۸- و۱- مگاپاسکال) با استفاده از PEG6000 اعمال گردید. پس از تلقیح استرینها، لوله‌های آزمایش به انکوباتور ۱±۲۸ درجه سانتیگراد برای مدت ۷۲ ساعت قرارداده شدند و رشد باکتریها درتیمارهای فوق با اندازه‌گیری دانسیته نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومترتعیین گردید. هر دو آزمون بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گردیدو داده‌ها توسط نرم افزار SAS 6.0 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج نشان دادند که اختلاف بسیار معنی داری در کدورت رشد ۴۴ سویه در ۴۲۰ نانومتر تحت شرایط شوری وجود دارد. کلیه سویه ها در تیمار شاهد (صفر میلی مولار NaCl) بخوبی رشد کردند و تحت این شرایط ۶ سویه دارای دانسیته نوری بالای ۱ بودند. در غلظتهای بالای ۶۰۰ میلی مولار، رشد باکتریها به شدت تحت تأثیر قرار گرفت و کدورت تنها ۸ سویه در محیط کشت از دانسیته نوری ۰/۱ تجاوز نمود. این سویه‌ها به عنوان مقاوم به شوری در نظر گرفته شدند. نتایج نشان دادند که سویه های مقاوم به شوری همیشه از خاکهای شور منشأ نمی گیرند بر اساس یافته های آزمایش سویه های مقاوم حداکثر تا ۳/۵ درصد نمک NaCl را تحمل می‌کنند . این نتیجه با یافته های استین بورن و رافلی [۸] نیز موافقت دارد، نتایج همچنین حاکی از آن است که در غلظت ۴۵۰ میلی مولارNaCl ،کدورت رشد باکتریها در مقایسه با تیمار شاهد به میزان ۵۷٪ کاهش می یابد. بوسفورد (۳) معتقد است که در غلظت ۲۹۱ میلی مولار جمعیت *S.meliloti* به میزان ۵۰ درصد کاهش می یابد. کلیه سویه های مورد آزمایش تا پتانسیل ۰/۴- مگاپاسکال را بخوبی تحمل کردند و دانسیته نوری آنها همگی بالاتر از ۰/۱ بود ، با وجود این در پتانسیلهای ۰/۶- ، ۰/۸- و ۱- مگاپاسکال به ترتیب ۲۵٪ ،۳۰٪ و ۹۰٪ سویه ها از کدورت رشد کمتر از ۰/۱ برخوردار بودند. بر همین اساس تنها تعداد معدودی از سویه ها توانستند در پتانسیل ۱MPa- از رشد مطلوبی بر خوردار باشند.

منابع

[۱] دشتی ، مجید. ۱۳۷۵. تأثیر سوشهای سینوریزوبیوم ملیلوتی بر تثبیت ازت و خصوصیات رشد در سه گونه یونجه یکساله. پایان نامه کارشناسی ارشد زراعت. دانشگاه آزاد اسلامی ـ واحد کرج.

[۲] گالشی علی آبادی ، س. و اخوان خرازیان ، م. ۱۳۷۰. بررسی مقاومت به شوری باکتری ریزوبیوم ملیلوتی . دانشگاه صنعتی اصفهان.

[3] Bostford J.L.1984. Osmoregulation in Rhizobium meliloti L., Inhibition of growth by salts. Arch. Microbiology. 137:124-127

[4] Dixcon ,R.O.D. and C.T. wheeler.1985. Nitrogen fixation in plants. Chapman and Hall. Landon.

[5] Lakshmi-Kumari, M.,C.S.singh and N.S. subba Rao. 1974. Root hair infection and nodulation of lucerne as influence by salinity and alkalinity. Plant and soil. 40:1310-1316.

[6] Singleton, P.W. and B.B Bohlool. 1983. Effect of salinity on the functioinal components of the soybean-Rhizobium Japonicum symbiosis. Crop Science. 23:815-818.

[7] Sprent, J.I. and P. Sprent. 1990. Nitrogen fixing organisms. Chapman and Hall. Landon.

[8] Steinborn , J. and Roughley R.J. 1974. Sodium chloride as a cause of low numbers of rhizobium in legume inoculants, J. of Appl. Bact. 37:93-99.

[9] Subba Rao N.S. ,Lakshemi- Kumari M., Singh C.S. and Magu S.P. 1972. Nodulation of Lucerene (Medicago sativa L.) under the influence of sodium chloride. Indian J. of Agron. Sci.,42:384-388.

[10] Vincent, J.M. 1970. A manual for the practicical study of root nodule Bacteria, Blockbill. Oxford.

[11] Vincent, J.M. 1982. Nitrogen fixation in legumes. Academic press. London.