محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

بررسی توان همزیستی و شناسایی سویه‌های برتر باکتری‌های بومی همزیست عدس

الهام شمشیری‌پور[۱]، کاظم خاوازی[۲*]، شکوفه رضایی[۳]

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

[۲] استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران

[۳] استادیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

چکیده

استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژن، علیرغم افزایش عملکرد محصولات کشاورزی باعث صدمه جدی به محیط زیست می‌شود، لذا لزوم دستیابی به کودهای بیولوژیک بیش از پیش احساس می‌شود. با توجه به اینکه سویه‌های باکتری بومی توان ماندگاری بیشتری داشته و کارایی بهتری دارند، تحقیق حاضر بر روی ۹۵ جدایه باکتری همزیست با گیاه عدس انجام شد. جدایه‌ها از ۸۴ مزرعه در ۷ استان کشور که بیشترین سطح زیرکشت عدس را دارند جداسازی شد. آزمون توان همزیستی به همراه تست آلوده‌سازی گیاه با باکتری (Plant infection test) صورت گرفت. بدین منظور بذرهای عدس رقم بیله سوار درلوله‌های آزمایش حاوی محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن و آگار،کشت و در سه تکرار با هریک از جدایه‌های باکتری تلقیح شد. گیاهان در گلخانه قرار گرفت و پس از گذشت ۲ ماه از نظر وزن خشک اندام هوایی، طول ساقه، تعداد گرهک و خصوصیات ظاهری ریشه و اندام هوایی بررسی و با استفاده از وزن خشک اندام هوایی، کارایی زیستی هریک از سویه‌ها محاسبه شد. از این میان ۱۹ سویه برتر که موجب افزایش بیشتری در عملکرد و وزن خشک اندام هوایی شده بودند با در نظر گرفتن پراکندگی استانی انتخاب شد. در نهایت ۱۹ سویه وارد شناسایی مولکولی شد. باکتری‌های منتخب بر اساس توالی 16SrRNA شناسایی شدند. در نهایت تمامی سویه‌هاریزوبیوم لگومینوزارم بودند.

کلمات کلیدی: وزن خشک، عدس، تثبیت ازت، ریزوبیوم لگومینوزاروم

مقدمه

کاربرد کودهای نیتروژنه، غلظت نیترات در خاک بعد از برداشت محصول را افزایش می‌دهد که این وضعیت می‌تواند منجر به افزایش آلودگی آب‌های آشامیدنی با نیترات شود. یکی از روش‌هایی که می‌تواند استفاده از کودهای شیمیایی مانند اوره را کاهش دهد، کاربرد تثبیت‌کننده بیولوژیک نیتروژن است (Azarpour و همکاران، ۲۰۱۲). عدس (Lens culinaris Medik) یکی از مهمترین لگومها است(FAOSTAT، ۲۰۱۷). این گیاه قادر به ایجاد همزیستی با باکتری Rhizobium leguminosarum b viciae است (Weir، ۲۰۱۱). در اکثر آزمایشات انجام شده، استفاده از مایه تلقیح‌های ریزوبیومی به‌طور متوسط باعث افزایش عملکرد دانه به میزان ۲۹ تا ۳۴ درصد می‌شود(Toklu و همکاران، ۲۰۰۹). به‌منظور دستیابی به حداکثر تولید عدس، غربالگری جدایه‌های بومی ریزوبیوم برای تأمین نیتروژن کافی برای آن‌ها حیاتی است(Anglade و همکاران، ۲۰۱۵). بطور کلی هرچه میزان نیتروژن حاصل از تثبیت بالاتر باشد، میزان عملکرد ماده خشک بیشتر است(Hafeez و همکاران، ۲۰۰۰).R.leguminosarum اصلی‌ترین گونه برای گره‌زایی در قبیله ماش (Vicieae) است(Tian و همکاران، ۲۰۱۰). اگرچه گونه‌های از لحاظ ژنتیکی نزدیک R.fabae و R. pisi نیز گزارش شده‌اند (Tian و همکاران، ۲۰۰۸). به دلیل اهمیت فراوان دستیابی به سویه‌های بومی برتر باکتری همزیست با گیاه عدس جهت تولید کود بیولوژیک جایگزین کودهای شیمیایی، پژوهش حاضر بر روی ۹۵ جدایه باکتری همزیست عدس انجام شد.

مواد و روش‌ها

آزمون تعیین کارایی همزیستی (Symbiosis Efficiency (S.E.: به‌منظور انجام این آزمایش، بذر عدس رقم بیله سوار به دلیل دارا بودن بیشترین سطح کشت در کشور انتخاب شد. بذر های عدس، پس از استریل و جوانه دار شدن در لوله های شیشه ای حاوی محیط کشت مناسب برای رشد گیاه و فاقد منبع نیتروژن کاشته شدند. محیط کشتYMB تهیه و پس از توزیع در ارلن‌های ۵۰ سی‌سی استریل گردید. به میزان یک لوپ از هر یک از جدایه‌ها داخل هریک از ارلن‌ها اضافه و به مدت ۴۸ ساعت داخل شیکر انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت و مشاهده

*ایمیل نویسنده مسئول: kkhavazi@yahoo.com

کدورت، کشت باکتری مورد استفاده قرار گرفت. ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت بالای 10^8سلول در هر میلی‌لیتر که قبلاً به روش plate count شمارش شده‌اند به لوله‌ها اضافه شدند. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی نیز به عنوان شاهد بدون تلقیح در سطوح نیتروژن ۰، ۲۰، ۳۵و ۷۰ ppm در نظر گرفته شد. پس از گذشت دو ماه، زمانی که گیاهان در مرحله گلدهی یا غلاف‌دهی بودند، قسمت‌های هوایی گیاه از ناحیه طوقه قطع و ریشه‌ها پس از شستشو و خشک کردن در پاکت‌های جداگانه قرار داده شدند. طول اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه و تعداد گره‌ها اندازه‌گیری شدند. همچنین خصوصیات ظاهری گیاه از نظر تشکیل یا عدم تشکیل گل و بذر نیز یادداشت شدند. برای محاسبه میزان کارایی همزیستی از وزن خشک اندام هوایی استفاده شد. میزان کارایی همزیستی باکتری‌ها از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$SE = \frac{I.C}{N.C} \times 100$$

دراین فرمول I: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار تلقیح شده، C: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد بدون تلقیح و N: وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد نیتروژنی است. در ارزیابی کارایی همزیستی S.E.≤۵۰: نسبتا موثر (ضعیف)،۷۵-۵۰=S.E.:موثر (متوسط)، ۱۰۰-۷۵ =S.E.:کارایی خوب و S.E.≥۱۰۰: کارایی بسیار خوب و به عنوان سویه برتر انتخاب می‌شوند(خسروی، ۱۳۹۴).

شناسایی مولکولی: جهت استخراج DNA سویه‌های برتر، برای شناسایی مولکولی از کیت استخراج مخصوص باکتری‌های گرم منفی CinnaPureDNA استفاده شد. تکثیر ناحیه ژنی 16SrRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی Polymerase Chaine Reraction 27F انجام شد. جهت اطمینان از صحت استخراج DNA، محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16SrRNA از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE(0.5X) عبور داده شد. قطعات حاصل از توالی 16SrRNA به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتیجه توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح شده و سپس توالی بدست آمده در پایگاه NCBI، با توالی‌های موجود مقایسه شد.

آنالیزهای آماری: در کشت گلخانه‌ای از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. پس از اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر در نمونه‌ها، آنالیز نتایج توسط نرم افزار SAS و مقایسه‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از مقایسه تیمارهای شاهد نیتروژنی، شاهد نیتروژنی ۷۰ ppm به دلیل کارایی بیشتر به‌عنوان شاهد برتر در محاسبه کارایی همزیستی استفاده شد (جدول ۱).

جدول۱. مقایسه تیمارهای شاهد نیتروژن از نظر تأثیر بر رشد گیاه عدس

شاهد نیتروژنی	میانگین وزن خشک اندام هوایی ($gr.pot^{-1}$)	میانگین طول گیاه (cm)
N control 70 ppm	۰/۱۴۸	۲۳/۳۰۰
N control 35 ppm	۰/۰۸۲	۱۹/۹۳۳
N control 0 ppm	۰/۰۸۲	۱۷/۶۶۷
N control 20 ppm	۰/۰۴۴	۱۶/۶۰۰

نتایج آزمون توان همزیستی: جداول تجزیه واریانس نشان داد که تأثیر تیمارهای باکتریایی بر وزن خشک اندام هوایی، کارایی همزیستی، طول اندام هوایی و تعداد گرهک تشکیل شده در ریشه گیاه عدس در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جداول ۲ و ۳).

جدول ۲. تجزیه واریانس تأثیرتیمارهای باکتریایی بر وزن خشک، کارایی همزیستی و طول اندام هوایی گیاه عدس

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		وزن خشک (gr)	کارایی همزیستی	طول اندام هوایی
تیمار	۹۵	۰/۰۰۲۵۱**	۶۸۹۳**	۲۶/۳۹**
خطا	۱۹۸	۰/۰۰۰۹۵	۲۸۱۳	۱۷/۶۸

**و **به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns نشان دهنده عدم معنی‌دارمی‌باشند.

جدول ۳. تجزیه واریانس تأثیرتیمارهای باکتریایی بر تعداد گرهک تشکیل شده در ریشه گیاه عدس

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		تعداد گره
تیمار	۹۴	۴۵/۶۹**
خطا	۱۹۳	۲۸/۱۱

*و **به ترتیب نشان دهنده معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و ns نشان دهنده عدم معنی‌دارمی‌باشند.

تحقیقات مشابه برو روی عدس نشان داد که تأثیر تیمارهای باکتریایی بر وزن خشک اندام هوایی، کارایی همزیستی، طول اندام هوایی و تعداد گرهک تشکیل شده در ریشه گیاه عدس معنی‌دار بود(Tena و همکاران، ۲۰۱۶).

توان همزیستی سویه‌ها با استفاده از وزن خشک محاسبه گردید. ۷۰/۵ درصد از باکتری‌های مورد آزمایش کارایی همزیستی بالای ۱۰۰ درصد (کارایی بسیار خوب) داشتند. با توجه به اهمیت وزن خشک اندام هوایی در تعیین کارایی همزیستی، شاخص فوق به‌عنوان مؤلفه اصلی در مقایسه سویه‌ها درنظر گرفته شد. بر اساس مطالعات پیشین، هرچه میزان نیتروژن حاصل از تثبیت بالاتر باشد میزان عملکرد ماده خشک بیشتر است(Hafeez و همکاران، ۲۰۰۰). همچنین نتایج تحقیقی که در کشور پاکستان بر روی باکتری‌های جداسازی شده از ریشه گیاه عدس صورت گرفت، افزایش وزن‌تر و خشک و طول اندام هوایی را در نتیجه تلقیح گیاه عدس با جدایه‌های فوق نشان داد(Zafar و همکاران، ۲۰۱۲).

وزن خشک تمامی جدایه‌های برتر انتخاب شده از وزن خشک تیمار شاهد نیتروژنی ۷۰ppm بالاتر بود. این امر می‌تواند علاوه بر تثبیت نیتروژن، به دلیل خاصیت محرک رشدی باکتری‌های ریزوبیوم باشد. باکتری ریزوبیوم به‌طور مؤثری ریشه گیاه را آلوده کرده و رشد گیاه را افزایش می‌دهد. همچنین به دلیل خاصیت محرک رشدی، این باکتری‌ها با تولید هورمون‌های رشد گیاهان مختلف، افزایش فعالیت حل‌کنندگی فسفات، تثبیت N_2 و کنترل بیولوژیکی به رشد گیاه کمک می‌کنند(Deshwal و همکاران، ۲۰۱۱).

انتخاب سویه‌های برتر: جهت انتخاب سویه‌های برتر، جدایه‌های باکتری در درجه نخست از نظر وزن خشک اندام هوایی و کارایی همزیستی و در درجه بعد از نظر دیگر خصوصیات اندازه‌گیری شده همچون طول گیاه، تعداد غده، وضعیت کلی گیاه از نظر تولید گل و بذر و همچنین با در نظر گرفتن پراکندگی استانی باکتری‌ها، بررسی شده و در نهایت تعداد ۱۹ باکتری وارد فاز شناسایی مولکولی شدند.

نتایج شناسایی مولکولی: نتایج شناسایی مولکولی ۱۹ سویه منتخب در جدول ۴ آورده شده است.

جدول۴. مشخصات سویه‌های برتر منتخب

ردیف	نام سویه	استان	SE%	کارایی همزیستی	نتیجه شناسایی مولکولی
۱	BK11-1	کهکیلویه	۲۰۵/۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۲	GL10-1	لرستان	۲۴۷/۱۶	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۳	GK7-1	کهکیلویه	۲۳۱/۸	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۴	BA19-1	اردبیل	۲۲۴/۷۵	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*

۵	GA6-1	آذربایجان شرقی	۱۸۴/۹۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۶	BA28-2	اردبیل	۲۱۹/۹۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۷	BK6-3	کهکیلویه	۲۱۴/۹۱	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۸	BK2-3	کهکیلویه	۲۱۲/۹۱	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۹	BK12-2	کهکیلویه	۲۰۸/۳۳	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۰	GF8-1	فارس	۲۰۶/۴۶	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۱	GF5-1	فارس	۱۵۷/۴۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۲	GK11-1	کهکیلویه	۱۹۳/۴۹	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۳	KL5-3	لرستان	۱۵۲/۱۷	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۴	KK5-1	کهکیلویه	۱۵۲/۱	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۵	GA25-1	اردبیل	۱۸۹/۸	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۶	A1	آذربایجان شرقی	۱۵۰/۶۹	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۷	KB4-1	خراسان جنوبی	۱۶۶/۷۴	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۸	GQ9-3	قزوین	۱۲۵/۰۳	بسیار خوب	*Rhizobium leguminosarum*
۱۹	S2	سمنان	۸۵/۶۲۳	خوب	*Rhizobium leguminosarum*

سویه‌های باکتری برتر انتخاب شده همگی به‌عنوان*Rhizobium leguminosarum* شناسایی شدند. تمام باکتری‌های تأیید شده در بانک ریزجانداران مفید خاک‌زی مؤسسه تحقیقات خاک و آب نگهداری شدند. در تحقیقاتی که در بنگلادش بر روی گیاه عدس صورت گرفت مشخص گردیده است که باکتری‌های*R. leguminosarum*، *R. etli* و *R. phaseoli* باکتری‌های همزیست هستند (Rashid و همکاران، ۲۰۱۴). اغلب باکتری‌های جداسازی شده از لگوم‌هایviceae مربوط به*R. leguminosarum*، *R. faba* و *R.pisi* می‌باشند(Álvarez-Martínez و همکاران، ۲۰۰۹)

نتیجه‌گیری

- تیمار ریزوبیومی همزیست عدس موجب افزایش کارایی همزیستی نسبت به تیمار شاهد و تیمار نیتروژنی می‌شود.
- بر اساس نتایج آزمون شناسایی مولکولی بر اساس توالی 16SrRNA تمامی ۱۹ سویه به‌عنوان *Rhizobium leguminosarum*شناسایی شدند.

منابع

خسروی، ه. ۱۳۹۴. بررسی برخی خصوصیات فیزیولوژیک *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* بومی ایران. نشریه پژوهش‌های سلولی و مولکولی، ۲۸(۴)، ۵۲۳-۵۱۳.

Álvarez-Martínez, E. R., Valverde, Á., Ramírez-Bahena, M. H., García-Fraile, P., Tejedor, C., Mateos, P., and Fvelázquez, E. 2009. The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating Vicia from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of Rhizobium leguminosarum strains together with Vicia seeds. Archives of microbiology, 191(8), 659-668.

Anglade, J., Billen, G. and Garnier, J. 2015. Relationships for estimating N2 fixation in legumes: incidence for N balance of legume based cropping systems in Europe. Ecosphere, 6(3), 1-24.

Azarpour, E., Motamed, M. K., Moraditochaee, M. and Bozorgi, H. R. 2012. Effects of bio, mineral nitrogen fertilizer management, under humic acid foliar spraying on fruit yield and several traits of eggplant (*Solanummelongena* L.). African journal of agricultural research, 7(7), 1104-1109.

Deshwal, V. K., Vig, K., Amisha, D. M., Yadav, P., Bhattacharya, D. and Verma, M. 2011. Synergistic effects of the inoculation with plant growth-promoting Rhizobium and Pseudomonas on the performance of Mucuna.Ann. Forestry, 19(1), 13-20.

FAOSTAT Database, http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC,Accessed date: 10 January 2017.

Hafeez, F. Y., Shah, N. H. and Malik, K. A. 2000. Field evaluation of lentil cultivars inoculated with Rhizobium leguminosarum bv. viciae strains for nitrogen fixation using nitrogen-15 isotope dilution. Biology and fertility of soils,31(1), 65-69.

Rashid, M. H. O., Gonzalez, J., Young, J. P. W. and Wink, M. 2014. Rhizobium leguminosarum is the symbiont of lentils in the Middle East and Europe but not in Bangladesh. FEMS microbiology ecology, 87(1), 64-77.

Tena, W., Wolde-Meskel, E. and Walley, F. 2016. Symbiotic efficiency of native and exotic rhizobium strains nodulating lentil (Lens culinaris Medik.) in soils of southern Ethiopia. Agronomy, 6(11), 1-10

Tian, C. F., Young, J. P. W., Wang, E. T., Tamimi, S. M. and Chen, W. X. 2010. Population mixing of Rhizobium leguminosarum bv. viciae nodulating Vicia faba: the role of recombination and lateral gene transfer. FEMS microbiology ecology, 73(3), 563-576.

Tian, C. F., Wang, E. T., Wu, L. J., Han, T. X., Chen, W. F., Gu, C. T. and Chen, W. X. 2008. Rhizobium fabae sp. nov., a bacterium that nodulates Vicia faba. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 58(12), 2871-2875.

Toklu, F., Karaköy, T., Haklı, E., Bicer, T., Brandolini, A., Kilian, B. and Özkan, H. 2009. Genetic variation among lentil (Lens culinaris Medik) landraces from Southeast Turkey. Plant breeding, 128(2), 178-186.

Weir, B. S. 2011. The current taxonomy of Rhizobia. New Zealand Rhizobia website. http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html.

Zafar, M., Abbasi, M. K., Khan, M. A., Khaliq, A., Sultan, T. and Aslam, M. 2012. Effect of plant growth-promoting rhizobacteria on growth, nodulation and nutrient accumulation of lentil under controlled conditions. Pedosphere, 22(6), 848-859.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Symbiotic Efficiency and molecular characterization of indigenous *rhizobium leguminosarum* b.v *Viciae* in symbiosis with Lentil

Shamshiripour[1], E., Khavazi[2*], K., Rezaei[3], Sh

[1] M. Sc. Student, Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran
[2] Professors, Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran
[2] Assistant Prof., Soil Science Department, Faculty of Agriculture Islamic Azad University, Karaj branch, Karaj, Iran

Abstract

Using of nitrogen fertilizers causes serious environmental damage in spite of increasing the yield of agricultural products. Therefore, increasing of biofertilizers application is necessary than before. Considering that native bacterial strains are capable of sustainability and efficiency, The present study was conducted on 95 isolates of bacteria that coexisted with lentil plant isolated from 84 points in 7 provinces of the country that have the highest Lentil cultivating area. Then (S.E test) Symbiosis Efficiency and plant Infection tests were carried out. The Lentil seeds were cultivated in vitro contained nutrient elements expect of nitrogen. Bacteria isolates were inoculated with lentil seedlings in three replications and maintained for two months in controlled greenhouse condition. The dry weight of each plant measured after two months. Results showed that inoculation of lentil plants with 19 strains of bacteria enhanced significantly dry weight of lentil plants compare to control. Results obtained by 16S Molecular identification showed that all of these 19 isolated strains from lentil farms were related to *rhizobium leguminosarum* species.

Keywords: Lentil, Nitrogen fixation, *Rhizobium leguminosarum*, Symbiosis

* Corresponding author, Email: kkhavazi@yahoo.com