نشریه زیست‌شناسی خاک / جلد 6 / شماره 2 / 1397

10.22092/sbj.2018.106984.68

ارزیابی تحمل سویه‌های رایزوبیا به برخی تنش‌های محیطی و اثر تلقیح آن‌ها بر رشد و کارایی همزیستی گیاه لوبیا

زهره میرزائی، هادی اسدی رحمانی[1] و محمد جعفر ملکوتی

دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی و حاصلخیزی خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس،تهران، ایران؛ **mirzaie.zohreh29@gmail.com**

دانشیار، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ **asadi_1999@yahoo.com**

استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران؛ **mjmalakouti@hotmail.com**

دریافت: **96/2/3** و پذیرش: **97/7/18**

چکیده

تنش‌های محیطی اثر زیان‌بخشی بر همزیستی لگوم-ریزوبیوم دارند. انتخاب سویه‌هایی با کارایی بالا و متحمل به تنش‌ها رایج‌ترین روش مقابله است. بدین منظور، آزمایشی گلخانه‌ای بر روی 29 سویه باکتری *ریزوبیوم لگومینوساروم* همزیست لوبیا تهیه شده از بانک ژن بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب، در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 تکرار در مقایسه با یک سطح نیتروژن (N=200 کیلوگرم اوره در هکتار) و یک تیمار شاهد، در موسسه تحقیقات خاک و آب انجام گردید. گیاهان تا مرحله 50 % گلدهی نگهداری شدند و پس از رسیدن به این مرحله، وزن خشک و تر اندام هوایی و ریشه و کارایی همزیستی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها در وزن خشک اندام هوایی وجود داشت و بر اساس نتایج این قسمت، 4 سویه ریزوبیوم CCSM-B01171، CCSM-B01172، CCSM-B01186، CCSM-B01210 به عنوان سویه‌هایی با کارایی بالا در تثبیت نیتروژن و به همراه دو سویه *R.tropici* و*R.giardinii* (سویه‌های بین المللی تیپ) انتخاب شدند و در آزمایشات بعدی، تحمل آنها به چهار فاکتور محیطی شامل pH در سه سطح (5، 7 و 9)، شوری در چهار سطح (0/97، 4، 8 و 12 dS/m)، خشکی در پنج سطح (0، 0/05-، 0/25-، 0/9- و 3/4- مگاپاسکال) و دما در سه سطح (29، 37 و 42 درجه سانتی گراد) در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج حاصله، سویه‌های CCSM-B01171،CCSM-B01172و CCSM_B01232 بیشترین تحمل را به pHداشتند . سویه مقاوم به تمام سطوح خشکی سویه CCSM-B01210 بود و سویه CCSM-B01186 بیشترین تحمل را به دوتنش محیطی دما و شوری داشت.

واژه‌های کلیدی: تثبیت بیولوژیک نیتروژن، تنش‌های محیطی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، میدان استاندارد، بلوار رزکان نو، موسسه تحقیقات خاک وآب

مقدمه

در ایران همانند اکثر کشورهای دنیا مصرف نامتعادل نهاده‌های شیمیایی ازجمله کودها به منظور دست یابی به عملکرد بالا وجبران کمبود مواد غذایی در مواردی، افزایش هزینه‌های تولید و تخریب منابع آب و خاک را در پی داشته است. جدی بودن تخریب محیط زیست بر اثر به کارگیری روش‌های نامناسب کوددهی موجب جلب توجه متخصصان به نظام‌های زراعی سالم و پایدار از نظر اکولوژیک شده است (میرشکاری و جوانشیر،1388).

کودهای زیستی به عنوان جایگزین یا مکمل کودهای شیمیایی، نقش مثبت و غیرقابل انکاری در مدیریت پایدار خاک و در نهایت پایداری کل سیستم زراعی دارند (جهان و همکاران، 1388). یکی از روش-هایی که می‌تواند استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار مانند اوره را کاهش دهد، کاربرد انواع کودهای زیستی تهیه شده با ریزموجودات تثبیت کننده نیتروژن است (آذرپور و همکاران، 2012).

بر اساس مطالعات اگوتکیو و همکاران (2008) همزیستی ریزوبیومی با گونه‌های لگوم اهمیت زیادی دارد و این همزیستی 50 درصد از 175 میلیون تن نیتروژن تثبیت شده سالیانه جهانی را تولید می‌کند. گره‌های لوبیا می‌تواند 40 تا50 درصد نیتروژن مورد نیاز گیاه را تثبیت کنند اما کارایی این همزیستی در مزرعه گاهی اوقات پایین‌تر است. کمتر شدن کارایی به دلیل دامنه نسبتاً وسیع همزیستی در گیاهان لوبیا می‌باشد به طوری‌که مشخص گردیده این گیاه در طبیعت می‌توانند حداقل با پنج گونه ریزوبیوم با توان رقابتی و کارایی متفاوت گره تشکیل بدهد (سیلوا و همکاران، 2003).

برخی شرایط محیطی نیز شامل تنش خشکی، شوری، pH خاک، دما، فلزات سنگین و غیره فاکتورهای محدودکننده رشد و تثبیت نیتروژن در گیاه لگومینه‌اند که گره‌های لگوم و شرکای همزیست با آن مواجه می‌شوند (کاکاک و کیوانک، 2008).اسیدیته تأثیرمستقیمی بر روی بقاء ریزوبیوم دارد. سویه‌های ریزوبیوم در pH=6-8 به خوبی رشد می‌کنند و رشد بهینه آن در pH 7 است (سلمن، 1952؛ منسا و همکاران، 2006). کاهش ارتفاع و عملکرد گیاه در pH 3 و 4 و بالاتر از 9، در نتیجه اثر pH بر روی سویه‌های ریزوبیوم و گیاه میزبان اتفاق می‌افتد (لیندستروم و مایلنیم، 1987).

تأمین آب نقش مهمی در تشکیل گره و تثبیت نیتروژن دارد. مطالعات نشان داده است که تنش خشکی باعث کاهش میزان رشد ریزوبیوم‌ها در ریزوسفر می‌شود و به دنبال آن از تشکیل گره روی ریشه جلوگیری می‌کند (کک و همکاران، 1984). البته توانایی سویه‌های ریزوبیومی برای ایجاد گره‌های تثبیت کننده نیتروژن مولکولی در شرایط شور و خشک بسیار متفاوت گزارش شده است (اسپرنت و اسپرنت، 2000) و سویه‌ها یی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک و خشکی را به‌خوبی تحمل کرده و زنده می‌مانند (وماچاندرا وگراگ، 2008). دما نیز یکی از عوامل مهم و مؤثر بر رشد ریزوبیوم و بقای آن در خاک و روند همزیستی است. درجه حرارت بالا بر تشکیل ریشه مویین، جذب ریزوبیوم و تشکیل گره در گیاه میزبان اثر منفی دارد. فعالیت نسبی ریزوبیوم توسط درجه حرارت تغییر می‌کند، به طوری که ممکن است باکتری در یک دما بسیار مؤثر بوده ولی در سایر درجه حرارت‌ها تأثیر کمتری داشته باشد (یاداو و نهرا، 2013).

با توجه به اثر عوامل محیطی بر رشد گیاه و کارایی همزیستی، هدف مطالعه حاضر بررسی کارایی تثبیت نیتروژن در باکتری‌های همزیست لوبیای بومی خاک‌های ایران و تحمل آنها به برخی تنش‌های محیطی شامل pH، شوری، خشکی و دما است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق بر روی 29 سویه باکتری ریزوبیوم لگومینوساروم تهیه شده از بانک ژن میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب، در قالب طرح کاملاً تصادفی با 3 تکرار و به همراه یک سطح نیتروژن (N=200 کیلوگرم اوره در هکتار) و یک تیمار شاهد (بدون تلقیح و بدون کود نیتروژنی)، در شرایط گلخانه در موسسه تحقیقات خاک و آب انجام شد. بذور لوبیا قرمز (رقم گلی) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه، با استفاده از الکل 96 درصد (30 ثانیه) و هیپوکلریت 30 درصد (یک دقیقه) استریل و جوانه‌دار شد. باکتری‌های مورد استفاده در محیط مایع YMB[1] با جمعیت حدود 10^8 cfu/ml تکثیر شد و در زمان کاشت 6 عدد بذرجوانه زده در هر گلدان دو کیلوگرمی کاشته و همزمان یک میلی‌لیتر از محیط YMB حاوی باکتری بر روی بذر تلقیح گردید. گلدان‌ها قبل از پر شدن از خاک، با الکل و هیپوکلرید سدیم 30 درصد استریل شدند. خصوصیات شیمیایی خاک گلدان از جمله pH، قابلیت هدایت الکتریکی، درصد کربن آلی، درصد نیتروژن مورد آنالیز واقع گردید (جدول 1).

گیاهان در گلخانه تا مرحله 50 درصد گلدهی نگه-داری شدند. بعد از رسیدن به این مرحله، وزن تر اندام

[1] Yeast Manitol Broth

هوایی و ریشه توزین شد. وزن خشک آنها نیز بعد از 72 ساعت قرار دادن در آون در دمای 70 درجه‌سانتی‌گراد اندازه گیری شد. بر اساس مقایسه میانگین وزن خشک اندام هوایی، کارایی همزیستی محاسبه و شش سویه با بیشترین کارایی همزیستی انتخاب شدند و برای تحمل به چهار فاکتور محیطی از جمله pH در سه سطح (5، 7 و 9)، شوری در چهار سطح (0، 4، 8 و 12 dS/m)، خشکی در پنج سطح (0، 0/05-، 0/25-، 0/9- و 3/4- مگاپاسکال) و دما در سه سطح (29، 37 و 42 درجه سانتی گراد) مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی تحمل سویه‌ها به pH

در بررسی تحمل سویه‌ها به pH، ابتدا سویه‌ها به طور جداگانه در 50 سی سی محیط YMB(با pH=7) تکثیر و سپس 5 میکرولیتر از آن‌ها با لگاریتم جمعیت در 9/76 به 50 سی سی محیط YMBبا pH های 5 و9 در سه تکرار، تلقیح شدند، سویه‌ها به مدت 72 ساعت برای رشد بر روی شیکر انکوباتور با دمای 29 درجه سانتی گراد قرار گرفتند. در نهایت جمعیت هر کدام از سویه‌ها به روش تهیه سری‌های رقت و کشت بر روی محیط YMA تعیین گردید (خنافری و همکاران، 1388).

بررسی تحمل سویه‌ها به شوری

برای بررسی تحمل سویه‌ها به شوری، هر سویه در 50 سی سی محیط YMBبا شوری 0/97 dS/m تکثیر و سپس 5 میکرولیتر از آن در 50 سی سی محیط YMB با شوری 4، 8 و 12 dS/m که با NaCl تنظیم شده بود، در سه تکرار تلقیح شد که لگاریتم جمعیت اولیه حدود 8/97 بود. سویه‌ها به مدت 72 ساعت برای رشد بر روی شیکر انکوباتور با دمای 29 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس جمعیت نهایی باکتری‌ها در هر سویه به روش تهیه سری‌های رقت، و کشت بر روی محیط YMAتعیین گردید (علیخانی، 1389).

بررسی تحمل سویه‌ها به خشکی

برای تعیین میزان تحمل سویه‌ها به خشکی از روش میچل و کافمن (1973) استفاده شد (علیخانی،1389). در این روش از پلی اتیلن گلیکول 6000 برای تأمین پتانسیل آبی مورد نیاز در محیط کشت YMB استفاده شد که رابطه به این قرار است.

$$\Psi = -(1.18*10^{-2})\,C - (1.18*10^{-4})\,C^2 + (2.67*10^{-4})\,Ct + (839*10^{-7})\,C^2T$$

ψ = پتانسیل اسمزی بر حسب بار

C = غلظت پلی اتیلن گلیکول بر حسب گرم در لیتر

t = درجه حرارت بر حسب درجه سانتی‌گراد

T= دما بر حسب کلوین

سویه‌ها پس از رشد در 50 سی سی محیط YMB با لگاریتم جمعیت در حدود 9/38 و خشکی صفر، به مقدار 5 میکرولیتر در 50 سی سی محیط کشت (حاوی YMBو پلی اتیلن گلیکول) با خشکی‌های 0/0، 0/05-، 0/25-، 0/9- و 3/4- مگاپاسکال تلقیح شدند و پس از 72 ساعت رشد بر روی شیکر انکوباتور در دمای 29 درجه سانتی گراد تعیین جمعیت شدند. جمعیت هر سویه به روش تهیه سری‌های رقت و کشت بر روی محیط YMA تعیین گردید.جهت ایجاد پتانسیل‌های مختلف سطوح خشک یاز پلیاتیلنگلیکول6000، از روش (میچل و کافمن، 1973)استفاده گردید (علیخانی، 1389).پلیاتیلن گلیکول به دلیلوزن مولکولی زیاد(6000) نمی‌تواند واردآپوپلاست گردد، بنابراین آبنه تنها از سلول فاصله می‌گیرد، بلکه از دیوار هسلولی نیز دو رنگه‌داشته می‌شود و این امر باعث می‌شوداین نمک شرایط بسیار مشابهی با خاک نسبت به سایر مواد اسمزیکه به تدریج وارد دیوار هسلولیمی‌شوند، ایجادکند (الشیخ، 1998).

بررسی تحمل سویه‌ها به دما

برای بررسی تحمل سویه‌ها به دما، 5 میکرولیتر از هر سویه که در دمای 29 درجه‌سانتی‌گراد در 50 سی سی محیط YMB با لگاریتم جمعیت در حدود 9/52 رشد کرده بود، در 50 سی سی محیط YMB در سه تکرار تلقیح شد و در شیکر انکوباتورهایی با دمای 37 و 42 درجه‌سانتی‌گراد، به مدت 72 ساعت برای رشد قرار گرفت. سپس جمعیت نهایی باکتری‌ها در هر سویه به روش تهیه سری‌های رقت و کشت بر روی محیط YMA تعیین گردید (اسدی رحمانی و صالح راستین، 1381).

تمامی داده‌های حاصل از گلخانه و داده‌های مربوط به شمارش جمعیت سویه‌ها (در تحمل به چهار تنش محیطی) با استفاده از برنامه SPSS مورد تجزیه آماری قرار گرفت و میانگین‌ها با روش آزمون چند دامنه ای Duncan در سطح 5 درصد مقایسه شدند. برای رسم نمودارها و جداول از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج

با توجه به جدول یک خاک مورد استفاده برای کشت گلدانی دارای بافت لومی رسی است.

جدول 1- خصوصیات شیمیایی خاک مورد استفاده

قابلیت هدایت- الکتریکی dS/m	pH	%TNV (مواد خنثی شونده)	% O.C (کربن آلی)	% N	فسفر قابل دسترس mg/Kg	پتاسیم قابل دسترس mg/Kg	بافت خاک			بافت خاک
							Clay %	Silt %	Sand %	
1/55	8	9/4	/62	0/06	4/5	234	28	40	32	لومی رسی

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، چهار صفت وزن تر و خشک اندام هوایی و همچنین وزن تر و خشک ریشه گیاه لوبیا در 31 تیمار مورد بررسی، با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول 2).

جدول 2- جدول تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه تلقیح لوبیا با سویه‌های مختلف باکتری ریزوبیوم

منابع تغییرات	میانگین مربعات			
	وزن‌تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن‌تر ریشه	وزن خشک ریشه
تیمار	8/40*	0/47*	15/41*	0/16*
خطا	2/05	0/12	4/39	0/08
درجه آزادی	30	30	30	30
ضریب تغییرات	13/42	11/26	15/46	15/39

ns,* به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد

در این پژوهش گیاهان مایه‌زنی شده با تیمار باکتریایی CCSM-B01172 با مقدار16/48 گرم بیشترین وزن تر اندام هوایی را داشت.

تیمارهای باکتریایی CCSM-B01171، CCSM-B01186، CCSM-B01172 و CCSM-B01210 با داشتن بیشترین وزن خشک اندام هوایی به ترتیب 4/04، 4/04، 4/01 و 3/96 گرم و بیشترین کارایی همزیستی به ترتیب 275، 275، 267/5 و 255، به همراه دو گونه *R.tropici* و *R.giardinii* (بین المللی تیپ) برای بررسی تحمل سویه-ها به تنش‌ها انتخاب شدند (جدول 3).

با توجه به مقایسه میانگین مربعات (جدول4)، اثرات جداگانه چهار تنش محیطی شوری، pH، خشکی و دما بر جمعیت باکتری در سطح پنج درصد معنی‌دار بوده است.

در نتایج بدست آمده در مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت سویه‌های ریزوبیوم (شکل 1)، مشاهده شد که به جز سویه CCSM_B01210 که در pH=5 رشد نکرد، (به دلیل عدم مقاومت به پی‌اچ پایین)، بقیه سویه‌ها در سه سطح pH رشد کرده بودند. بیشترین جمعیت در pH=7 و کمترین جمعیت در pH=5 مشاهده شد. بیشترین میانگین جمعیت مربوط به سویه‌های CCSM_B01171، CCSM_B01172 و *R. giardinii* و کمترین میانگین جمعیت مربوط به سویه CCSM_B01210 بود.

نتایج آزمون تعیین میزان تحمل به شوری سویه‌های ریزوبیوم در شکل (2) نشان داد که بیشترین و کمترین رشد جمعیت به ترتیب در ECهای 0/97 و 12 است و با افزایش سطح شوری، جمعیت سویه‌ها کاهش یافت. مقاوم‌ترین سویه به شوری، سویه CCSM-B01186 بود.

جدول 3- فاکتورهای اندازه‌گیری شده در گیاهان در مرحله گلخانه

تیمار	وزن‌تر اندام هواییدر گلدان(g)	وزن خشک اندام هوایی در گلدان(g)	وزن تر ریشه در گلدان(g)	وزن خشک ریشه در گلدان (g)	کارایی همزیستی %
CCSM-B01170	10/34^{ghij}	2/79de	10/90^{jk}	2/26^{a}	-[1]
CCSM-B01171	14/47^{abc}	4/04^{a}	19/55^{a}	1/81^{abc}	275
CCSM-B01172	16/48^{a}	4/01^{a}	17/75^{abcde}	1/63^{bcd}	267/5
CCSM-B01173	15/09^{ab}	3/84^{a}	18/21^{abc}	1/91^{ab}	225
CCSM-B01178	11/15^{efghi}	3/76^{abc}	15/30^{bcdefghi}	1/40^{bcd}	205
CCSM-B01180	11/96^{cdefghij}	3/25^{abcde}	11/64^{ijk}	1/33^{cd}	77/5
CCSM-B01186	13/95^{abcde}	4/04^{a}	19/10^{ab}	1/63^{bcd}	275
CCSM-B01187	10/94^{fghij}	3/26^{abcde}	16/78^{abcdefg}	1/36^{bcd}	80
CCSM-B01188	10/79^{fghij}	3/49^{abcd}	13/87^{efghijkd}	1/19^{d}	137/5
CCSM-B01190	13/08^{bcdefg}	3/90^{a}	14/14^{defghijk}	1/41^{bcd}	240
CCSM-B01191	8/34^{j}	2/47^{e}	13/76^{efghijk}	1/60^{bcd}	-
CCSM-B01192	12/13^{cdefghi}	3/46^{abcd}	13/31^{fghijk}	1/27^{cd}	130
CCSM-B01196	12/86^{bcdefgh}	3/62^{abcd}	13/03^{fghijk}	1/59^{bcd}	170
CCSM-B01198	13/88^{abcde}	3/82^{ab}	14/84^{cdefghij}	1/33^{cd}	220
CCSM-B01202	10/02^{ehij}	2/93^{bcde}	12/76^{ghijk}	1/16^{d}	-
CCSM-B01208	9/83^{ij}	2/91^{cde}	12/32^{hijk}	1/33^{cd}	-
CCSM-B01210	14/11^{abcd}	3/96^{a}	18/02^{abcd}	1/55^{bcd}	255
CCSM-B01211	13/18^{bcdefg}	3/47^{abcd}	17/05^{abcdef}	1/49^{bcd}	132/5
CCSM-B01214	13/31^{bcdef}	3/52^{abcd}	16/73^{abcdefgh}	1/35^{bcd}	145
CCSM-B01216	12/82^{bcdefgh}	3/82^{ab}	14/17^{cdefghijk}	1/41^{bcd}	220
CCSM-B01217	11/22^{efghi}	3/35^{abcd}	14/67^{cdefghijk}	1/19^{d}	102/5
CCSM-B01218	13/03^{bcdefg}	3/39^{abcd}	15/87^{abcdefgh}	1/48^{bcd}	112/5
CCSM-B01220	12/50^{bcdefghi}	3/74^{abc}	14/40^{cdefghijk}	1/34^{cd}	200
CCSM-B01222	11/83^{cdefgi}	3/34^{abcd}	10/56^{k}	1/51^{bcd}	100
CCSM-B01224	12/14^{cdefghi}	3/58^{abcd}	15/01^{bcdefghij}	1/40^{bcd}	160
CCSM-B01227	11/47^{defghi}	3/72^{abc}	15/81^{abcdefghi}	1/53^{bcd}	195
CCSM-B01230	11/55^{defghi}	3/48^{abcd}	13/11^{abcd}	1/59^{bcd}	135
R. *tropici*	11/41^{defghi}	3/55^{abcd}	15/21^{bcdefghi}	1/24^{cd}	152/5
R. *giardinii*	13/22^{bcdef}	3/92^{a}	15/04^{bcdefghi}	1/49^{bcd}	245
N	13/01^{bcdefg}	3/34^{abcd}	12/29^{hijk}	1/33^{bcd}	-
Control	11/46^{defghi}	2/94^{bcde}	15/16^{bcdefghi}	1/36^{bcd}	-

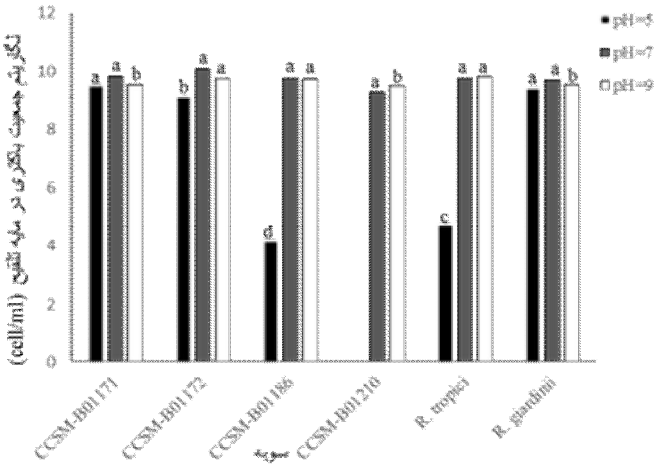
در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح 5 درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

جدول 4- میانگین مربعات

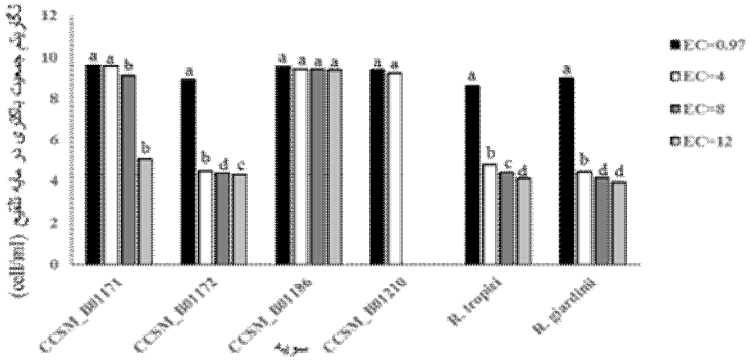
منابع تغییرات	شوری	pH	خشکی	دما
باکتری	44/506*	13/342*	1/489*	22/779*
خطا	0/275	0/264	0/255	0/781
درجه آزادی	5	5	5	5
ضریب تغییرات	36/42	17/92	5/29	31/52

ns,* به ترتیب غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح پنج درصد

[1] بدون کارایی همزیستی

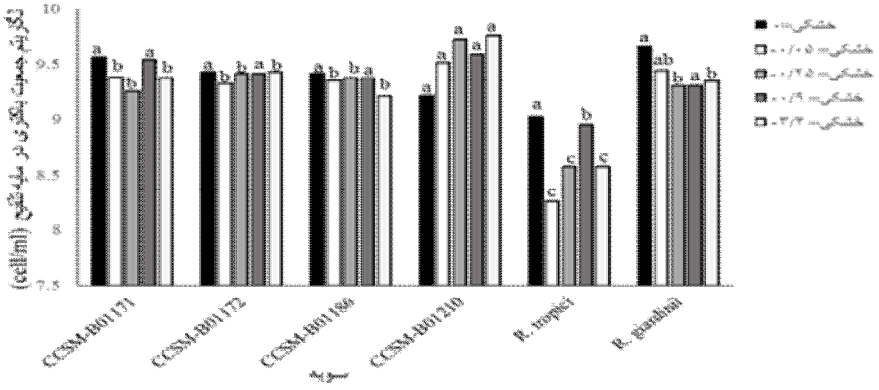


شکل 1- مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت سویه‌های باکتری ریزوبیوم در pH



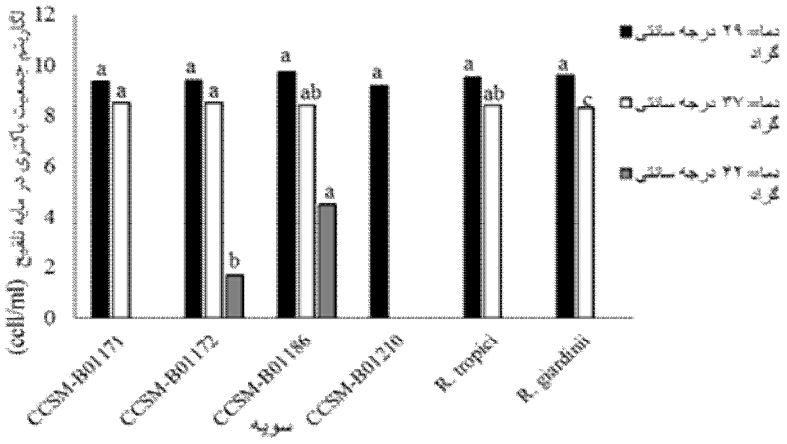
شکل 2- مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت سویه‌های باکتری ریزوبیوم در EC

در مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت سویه‌های ریزوبیوم (شکل3)، جمعیت سویه‌ها در خشکی صفر مگاپاسکال اختلاف معنی‌داری نداشت. سویه CCSM_B01210 بیشترین جمعیت را در تمام سطوح خشکی داشت و مقاوم‌ترین سویه به خشکی بود.



شکل 3- مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت سویه‌های باکتری ریزوبیوم در خشکی (مگاپاسکال)

نتایج آزمون تعیین میزان تحمل به دمای سویه‌های ریزوبیوم در (شکل 4)، بیشترین میانگین جمعیت مربوط به سویه CCSM_B01186 بود. جمعیت سویه‌ها در دمای 42 درجه سانتی گراد به شدت کاهش می‌یابد و حتی برخی سویه‌ها هیچ رشدی در این دما نداشتند. بیشترین میانگین جمعیت در دمای 29 درجه سانتی گراد و کمترین میانگین جمعیت در دمای 42 درجه سانتی گراد مشاهده شد. به طور کلی با افزایش دما، جمعیت سویه‌ها کاهش یافت.



شکل 4- مقایسه میانگین لگاریتم جمعیت سویه‌های باکتری ریزوبیوم در دما (درجه سانتی گراد)

بحث

جهان و همکاران (1388) بر این عقیده‌اند که کودهای زیستی به عنوان جایگزین طبیعی کودهای شیمیایی، نقش مثبت و غیر قابل انکاری در مدیریت پایدار خاک و در نهایت پایداری کل سیستم دارند.

البته برخی شرایط محیطی شامل تنش آب، شوری، pH خاک، دما، فلزات سنگین و غیره، فاکتورهای محدودکننده رشد و تثبیت نیتروژن در گیاهان هستند که گره‌های لگوم و باکتری‌های ریزوبیوم نیز با آن مواجه اند (کاکاک و کیوانک، 2008)

با توجه به این موضوع که می توان برای ارزیابی کارایی سویه‌ها از صفاتی مانند وزن خشک اندام هوایی، درصد نیتروژن و کل جذب نیتروژن استفاده نمود (اسدی رحمانی و همکاران، 1384)، 4 سویه CCSM-B01171، CCSM-B01172، CCSM-B01186، CCSM-B01210که بیشترین وزن خشک را داشتند به همراه دو گونه *R.tropici* و *R.giardinii* (گونه‌های بین المللی تیپ) انتخاب شدند و تحمل آنها به چهار فاکتور محیطی از جمله pH در سه سطح (5، 7 و 9)، شوری در چهار سطح (0/97، 4، 8 و 12 dS/m)، خشکی در پنج سطح (0، 0/05-، 0/25-، 0/9- و 3/4- مگاپاسکال) و دما در سه سطح (29، 37 و 42 درجه سانتی گراد) مورد بررسی قرار گرفت.

تأثیر pHهای مختلف بر روی رشد سویه‌های ریزوبیوم در کشت آزمایشگاهی نشان داد که pH اسیدی باعث کاهش رشد می‌شود و حتی سویه CCSM_B01210 در pH پایین هیچ رشدی نداشت و بیشترین رشد را در pH=7 مشاهده شد که با نتایج سلمن (1952) و منسا و همکاران (2006) مطابقت دارد. رشد سویه‌ها در pH 5 کاهش یافت. توان بقای *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* در خاک‌های اسیدی کم است، زیرا گره‌زایی و رشد گیاهان تلقیح شده با این ریزوبیوم کم بود (اسلاتری و همکاران، 2001).

در بررسی نتایج سطوح مختلف شوری و خشکی بر روی رشد سویه‌های ریزوبیوم بیشترین میانگین جمعیت به ترتیب مربوط به CCSM_B01186 و CCSM_B01210 بود. به طور کلی در بررسی تأثیر مقدار شوری و خشکی بر رشد سویه‌های ریزوبیوم مشاهده شد که شوری و خشکی اثر منفی بر رشد سویه‌های ریزوبیوم دارند و مقاوم تسویه‌های مختلف ریزوبیوم در برابر تنش شوری وخشکی متفاوت است که با مطالعات قبلی در یک راستا است (جبرا و همکاران، 2000). گرچه شوری و

خشکی تکثیرباکتری‌های ریزوبیومی را محدود می‌سازد ولی سویه‌هایی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک و خشکی را به خوبی تحمل کرده وزنده می‌مانند (وماچندا و گارگ، 2008).

دما به عنوان یک عامل زیست محیطی نقش مهمی در بقا و استقرار ریزوبیوم در محیط کشت و خاک ایفا می‌کند (یاداو و نهرا، 2013) و با افزایش دما، فعالیت تثبیت نیتروژن سویه‌های مقاوم خاموش می‌شود اما ممکن است با پایین آمدن دما مجدد فعالیتشان ادامه یابد (میچیل و همکاران، 1994). در بررسی سطوح مختلف دما بر رشد سویه‌های ریزوبیوم مشاهده شد که CCSM_B01186 بیشترین تحمل را نسبت به دما داشت و بیشترین رشد در 29 درجه سانتی‌گراد بود و با افزایش دما به 37 و 42 درجه سانتی‌گراد، رشد سویه‌ها کاهش یافت (رودریگوئز و همکاران، 2006). انتخاب و جداسازی گونه‌های متحمل به دما هنوز هم به عنوان یکی از بهترین ابزار غلبه بر استرس در نظر گرفته می‌شود (یاداو و نهرا، 2013).

نتیجه‌گیری

در این مطالعه سویه CCSM_B01186 به علت مقاومت به دو تنش (تنش‌های شوری و خشکی)، بهترین سویه شناخته شد. نتایج موید این است که استفاده از پتانسیل باکتری‌های ریزوبیومی بومی محرک رشد به صورت کودهای زیستی در بهبود تغذیه گیاهان لگوم تحت هر کدام از تنش‌های شوری، خشکی، دما و اسیدیته می‌تواند به عنوان یک روش اقتصادی مدنظر باشد.

تقدیر و تشکر

از زحمات تمامی کارشناسان و کارکنان بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب و همچنین خانم مهندس رجبی، خانم مهندس قنبران و آقای موسوی صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایم.

فهرست منابع:

1. اسدی رحمانی، ه.، م. افشاری، ک. خاوازی، ف. نورقلیپور وا. اوتادی. 1384. بررسی تأثیر سویه‌های ریزوبیومی، بومی خاک‌های ایران بر عملکرد وخصوصیات کیفی لوبیا.مجله علوم خاک وآب.19: 215-223.
2. اسدی رحمانی، ه. و ن. صالح راستین. 1381. بررسی تحمل به حرارت و تثبیت نیتروژن در سویه‌های ریزوبیوم همزیست سویا. مجله علوم خاک وآب. 16: 179-188.
3. جهان، م.، م. نصیری محلاتی، م. د. سالاری و م. قربانی. 1388. اثرات زمان استفاده از کود دامی و کاربرد انواع کودهای زیستی بر ویژگی‌های کمی وکیفی کدو پوست کاغذی(.Cucurbita pepo L). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران، 8: 726-737.
4. خنافری، آ.، م. منسوبی و ص. اربابیان. 1388. بررسی توان تولید آن توسیانین در ریزوبیوم در حالت زندگی همزیست و آزاد. مجله دانش میکروبشناسی. 2: 53-62.
5. علیخانی، ح. 1389. بررسی توان تحمل به شوری وخشکی جدایه‌های ریزوبیومی همزیست عدس در شرایط در و نشیشه‌ای. مجله تحقیقات آب وخاک ایران. 42: 161-155.
6. میرشکاری، بوع. جوانشیر،ع. 1388.تأثیر کود زیستی نیتراژین و سطوح مختلف کود اوره بر صفات فیزیولوژیک و عملکرد بیولوژیک ذر تهیب رید704 در مناطق نیمه خشک سرد، یافته های نوین کشاورزی، 403-411.
7. Azarpour, E., M.K. Motamed, M. Moraditochaee and H.R. Bozorg. 2012. Effects of bio, mineral nitrogen fertilizer management, under humic acid foliar spraying on fruit yield and several traits of eggplant (Solanum melongena L.). African Journal of Agricultural Research, 7: 1104-1109.
8. Jebara, M., M. Elarbi, A. Ridha Mhamdi, R. Ghrir, R. and M. Mars. 2000. Effect of salt on *Sinorhizobium sp*. Isolates from Tunisia either in vitro or in association with *Medicado sp*. Cahiers Agricultures, 9 (2): 99-102.
9. Elshiekh, A. 1998. Effect of salt on rhizobia and bradyrhizobia. Annals of Applied Biology, 132 (3): 507-524.

10. Keck, T.J., P. Wagent, W.F. Campbell and R.E. Knighton. 1984. Effect of water and salt stress on growth and acetylene reduction in alfalfa. Soil Science Society of America Journal, 48:1310-1315.
11. Kucuk, C., and M. Kivanc. 2008. Preliminary Characterization of *Rhizobium* Strains Isolated from Chickpea Nodules. African Journal of Biotechnology, 7 (6): 772-775.
12. Lindstrom, K., and H. Myllyniemi. 1987. Sensitivity of red clover rhizobia to soil acidity factor in pure culture and in symbiosis. Plant and Soil, 98: 353-362.
13. Mensah, J.K., F. Esumeh, M. Lyamu, and C. Omoifo. 2006. Effect of Different Salt Goncentrations and pH on Growth of Rhizobium sp. And a Cowpea-Rhizobium Association. American Eurasian Journal Agriculture and Environment, 3: 198-202.
14. Michel, B.E., and M.R. Kaufmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology, 51 (5): 914-916.
15. Michiels, J.C. Verreth, and J. Vanderleyden. 1994. Effects of Temperature Stress on Bean-Nodulating Rhizobium Strains. Applied and Environmental Microbiology, 60 (4), 2006-1212.
16. Ogutcu, H., O. Algur, E. Elkoca, and F. Kantar. 2008. The determination of symbiotic effectiveness of Rhizobium strains isolated from wild chickpeas collected from high altitudes in Erzurum. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 32 (4): 241-248.
17. Rodrigues, C., M. Laranjo, and S. Oliveira. 2006. Effect of heat and pH stress in the growth of chickpea mesorhizobia.Current Microbiology, 53 (1): 1–7.
18. Selmen, A.W. 1952. Soil Microbiology. Mac Millan, England.
19. Silva, C., P. Vinuesa, L.E., Eguiarte, R. Esperanza-Martinez, and V. Souza. 2003.*Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in Mexico, population genetics and biographic implications. Applied Enviromental Microbiology, 69: 884-893.
20. Sprent, J., and P. Sprent. 2000. Nitrogen Fixing Organisms. Chapman and Hall.
21. Vmanchanda, I., and N. Garg. 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Journal Plant Physiology, 30 (5):595-618.
22. Yadav, A.S., and K. Nehra. 2013. Selection / isolation of high temperature tolerant strains of rhizobium for management of high temperature stress on *Rhizobium*- Legume symbiosis. International Journal of Microbial Resource Technology, 2: 47-57.

Evaluating of Stress Tolerant Bean-Nodulating Rhizobium Strains on Growth and Symbiotic Efficiency of Bean

Z. Mirzaie, H. Asadi Rahmani[1], and M. J. Malakouti

Graduate student in chemistry and soil fertility, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran; E-mail: mirzaie.zohreh29@gmail.com

Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: asadi_1999@yahoo.com

Professor, College of Agriculture Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran; E-mail: mjmalakouti@hotmail.com

Received: April, 2017 & Accepted: October, 2018

Abstract

There are many scientific reports about the detrimental effect of environmental stresses on Rhizobium-legume symbiosis. Selection of some strains with high efficiency and tolerance to environmental stresses is the most commonly acceptable solution for that problem. In order to investigate the effects of inoculation of *stress* tolerant bean-nodulating Rhizobium strains *on* growth characteristics of bean and symbiotic efficiency, a greenhouse experiment was conducted with 29 strains of Rhizobium, one level of nitrogen (N=200 kg/ha) and a control treatment in a completely randomized design with three replications. Selected strains provided by the microbial collection of Soil and Water Research Institute. Plants were maintained up to 50% flowering and then harvested. Dry and wet weight of shoot, root and symbiosis efficiency were measured. The results showed that there was a significant difference in shoot dry weight and based on the results of this part, 4 strains (CCSM-B01171, CCSM-B01172, CCSM-B01186 and CCSM-B01210) were selected as strains with high efficiency in nitrogen fixation. Two more strains were also selected CSM-B01232 and CCSM-B01233 strains (type International strains) for next experiments. Tolerance of Selected Stains (totally 6 strains) to four environmental stress including pH in three levels (5, 7, 9), salinity in four levels (0.97, 4, 8 and 12 dS/m), drought in five levels (0, -0.05, -0.25, -0.9 and -3.4 MPa) and temperature in three levels (29, 37 and 42 °C) were assessed in the culture medium. Based on the results, CCSM-B01172, CCSM-B01171 and CCSM_B01232 strains had the highest tolerance to pH. CCSM-B01210 strain was resistant to drought. CCSM-B01186 strain had the highest tolerance to temperature and salinity environmental stress and recommended for further research.

Keywords: Environmental stresses, Nitrogen biological fixation

[1] Corresponding author: Soil Biology Department, Soil and Water Research Institute, Karaj, Iran. P.O.Box-31785-311.