نشریه آب و خاک
جلد ۲۴، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۸۹، ص. ۴۱۶-۴۰۷

Journal of Water and Soil
Vol. 24, No. 3, July-Aug 2010, p. 407-416

تأثیر تنش خشکی بر سیستم تثبیت نیتروژن باکتری *Sinorhizobium* و انباشت متابولیت‌های سازگار در گیاه یونجه (*Medicago sativa* sp.) رقم بمی

محبوبه ابوالحسنی زراعتکار[۱] - امیر لکزیان[۲*] - ابوالفضل غلامحسین پور جعفری[۳] - عبدالرضا اخگر[۴]

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۴
تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۲۳

چکیده

تنظیم اسمزی با انباشت متابولیت‌های سازگار یکی از مکانیسم‌های کارآمد سازگاری گیاه در برابر تنش خشکی است که موجب حفظ آماس یاخته در شرایط کم آبی می‌شود. گیاهان لگوم مایه‌زنی شده با جدایه‌های بومی باکتری بردبار در برابر خشکی از کارآمدی چشم‌گیری برخوردارند، زیرا نیتروژن با تأثیر بر انباشت متابولیت‌ها در شرایط خشکی احتمالاً به تنظیم اسمزی کمک می‌کند. برای شناسایی جدایه‌های *Sinorhizobium* بردبار در برابر شرایط خشک، از مناطق گوناگون در استان کرمان ۸۰ جدایه جداسازی و خالص‌سازی شدند. سپس به منظور بررسی درجه بردباری جدایه‌ها در برابر خشکی، رشد آنها در پتانسیل‌های آبی ۰، ۱-، ۲-، و ۳/۵- مگاپاسکال (پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰) بررسی شد و جدایه‌ها در دو گروه بردبار و حساس به خشکی گروه‌بندی شدند. از ۴ جدایه *Sinorhizobium* (دو جدایه بردبار و دو جدایه حساس) جداسازی شده از خاک‌های استان کرمان برای مایه‌زنی گیاه یونجه (رقم بمی) در شرایط تنش خشکی در گلخانه استفاده شد. آزمایش به گونه فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در چهار تکرار در شرایط گلخانه انجام شد. نتایج نشان داد که در شرایط کمبود آب، مایه‌زنی گیاه یونجه با جدایه‌های *Sinorhizobium* بردبار در برابر خشکی نسبت به جدایه‌های حساس، بطور معنی‌داری فعالیت آنزیم نیتروژناز، وزن خشک اندام هوایی، غلظت پرولین در برگ، میزان قندهای کاهنده در ریشه، میزان کل پروتئین‌های محلول در اندام هوایی و نسبت پتاسیم به سدیم در بخش هوایی و ریشه را افزایش داد.

واژه های کلیدی: *Sinorhizobium*، یونجه، خشکی، آنزیم نیتروژناز، قندهای کاهنده، پرولین

مقدمه

تنش خشکی از گروه مهمترین فاکتورهای محیطی است که باعث تغییرات مورفولوژی، فیزیولوژی و مولکولی گیاه شده و رشد و کارکرد گیاهان کشاورزی را متأثر می‌سازد (۹). یکی از عوامل کاهش کارکرد در شرایط کمبود آب را می‌توان به کاهش دسترسی گیاه به نیتروژن نسبت داد (۳). اگر چه خشکی بسیاری از جنبه‌های گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، اما حساسیت تثبیت نیتروژن به کمبود آب بیشتر است، زیرا بسیاری از فرآیندهای زیست‌شیمیایی گیاه تا تخلیه ۷۰ الی ۸۰ درصد رطوبت قابل استفاده خاک تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند، در حالی‌که تخلیه ۵۰ درصد از رطوبت قابل استفاده خاک موجب کاهش تثبیت نیتروژن می‌گردد (۱۶، ۱۹ و ۲۴). افزایش تنش آبی باعث کاهش فراوانی تارهای کشنده، فراوانی باکتری، قدرت چسبندگی و نفوذ باکتری به تارهای کشنده، انتشار اکسیژن از سطح گره به داخل و کاهش فعالیت آنزیمی شده و در نتیجه بر تثبیت نیتروژن و رشد گیاه پیامد منفی دارد (۱۹). در مورد علت کاهش تثبیت نیتروژن در اثر تنش آبی نظرات متفاوتی وجود دارد. برخی علت آن را کاهش فتوسنتز و ساخت کربوهیدراتها، کاهش فراوانی گره‌های ریشه و یا کاهش انتقال دهنده‌های اکسیژن در گره می‌دانند، که سبب انباشتگی اکسیژن در گره‌ها و بدنبال آن کاهش فعالیت آنزیم نیتروژناز می‌شود (۶).

در چرخه زندگی، گیاهان تحت تأثیر انواع گوناگونی از تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند که برای زنده ماندن مجبور به یکسری تغییرات در فعالیت‌های زیست شیمیایی و آنزیمی می‌شوند (۴). پاسخ گیاهان و باکتری‌های ریزوبیومی همزیست به کمبود آب بسیار پیچیده است و

۱و۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: lakzian@ferdowsi.um.ac.ir)
۳ - دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی کرمان
۴- استادیار دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان

Archive of SID
www.SID.ir

می‌تواند شامل اثرات مخرب و یا تغییرات سازشی باشد. پاسخ اولیه به کمبود آب در زنده ماندن گیاه در شرایط دشوار لازم و ضروری است (۴ و ۱۷). بردباری در برابر تنش آبی در گیاهان و باکتری‌های همزیست، تحت تأثیر پارامترهای گوناگون ژنتیکی – محیطی قرار دارد (۱۵). تنظیم اسمزی به عنوان یکی از مکانیسم‌های اصلی گیاه برای بردباری در برابر تنش خشکی در نظر گرفته شده است. زمانی‌که یاخته در تنش اسمزی پایین قرار می‌گیرد، اسمولیت‌ها یا متابولیت‌های سازگار در آن انباشته می‌شوند (۱۸). نوع متابولیت‌های سازگار در گونه‌ها و ارقام گوناگون گیاهی ناهمانند است، این متابولیت‌های سازگار شامل آمینواسیدهای گوناگون (پرولین)، قندها (ساکاروز و فروکتان)، پلی‌اول‌ها (مانیتول و پنیتول)، آمین‌های چهارتایی (گلایسین و بتائین) و اسیدهای آلی (مالات و سیترات) می‌باشند. این ترکیبات کوچک و دارای حلالیت بالا در pH فیزیولوژیکی خنثی هستند و در غلظت‌های بالا در یاخته هیچ‌گونه اثر زهری و زیانبار ندارند (۱۸ و ۲۱). انباشتگی اسمولیت‌ها در یاخته‌های گیاهی سبب کاهش پتانسیل اسمزی یاخته گردیده و از این رو سبب ادامه و حفظ جذب آب و فشار تورگر می‌شوند که برای ادامه برخی از فرآیندهای فیزیولوژیک همچون باز بودن روزنه‌ها و ادامه رشد لازم می‌باشد (۱۸).

گیاهان هنگام تنش خشکی با سازوکارهای ویژه‌ای شرایط خشکی را بردباری می‌کنند، با این حال کاهش رشد در آنها دیده می‌شود. یکی از دلایل کاهش رشد، کاهش جذب عناصر غذایی به ویژه نیتروژن و فسفر است (۳) و گیاهانی که دارای مقادیر کافی نیتروژن و فسفر باشند بردباری بیشتری در برابر تنش آبی نشان می‌دهند (۱۱). یکی از راه‌های تأمین نیتروژن تثبیت زیستی است و در شرایطی که نیتروژن به اندازه کافی در دسترس گیاه قرار گیرد جذب فسفر و سایر عناصر غذایی افزایش می‌یابد (۲۶). پژوهش‌های گوناگون نشان داده است که در شرایط دشوار محیطی مایه‌زنی گیاهان با جدایه‌های بومی *Sinorhizobium* پایدار به خشکی، تأثیر مثبتی در همزیستی لگوم – ریزوبیوم داشته و این گیاهان از رشد و کارکرد بیشتری نسبت به سایر گیاهان برخوردار بوده‌اند (۱۶ و ۲۰). تا کنون بررسی ویژه‌ای بر روی مایه‌زنی گیاه یونجه با جدایه‌های بومی *Sinorhizobium* بردبار در برابر خشکی در خاکهای استان کرمان که تحت تنش درجه‌های گوناگونی از شوری و خشکی قرار دارند، انجام نگرفته است. بنابراین شناسایی سوش‌های برتر سینوریزوبیوم ملیلوتی همزیست گیاه یونجه از نظر بردباری به خشکی و شوری دارای اهمیت است و می‌توان آنها را به عنوان جدایه‌های ریزوبیومی کارآمد و سازگار برای تولید محصول بیشتر معرفی نمود و استفاده از آنها به عنوان یک کود زیستی را می‌توان یک گام اساسی در بهبود کشاورزی این منطقه دانست. این کار ضمن افزایش کارکرد در واحد سطح، در جهت پایداری سیستمهای زراعی منطقه نیز می تواند سودمند باشد.

مواد و روش‌ها

از ۳۴ مزرعه استان کرمان به وسعت تقریبی ۳۳۰۰۰ هکتار، شماری گره از ریشه‌های گیاه یونجه گردآوری شد. گره‌ها برای ۱۰ ثانیه با الکل اتیلیک ۹۶ درصد و ۳ دقیقه با محلول هیپوکلریت ۵ درصد گندزدایی شدند و چندین بار با آب مقطر سترون شسته شدند. هر گره در درون یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری گذاشته شد و نزدیک ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به آن افزوده شد، با له کردن گره‌ها سوسپانسیون یکنواخت باکتری آماده شد. از سوسپانسیون بدست آمده از هر گره یک لوپ بر روی محیط کشت TY[1] دارای معرف کنگورد با روش خطی کشت داده شد. بدین گونه ۱۱۵ جدایه جداسازی و خالص‌سازی شدند. پس از آزمون گره‌زایی ۸۲ جدایه *Sinorhizobium* تأیید و بر پایه چگونگی رشد گیاه میزبان که نشان دهنده توانایی جدایه‌ها در انجام فرایند تثبیت نیتروژن بود، ۴۹ جدایه برای مطالعه خشکی گزینش شدند. این باکتری‌ها از راه‌های گوناگونی مایه افزایش رشد گیاه می‌شوند که یکی از آنها تثبیت نیتروژن است.

پیش از هر گام از آزمایش کار یکسان سازی فراوانی یاخته‌های جدایه‌ها برای مایه‌زنی گیاه انجام شد. برای بررسی توان بردباری جدایه‌ها از محیط کشت مایع TY با پتانسیل‌های آبی ۰، ۱-، ۲-، و ۳/۵- مگاپاسکال (توسط پلی‌اتیلن‌گلیکول ۶۰۰۰) بهره‌گیری شد (۱۲). جدایه‌ها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع رشد داده شدند، پس از گذشت مدت زمان ۷۲ ساعت میزان چگالی نوری جدایه‌ها اندازه‌گیری و جدایه‌های حساس و بردبار در برابر خشکی گزینش شدند (۱۵).

در شرایط گلخانه از مایه‌زنی دو جدایه *Sinorhizobium* بردبار در برابر خشکی (S27K, S36K)، بردبارترین جدایه‌ها به خشکی در مرحله آزمایشگاهی، و دو جدایه *Sinorhizobium* حساس به خشکی (S56K, S64K) بر روی گیاه یونجه (رقم بمی) در سه سطح خشکی (شاهد، خشکی متوسط و خشکی شدید به ترتیب ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ درصد رطوبت گنجایش زراعی) در قالب طرح کامل تصادفی به صورت فاکتوریل در چهار تکرار بر روی خاکی با نیتروژن کل ۰/۰۴ درصد، شوری ۷/۲ دسی‌زیمنس بر متر (خاک شور) با بافت شنی بهره‌گیری شد. گنجایش زراعی خاک به روش وزن‌سنجی اندازه‌گیری شد. پس از کاشت دانه‌های سترون و جوانه‌دار شده یونجه در گلدان‌ها و افزودن یک میلی‌لیتر جدایه‌های *Sinorhizobium*، گلدان‌ها به مدت ۷۰ روز در گلخانه نگهداری شدند. گلخانه دارای سیستم گرمایی و تهویه اتوماتیک بود. رطوبت گلخانه نیز از راه تهویه اتوماتیک فضای درون گلخانه تنظیم می‌شد. شرایط گلخانه ۱۶ ساعت روشنایی (دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد) و ۸ ساعت تاریکی (دمای ۲۰ درجه

1-Trepton Yeast

Archive of SID

www.SID.ir

سانتی‌گراد) و رطوبت ۴۴ درصد بود. رطوبت گلدانها به مدت دو هفته در نزدیک گنجایش زراعی نگهداری شد تا گیاه کاملاً مستقر شود. سپس تعداد گیاهچه‌ها به ۵ عدد کاهش یافت و تنش خشکی بعد از استقرار کامل گیاه بر اساس رطوبت وزنی اعمال شد. در طول دوره رشد گیاه رطوبت گلدانها در تیمار شاهد نزدیک گنجایش زراعی، در تیمار خشکی متوسط در حد ۵۰ درصد رطوبت گنجایش زراعی و در خشکی شدید نزدیک ۲۵ درصد رطوبت گنجایش زراعی نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها با آب استریل دارای رسانایی الکتریکی حدود ۰/۵ دسی‌زیمنس بر متر انجام شد و برای برآوردن عناصر مورد نیاز گیاه از محلول غذایی FP[1] (بدون نیتروژن) بهره‌گیری شد (۱۱). در پایان دوره آزمایش فعالیت آنزیم نیتروژناز به روش (Bender and Rolfe)، میزان قندهای کاهنده ریشه (به روش Somogy & Nelson)، میزان غلظت پرولین برگ (به روش Irigoyen و همکاران) میزان کل پروتئین‌های محلول بخش هوایی (به روش Lowry) و مقدار سدیم و پتاسیم گیاه (به روش نور سنجی شعله‌ای) اندازه‌گیری شد (۷).

مهمترین روش‌ها برای اندازه‌گیری تثبیت زیستی نیتروژن بررسی میزان کاهش استیلن، استفاده از رادیوایزوتوپ $^{15}N_2$ و بررسی میزان رشد گیاه می‌باشند (۲۲). دگرگون شدن استیلن به اتیلن شاخصی برای نشان دادن فعالیت آنزیم نیتروژناز و میزان تثبیت و کاهیده شدن نیتروژن می‌باشد. آنزیم نیتروژناز موجود در گره‌های تثبیت کننده نیتروژن با انتقال الکترون به گاز نیتروژن آن را کاهیده و به آمونیاک دگرگون می‌نماید. برای دگرگونی استیلن به اتیلن، الکترون آزاد نیاز است و بایستی استیلن کاهیده گردد تا به اتیلن دگرگون شود، هنگامی که گره موثر باشد و بتواند نیتروژن را تثبیت کند، استیلن را به اتیلن دگرگون می‌کند و با اندازه گیری دقیق اتیلن توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی می‌توان توانایی تثبیت کنندگی نیتروژن را نیز اندازه گرفت (۱۰). در این پژوهش از دستگاه کروماتوگرافی گازی شیمادزو مدل ۱۶A مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای با ستون پر شده با آلومینای فعال برای اندازه‌گیری تثبیت نیتروژن بهره‌گیری شد. یک گیاه یونجه درون لوله‌های درب‌دار قرار داده و با درب‌پوش پلاستیکی ویژه‌ای پوشانده شد. سپس با سرنگ ده درصد از هوای درون لوله‌های مورد آزمایش بیرون کشیده شد و به همان اندازه گاز استیلن به لوله‌ها تزریق شد، لوله‌ها را برای مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شدند. برای تجزیه از مخلوط گاز موجود در هر لوله به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد و سپس با استفاده از منحنی استاندارد غلظت اتیلن در هر لوله تعیین شد. به این صورت که یک میلی لیتر از گاز نمونه‌برداری شده از طریق قسمت تزریق دستگاه به آن تزریق شد، درجه حرارت قسمت تزریق، آشکارساز و محفظه گرما به ترتیب ۱۵۰، ۱۵۰ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. از گاز نیتروژن با سرعت جریان ۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه به عنوان فاز متحرک استفاده گردید، نوع ستون C_{18} بود. این دستگاه به رایانه‌ای متصل بود که پیک حاصل از تزریق نمونه را نمایش می‌داد، در این شرایط زمان بازیافت اتیلن استاندارد (خالص) از ستون ۱/۶ دقیقه بود. مقدار اتیلن از طریق اندازه‌گیری ارتفاع یا سطح پیک حاصل و مقایسه آن با منحنی استاندارد تعیین شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از اتیلن خالص استفاده شد. اتیلن خالص به‌طور متوالی با هوا رقیق شد و در نهایت استانداردهایی با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ (جزء در میلیون) ساخته و به همان روش فوق تزریق، سطح و ارتفاع پیک‌های حاصل اندازه‌گیری شد. نمودار غلظت استاندارد بر حسب سطح پیک رسم گردید و رابطه خط از معادله ($Y=bX+a$) محاسبه گردید که در این معادله X غلظت اتیلن بر حسب جزء در میلیون برای هر میلی‌گرم گره تازه و Y سطح پیک نمونه است و مقدار a برابر با ۷۹۱/۷۱- و b برابر با ۲۴/۵۰ می‌باشد.

داده‌های بدست آمده با نرم‌افزار MINITAB به صورت فاکتوریل و بر مبنای طرح کامل تصادفی مورد آنالیز قرار گرفت. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ مقایسه شدند. برای رسم نمودارها از نرم افزارMicrosoft Excel XP استفاده گردید.

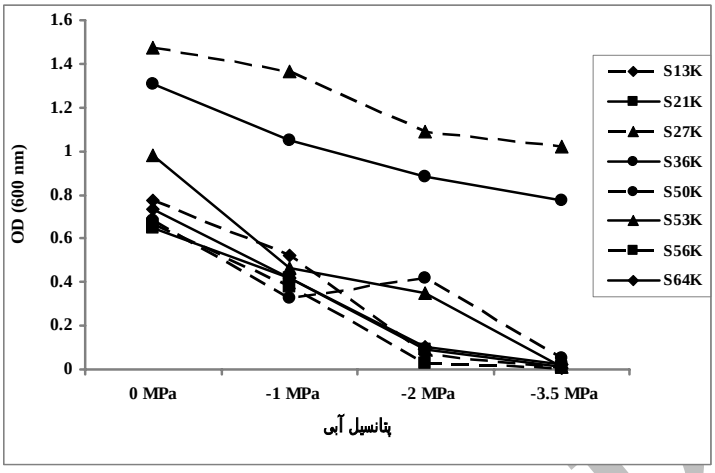
نتایج و بحث

آزمون داده‌ها نشان داد که تنش خشکی پیامد بدی بر رشد جدایه‌های *Sinorhizobium* داشته و بردباری جدایه‌های گوناگون *Sinorhizobium* در برابر تنش خشکی ناهمانند است و برخی از جدایه‌ها در شرایط تنش بردبارتر هستند و می‌توانند رشد بهتری نسبت به سایر جدایه‌ها داشته باشند (شکل ۱). دو جدایه S27K و S36K تا پتانسیل آبی ۳/۵- مگاپاسکال و دو جدایه S50K و S53K نیز تا پتانسیل آبی ۲- مگاپاسکال رشد کردند، بنابراین این چهار جدایه در گروه بردبار در برابر خشکی گروه‌بندی شدند. اما رشد چهار جدایه حساس S13K, S21K, S56K S64K در پتانسیل آبی ۱- مگاپاسکال رشدی نداشتند (شکل ۱). پژوهشگران دیگر نیز گزارش کردند که بین جدایه‌های *Sinorhizobium* از نظر میزان رشد در سطوح گوناگون پتانسیل آبی تفاوت وجود دارد (۱۶). برخی از باکتری‌ها از راه گسترش غشاء، ساخت آنزیم‌های با کارآیی بالا در محلول با قدرت یونی بالا و انباشت مواد حل شده در سیتوپلاسم (معمولا اسیدهای آمینه به منظور جبران پتانسیل آبی کم در محلول) می‌توانند در محیط‌های خشک و شور سازگاری پیدا کنند و در این شرایط دشوار به زندگی خود ادامه دهند (۲۳).

2-Finish Peat

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- منحنی رشد جدایه‌های *Sinorhizobium* بر اساس (Optical Density) در سطوح گوناگون پتانسیل آبی

پلی‌اتیلن‌گلیکول به دلیل وزن مولکولی زیاد (۶۰۰۰) نمی‌تواند وارد آپوپلاست گردد، بنابراین آب نه تنها از یاخته دور نگه داشته می‌شود، بلکه از دیواره یاخته‌ای نیز دور نگه داشته می‌شود و این فرایند باعث می‌شود که این ماده شرایط بسیار مشابهی با خاک، در برابر دیگر مواد اسمزی که به تدریج وارد دیواره یاخته می‌شوند، پدید آورد (۲۷).

آزمون داده‌ها نشان داد که بین تثبیت زیستی نیتروژن، شاخص‌های رشد، متابولیت‌های سازگار (میزان قندهای کاهنده، پرولین، میزان پروتئین‌های محلول)، نسبت پتاسیم به سدیم در بخش هوایی و ریشه گیاه یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های گوناگون *Sinorhizobium*، از نظر بردباری در برابر خشکی تفاوت معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد.

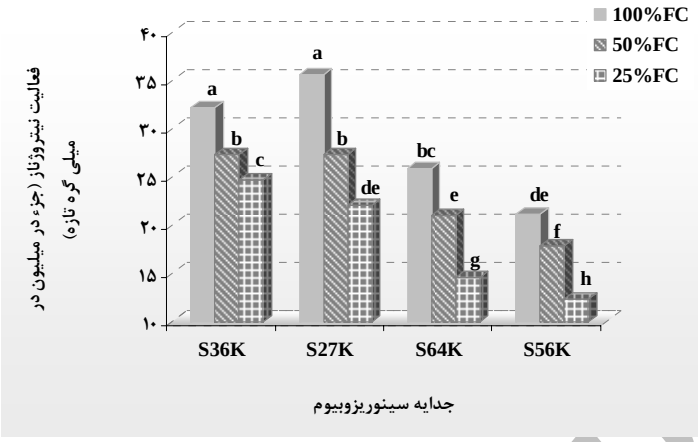
داده‌های بدست آمده از آزمون میانگین‌ها نشان داد میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز تحت شرایط خشکی کاهش پیدا کرده است و بین اثر جدایه‌های گوناگون *Sinorhizobium* بر گیاه در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (شکل ۲). آزمون میانگین‌ها میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز گیاه یونجه در تیمارهای آزمایشی در سطوح گوناگون خشکی نشان داد، بیشترین میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز مربوط به یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* بردبار در برابر خشکی S27K و S36K در رطوبت گنجایش زراعی (FC) بود. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون میانگین‌ها مشاهده شد که در سطح خشکی شدید وزن خشک اندام هوایی گیاهان یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های بردبار S36K و S27K به ترتیب ۲ و ۱/۸ برابر، گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه حساس S56K بود (شکل ۳). شمس الدین و ورنر (۲۰) نیز گزارش کردند که به‌طور معمول مایه‌زنی جدایه ریزوبیومی بردبار باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم نیتروژناز می‌شود.

آزمون میانگین وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه در تیمارهای آزمایشی در سطح‌های گوناگون خشکی نشان داد، کمترین وزن خشک اندام هوایی مربوط به یونجه مایه‌زنی شده با جدایه ریزوبیومی حساس به خشکی S56K در سطح خشکی شدید بود. همچنین در سطوح دیگر خشکی نیز این جدایه کمترین وزن خشک اندام هوایی را نسبت به سایر جدایه‌ها داشت (شکل ۳). آزمون میانگین‌های وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه نشان داد که در سطح خشکی شدید وزن خشک اندام هوایی گیاهان یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های بردبار حدود ۳ برابر وزن خشک اندام هوایی گیاهان یونجه مایه‌زنی شده جدایه حساس S56K است (شکل ۳). پژوهشگران دیگر نیز گزارش کرده‌اند که تنش آبی باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی در گیاه می‌شود و این مورد در گیاهان ماش، نخود، سویا، یونجه و شبدر زیرزمینی گزارش شده است (۱۲). دلیل این امر کاهش سطح برگ بوده که باعث کاهش دریافت نور و میزان فتوسنتز می‌شود (۱۳).

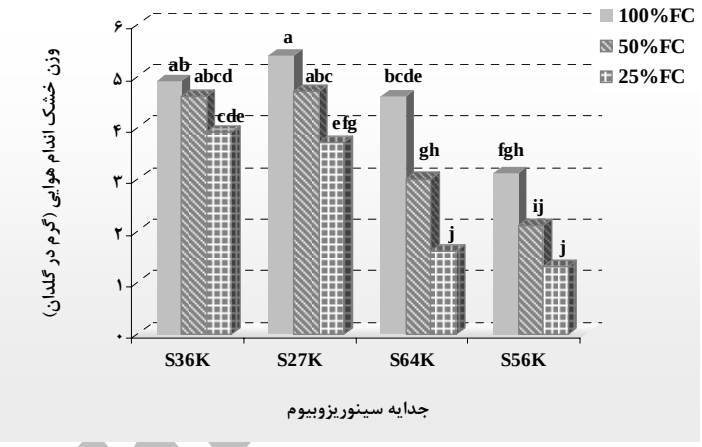
داده‌های بدست آمده از بررسی برهم‌کنش جدایه *Sinorhizobium* و تنش خشکی بر میزان اسید آمینه پرولین نشان داد که بیشترین میزان پرولین گیاهان یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های سینوریزوبیومی بردبار S27K و S36K در رطوبت گنجایش زراعی (FC) مشاهده شد. میزان اسید آمینه پرولین در این دو جدایه در تمام سطوح خشکی نسبت به سایر جدایه‌ها بیشتر بود (شکل ۴). داده‌های بدست آمده از آزمون میانگین‌ها نشان داد که در سطح خشکی شدید میزان اسید آمینه پرولین گیاهان یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های بردبار ۲/۷ برابر بیشتر از جدایه حساس S56K انباشته می‌شود (شکل ۴). تجمع پرولین در یاخته‌های گیاهی که تحت تنش خشکی و شوری هستند، یک پدیده طبیعی می‌باشد (۱۴). پرولین در تمام اندام‌های گیاه در طی تنش وجود دارد، با این وجود میزان انباشتگی آن در برگ‌ها سریع‌تر و بیشتر از سایر نقاط می‌باشد (۱۷).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲- آزمون میانگین‌های فعالیت آنزیم نیتروژناز گیاه یونجه (گره‌های تازه) مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* در سطوح گوناگون خشکی

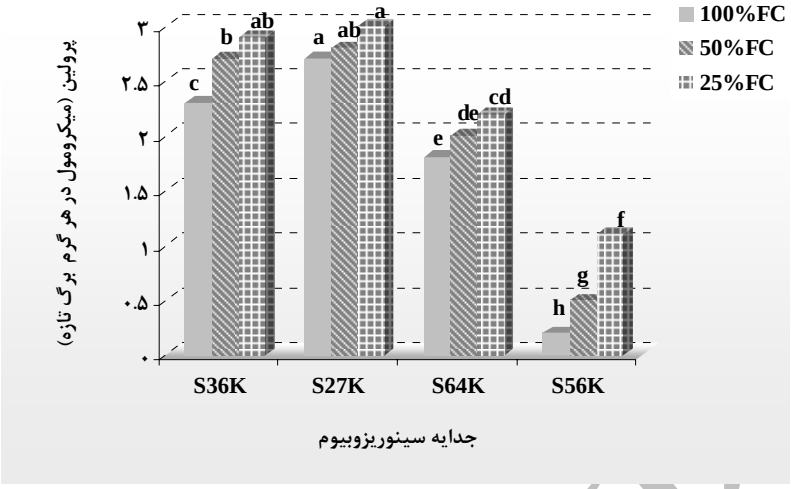


شکل ۳- آزمون میانگین‌های وزن خشک اندام هوایی گیاه یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* در سطوح گوناگون خشکی

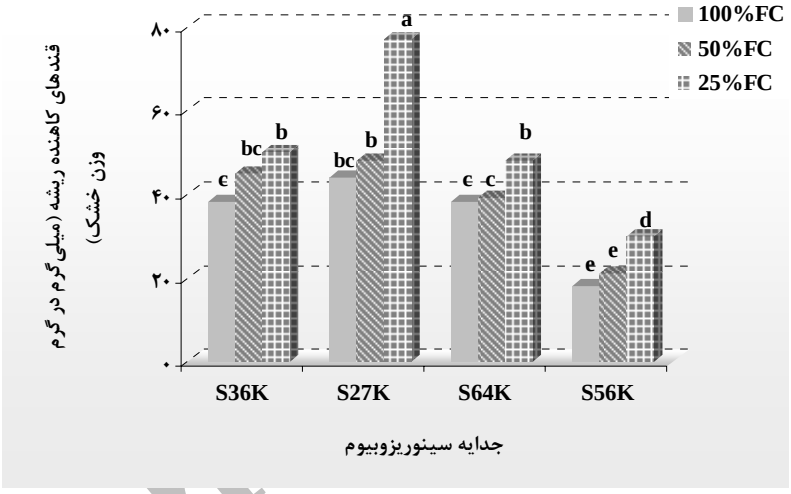
انباشتگی پرولین همراه با پسابیدگی، یکی از مهمترین عکس العمل‌های گیاهان نسبت به کمبود آب یا افزایش فشار اسمزی می‌باشد (۱۷). پرولین علاوه بر اینکه به عنوان اسمولیت عمل می‌کند، می‌تواند نقش‌های دیگری از جمله محافظت از آنزیم‌ها در برابر تغییر ماهیت (۱۴)، حفظ حلالیت پروتئین‌ها (۲۵)، تثبیت فسفولیپیدهای غشایی (۲۵)، تنظیم کننده اسیدیته سیتوپلاسمی (۱۴)، منبع نیتروژن و کربن در یاخته (۲۵)، تنظیم پتانسیل ردکس یاخته توسط متابولیسم پرولین (۲۱) و موارد دیگر بر عهده داشته باشد.

میانگین قندهای کاهنده ریشه گیاهان مایه‌زنی شده با چهار جدایه گزینش شده *Sinorhizobium* در شرایط تنش خشکی نشان داد که خشکی باعث افزایش میزان قندهای کاهنده ریشه در تمام سطوح تیمار خشکی نسبت به شاهد (رطوبت گنجایش زراعی) شده است و گیاهان مایه‌زنی شده با دو جدایه بردبار S27K و S36K بیشترین میزان قندهای کاهنده ریشه و جدایه حساس S56K کمترین میزان قندهای کاهنده ریشه را داشتند (شکل ۵). به‌طوری که مشاهده می‌گردد میزان قندهای کاهنده ریشه در گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های بردبار ۱/۷ برابر جدایه حساس S56K بوده است (شکل ۵). تنش خشکی بر متابولیسم قندها در گیاهان تأثیر می‌گذارد (۸). قندها به‌صورت‌های گوناگون در بردباری به خشکی در گیاهان شرکت می‌کنند. قندها می‌توانند به عنوان متابولیت‌های سازگار یا اسمولیت‌ها سبب تنظیم اسمزی شوند (۸). همچنین سبب پایداری غشا و پروتئین‌های در حال خشک شدن می‌گردند، بدین صورت که تثبیت غشاء از طریق جایگزین شدن آب موجود درغشای لیپیدی دو لایه صورت می‌گیرد و به این ترتیب از متراکم شدن فسفولیپیدها جلوگیری کرده و همچنین از پیوندهای نابجا بین پروتئین‌های غشایی جلوگیری می‌کنند. پایدارسازی پروتئین‌ها نیز از طریق تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین گروه‌های کربوکسیل قند و زنجیره‌های قطبی پروتئین صورت می‌گیرد (۸).

www.SID.ir



شکل ٤- آزمون میانگین‌های میزان پرولین برگ تازه گیاه یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* در سطوح گوناگون خشکی



شکل ٥- آزمون میانگین‌های میزان کاهنده ریشه گیاه یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* در سطوح گوناگون خشکی

با توجه به شکل ۶ مشاهده می‌شود کـه تفـاوت معنـی‌داری بـین میزان پروتئین کل بخش هوایی گیاهان مایه‌زنـی شـده بـا دو جدایـه بردبار S27K و S36K و جدایه حساس S56K وجود دارد. به‌طـوری که درصد پروتئین کل اندام هوایی گیاهان یونجه مایـه‌زنـی شـده بـا جدایه‌های بردبار حدود ۲۰درصد نسبت به گیاهان مایه‌زنی شده بـا دو جدایه حساس بیشتر می‌باشد. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که جدایه‌های بردبار در برابر شرایط تنش خشکی میـزان پـروتئین گیـاه را افـزایش می‌دهندیا از کاهش در شرایط تـنش جلـوگیری مـی‌کننـد البتـه ایـن احتمال وجود دارد که کاهش در نتیجه تخریب و ناپایدارسازی کـه در جدایه‌های حساس روی می‌دهد در انواع مقاوم صورت نگیرد. گزارش شده است که رشد گیاه، جذب مواد غذایی، متابولیسم و سنتز پـروتئین به میزان زیادی تحت تأثیر تنش آبی قرار می‌گیرد (۵). علت افـزایش پروتئین ممکن است بدین دلیل باشد که تنش باعث تحریک افـزایش پروتئین های موجود گردیده و یا پروتئین هـای جدیـدی سـنتز شـده باشند (۱).

نتایج بدست آمده از بررسی نسبت پتاسیم به سدیم اندام هوایی و ریـشه گیاهـان مایـه‌زنـی شـده بـا چهـار جدایـه گـزینش شـده *Sinorhizobium* در شرایط تنش خشکی نشان داد که خشکی باعث کاهش نسبت پتاسیم به سدیم اندام هوایی و ریـشه در تمـام سـطوح تیمار خشکی نسبت به شاهد (رطوبت گنجایش زراعی) شـده اسـت و میزان سدیم بخش هوایی گیاه بیشتر از ریشه گیاه است (شکل‌های ۷ و ۸). گیاهـان مایـه‌زنـی شـده بـا دو جدایـه بردبـار S27K و S36K بیشترین نسبت پتاسیم به سدیم اندام هوایی و ریشه و جدایه حـساس S56K کمترین میزان نسبت پتاسیم به سدیم اندام هوایی و ریـشه را در رطوبت گنجـایش زراعـی داشـتند (شـکل ۷ و ۸). بـه‌طـوری کـه مشاهده شد نسبت پتاسـیم بـه سـدیم انـدام هـوایی گیاهـان یونجـه

Archive of SID

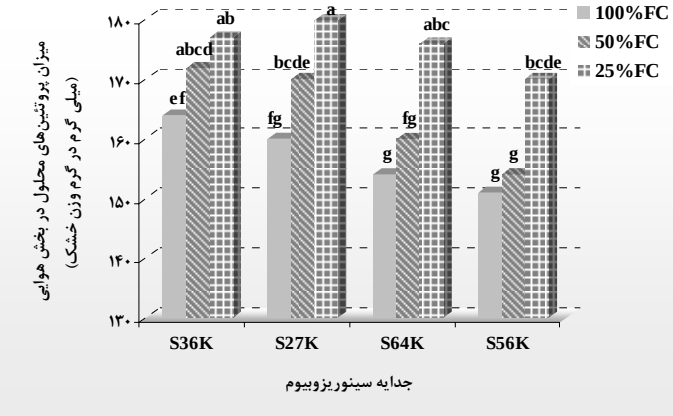
www.SID.ir

مایه‌زنی شده با جدایه‌های بردبار S36K و S27K به ترتیب ۲/۳ و ۳/۳ برابر نسبت به گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه حساس S56K می‌باشد. یکی از روش‌های بردباری به تنش خشکی در گیاهان کاهش جذب یون سدیم و یا به عبارت دیگر کاهش اندک نسبت پتاسیم به سدیم در تیمارهای تنش آبی نسبت به شاهد می‌باشد. در بسیاری از گیاهان متحمل به شوری این نسبت در شرایط تنش آبی نسبت به گیاهان حساس کمتر است و یا اینکه سدیم جذب شده در واکوئل‌های ریشه گیاه نگه داشته شده و جهت تنظیم اسمزی از آن استفاده می‌شود (۲). دور کردن نمک، گوشتی شدن و کنترل تعرق از راه اثرات سدیم بر روزنه‌ها، صفات ثانویه ویژه‌ای هستند که به گیاهان بردبار در برابر تنش شوری و خشکی اجازه مصرف کلرید سدیم را به عنوان یک منبع اسمزای ارزان می‌دهد. در حالی‌که گیاهان حساس قادر نخواهند بود جذب بیش از حد سدیم را بردباری نمایند، بنابراین گیاهانی که در شرایط شور از نسبت پتاسیم به سدیم بالاتری برخوردار باشند مناسب‌تر می‌باشند (۲).

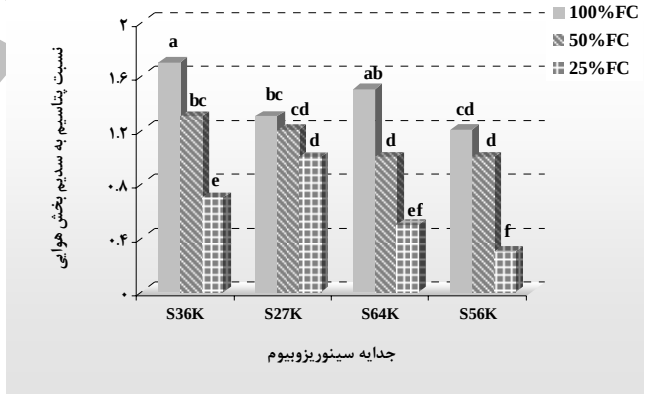
با بررسی کلی داده‌های این پژوهش مشاهده شد که تنش خشکی بر رشد گیاه میزبان و همزیستی لگوم – Rhizobium تأثیر بدی داشته و مایه‌زنی گیاهان با جدایه‌های بومی بردبار در برابر خشکی در شرایط خشک تأثیر مثبتی بر روی تمامی پارامترهای تثبیت نیتروژن (فعالیت نیتروژناز، کارکرد گیاه)، متابولیت‌های سازگار گیاه (میزان پرولین برگ، پروتئین‌های محلول، کاهنده ریشه) ونسبت پتاسیم به سدیم دارد، بین دو جدایه بردبار در برابر خشکی S27K و S36K تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد و در کل داده‌ها نشان داد که می‌توان از همزیستی رقم یونجه بمی با دو جدایه بردبار در برابر خشکی S27K و S36K در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد و باعث افزایش تولید و کارکرد این گیاه در استان کرمان شد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، مرکز تحقیقات استان کرمان، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی ماهان قدردانی می‌نماییم.



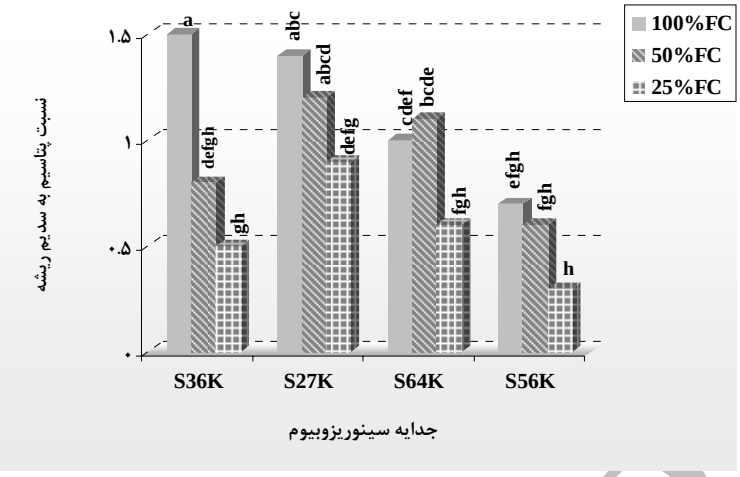
شکل ٦- آزمون میانگین‌های میزان کل پروتئین بخش هوایی گیاه یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* در سطوح گوناگون خشکی



شکل ۷- آزمون میانگین‌های نسبت پتاسیم به سدیم بخش هوایی گیاه یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* در سطوح گوناگون خشکی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۸- آزمون میانگین‌های نسبت پتاسیم به سدیم ریشه گیاه یونجه مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Sinorhizobium* در سطوح گوناگون خشکی

منابع

۱- شهبازی م. و محقق دوست ز. ۱۳۷۵. بررسی اثرات کلرور سدیم بر رشد و انباشت ترکیبات آلی و معدنی در گندم. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۲۷، شماره ۴، صفحه ۷۰-۷۸.

2- Basra A.S., and Basra R.K. 1997. Mechanism of environmental stress resistance in plants. Harward Academic Publisher p:83-111

3- Boutraa T., and Sanders F.E. 2001. Effects of interactions of moisture regime and nutrient addition on nodulation and carbon partitioning in two cultivars of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). J Agron Crop Science186:229-232

4- Chaves MM (2002) How plants crop with water stress in the field. Photosynthesis and growth. Ann Botan 89:907-916

5- Cordovilla MDP .1999. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of faba bean (*Vicia Faba* L.). Appl Soil Ecol 11:1-7

6- Gordon A.J., Minchin F.R., Skot L., and James C.L. 1997. Stress-induced declines in soybean N_2 fixation are related to nodule sucrose synthase activity. Plant Physiol 114:937-946

7- Horwiz W., and Latimer J. 2005. Official method of analysis AOAC international. Maryland. USA.

8- Ingram J, Bartles D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annu Rev Plant Phhysiol. Plant Mol. Biol 47:377-403

9- Irigoyen J, Bartles D. 1996. The molecular bass of dehydration tolerance in plants. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47:377-403

10- Junior FBDR., Reis VM, Urquiaga S., and Dobereiner J. 2000. Influence of nitrogen fertilization on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. And *Acetobacter* diazotrophicus in sugar cane (*Saccharum* spp.). Plant soil 219(1/2):153-159

11- Misra A, Tyler G. 1999. Influence of soils moisture on soil solution chemistry and concentrations of mineral in calcioles pheleum phleoids and veronica spicata growth on a limestone soil. Ann Botan 84:401-410

12- Mrema A.F., Granhall U., and Sennerby-Forsse L. 1997. Plant growth, leaf water potential, nitrogenase activity and nodule anatomy in *Leucaena leucocephala* as affected by water stress and nitrogen availability. Trees 12:42-48

13- Ourcut D.M., and Nilsen E.T. 2000 Salinity stress in: physiology of plants under stress. KA/PP pp177-235

14- Peng Z., and Verma LDPS. 1996. Reciprocal regulation of pyrroline-5-carbxylate symthetase and praline dehydrogenase genes controls praline levels during and after osmotic stress in plants. Mol Gen Genet 253:334-341

15- Pessarakli M. 1994. In handbook plant and crop stress. Marcel Dekker. pp:181-201

16- Rehman A., and Nautiyal C.S. 2002. Effect of drought on the growth and survival of the stress-tolerant bacterium *Rhizobium* sp. NBRI2505 sesbania and its drought-sensitive transposon Tn5 mutant. Springer-Verlag. New York. LLC. 45(5):368-377

17- Safarnejad A. 1996 Improvement in salt and drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa L.*) using tissue culture and molecular genetic techniques. Ph.D. Thesis University of Liverpool. UK

18- Serraj R. and Sinclair T.R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought condition? Plant Cell Environ 25: 333-341

19- Serraj R. 2003. Effects of drought stress on legume symbiotic nitrogen fixation physiol mechanism. Indian. J. of

Archive of SID

www.SID.ir

Experiment Biol 41:1136-1141
20- Shamseldin A., Werner D. 2004. Selection of competitive strains of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris* and adapted to environmental conditions in Egypt, using the gus-reporter gene technique. World J.of Microbiol. Biotechnol 20:377-382
21- Sharp R.E., and Verslues P.V. 1999. Proline accumulation in maize (Zea mays L.) primary roots at low water potentials. II. Metabolic source of increased praline deposition in the elongation zone. Plant Physiol 119:1349-1360
22- Sprent J.I., and Sprent P. 1990.Nitrogen fixing organism pure and applied aspects. Chapman and Hall. London
23- Sylria D.M., Fuhrmann J.J., Hartel P.G., and Zuberer D.A. 1999. Principles and applications of soil microbiology
24- Venkateswarlu B., and Rao A.V. 1987. Quantitative effects of field water deficits on $N_2(C_2H_2)$ fixation in selected legumes grown in the Indian desert. Biol Fertil Soils. 5:18-22
25- Walton E.F., and Podivinsky E. 1998. Regulation of praline biosynthesis in kiwifruit buds with and without hydrogen cynanmide treatment. Physiol plantarum 102: 171-178
26- Watson R.J., Chan Y.K., Wheatcroft R., Yong A.F., and Han S. 1988. *Rhizobium meliloti* genes required for C_4-Dicarboxylate transport and symbiotic nitrogen fixation are located on a megaplasmid. J. of Bacteriol 170(2):927-934
27- Whalley W.A., Bengough A.G., and Dexter A.R. 1998. Water stress induced by PEG decreases the maximum growth pressure of the roots of pea seedling. J. Experimen Botan 49(327):1689-1694

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Water and Soil
Vol. 24, No. 3, July-Aug 2010, p. 407-416

نشریه آب و خاک
جلد ۲۴، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۸۹، ص. ۴۱۶-۴۰۷

Effect of Water Stress on Nitrogen Fixation of *Sinorhizobium* and Compatible Solutes Accumulation in Alfalfa (*Medicago sativa* cv. Bami)

M. Abolhasani Zeraatkar[1]- A. Lakzian[2*]-A. Gholamhossien pour jafari[3] -A. Akhgar [4]

Abstract

Osmoreguolation is a physiological processes that plant cell uses to maintain water balance and it is generally caused by metabolite accumulation inside the cell. Inoculated legumes by some drought tolerant *Sinorhizobium* isolates helps osmoreguolation by increasing biological nitrogen fixation. In order to find some drought tolerant sinorhizobium isolates, 80 isolates were isolated and purified from different parts of Kerman province. They were tested for drought tolerant in liquid Trypton Yeast medium with different water potential (0, -1, -2 and -3.5 MPa using PEG 6000) and then they were classified into tolerant and sensitive groups. Four out of eighty isolates of *Sinorhizobium* (two from each group) were selected for a greenhouse experiment. The experiment was carried out in a factorial arrangement with a completely randomized design. The results showed that in water stress condition, inoculated plant substantially increased the nitrogenase activity, shoot dry weight, proline content, root soluble sugars, soluble protein concentration, K/Na in shoot and root by 2, 3, 2.7, 1.7, 1.1, 3 and 2 times, respectively.

Keywords: *Sinorhizobium*, Alfalfa, Water stress, Nitrogenase activity, Reducing sugars, Proline

Archive of SID

1,2- MSc and Associated prof. of Soil Science Dept., Agricultural College, Ferdowsi University of Mashhad, Respectively
(*- Corresponding author Email: lakzian@ferdowsi.um.ac.ir)
3- MSc student of Eslamic Azad University, Kerman
4- Assistant prof of Valiasr University

www.SID.ir