بررسی توان تحمل به شوری و خشکی جدایه‌های ریزوبیومی هم‌زیست عدس در شرایط دیم

Assessing Tolerance of Rhizobial-Lentil Symbiosis Isolates to Salinity and Drought in Dry Land Farming Conditions

حسین‌علی علیخانی[۱*] و لیلا محمدی[۲]

چکیده

در این پژوهش ۲۲۰ جدایه‌ی ریزوبیومی از دو دشت عمده کشت دیم عدس یعنی دشت مغان و دشت کوهین نمونه‌برداری و مورد آزمون قرار گرفت. با انجام آزمایش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از صحت جنس، گونه و خلوص ۱۸۴ سویه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه* (lenti) *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciea* (*Rlv*) هم‌زیست عدس اطمینان حاصل شد. در تست تحمل به شوری جدایه‌های ریزوبیومی هم‌زیست عدس از محیط کشت YMA+ BTB و نمک NaCl در شوری‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ dS/m انجام شد. از بین ۱۸۴ سویه‌ی ریزوبیومی هم‌زیست عدس تعداد ۱۰۱ سویه ریزوبیومی کاملا حساس (EC=10 dS/m) و تعداد ۲۵ سویه به‌عنوان خیلی متحمل و ۱۰ سویه (۸+۲) به‌عنوان سوپر استرین‌های کاملا متحمل به شوری بودند. تعداد باکتری‌های ریزوبیومی رشد یافته مربوط به دشت کوهین در شوری‌های ۱۰ تا ۵۰ به‌ترتیب ۵۵، ۵۱، ۵۰، ۲۷ و ۸+۲۹ سویه بود در صورتی که در دشت مغان این اعداد به ترتیب برابر ۴۶، ۴۲، ۲۱، ۸ و۲+۶ بود، به‌طور کلی باکتری‌های ریزوبیومی دشت کوهین تحمل به شوری بیش‌تری نسبت به باکتری‌های ریزوبیومی دشت مغان داشتند. در این پژوهش میزان تحمل به خشکی سویه‌های ریزوبیومی در محیط کشت YMB +PEG انجام پذیرفت. در این آزمون میزان خشکی بر اساس دانستیه‌ی نوری (O.D) سوسپانسیون باکتریایی تعیین گردید. میزان تحمل به خشکی باکتری‌های ریزوبیومی در چهار سطح کاملا متحمل، متحمل، حساس و کاملا حساس به‌ترتیب برابر با O.D> 0.5، O.D=0.4-0.5، O.D=0.3-0.4 و O.D < 0.3 گروه‌بندی شد. از بین ۱۰ سوپراسترین (سویه‌های کاملا متحمل) انتخاب شده در آزمون میزان تحمل به خشکی، باکتری‌های برتر دشت مغان شامل ۶ سویه؛ در صورتی‌که باکتری‌های برتر مربوط به دشت کوهین ۲ سویه بود. در نهایت امید است که سوپراسترین‌های انتخابی این مرحله از پژوهش از نظر تحمل به شوری و خشکی بتواند در مراحل بعدی طرح مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: خشکی، شوری، *ریزوبیوم*، سدیم کلراید- پلی اتیلن گلیکول

۱ و ۲: به ترتیب دانشیار و کارشناس گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

*: نویسنده مسوول

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

حدود یک سوم از اراضی جهان در اقلیم‌های خشک و نیمه‌خشک قرار دارند و تقریبا ۱۵ درصد از این اراضی متاثر از نمک هستند. تولیدات گیاهی در بسیاری از اراضی نیمه-خشک و به‌خصوص شور اغلب به‌دلیل کمبود یا فقدان عناصر غذایی خصوصا نیتروژن دارای محدودیت است و افزایش کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار در این اراضی خود افزایش شوری خاک‌ها را به-دنبال دارد به‌علاوه ممکن است مصرف این کودها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نباشد. لذا اهمیت کاربرد کودهای زیستی تثبیت کننده‌ی نیتروژن مولکولی افزایش می‌یابد گرچه شوری و خشکی رشد و تکثیر باکتری-های ریزوبیومی را محدود می‌سازد ولی سویه‌هایی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک و خشکی را به-خوبی تحمل کرده و زنده می‌مانند.

شوری خاک نتیجه انحلال نمک‌های معدنی محلول در آب خاک (محلول خاک) می‌باشد (*وینست*[1]، 1982 و *سینگلتون*[2] و *بهلول*، 1994). در حدود یک سوم اراضی تحت آبیاری جهان یعنی بیش از ۴۰۰-۹۵۰ میلیون هکتار از اراضی دارای قابلیت‌های زراعی دنیا متاثر از شوری می‌باشند (*آلن*[3] و همکاران، 1995، *بیمستین*[4] و *فرانکویز*، 1983 و *وارل*[5] و *راگلی*، 1976). کاتیون‌های محلول در خاک شور غالبا شامل Na^{+}، Ca^{+2}، Mg^{+2} و آنیون‌های محلول شامل Cl، HCO_3، SO_4^{-2}، $CO3^{-2}$ و NO^{-3} می‌باشد (*وینست*، 1982). مجموع انواع خاک‌های شور در ایران بیش از ۱۵ میلیون هکتار است که نزدیک ۱۰٪ کل مساحت کشور را شامل می‌شود و هر ساله به‌دلیل انجام آبیاری‌های بی‌رویه، مصرف آب‌های شور و استفاده ناصحیح کودهای شیمیایی بر میزان این شوری افزوده می‌شود (سالار دینی، ۱۳۶۶ و *آلن* و همکاران، 1995).

تولیدات گیاهی در بسیاری از اراضی نیمه‌خشک و شور اغلب به‌دلیل فقدان نیتروژن دارای محدودیت است (سالار دینی، ۱۳۶۶ و *وارل* و *راگلی*، 1976) و افزایش نیتروژن در این اراضی ممکن است موجب افزایش مقاومت به شوری گیاهان گردد، ولی استفاده از کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار در این اراضی خود شور شدن بیش‌تر خاک‌ها را به‌دنبال دارد. به‌علاوه ممکن است مصرف این کودها از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه نباشد (*حفیظ*[6] و همکاران، 1998 و *وارل* و *راگلی*، 1976) لذا اهمیت تثبیت بیولوژیک نیتروژن ملکولی و مصرف کودهای بیولوژیک خصوصا کودهای میکروبی در این شرایط افزایش می‌یابد (*کوردوویلا*[7] و همکاران، 2001؛ *پساراکی*[8] و *توکر*، 2005؛ *اسپرنت*[9]، 2000 و *سوبارائو*[10]،1998).

شوری خاک ممکن است هر کدام از طرفین هم-زیست و یا روابط متقابل بین آن‌ها را متاثر ساخته و موجب کاهش رشد و فعالیت آن‌ها گردد (*بهاروای*[11]، 1985؛ *کفک*[12] و همکاران، 1994؛ *لبرمستین*[13] و اوگاتا، 1976 و *ماترون*[14]، 2001).

گرچه شوری و خشکی تکثیر باکتری‌های ریزوبیومی را محدود می‌سازد ولی سویه‌هایی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک و خشکی را به‌خوبی تحمل کرده و زنده می‌مانند (*لاکشمی*[15] و *سوبارائو*، 1984؛ *وماچاندرا*[16] و *گراگ*، 2008 و *وارل* و *راگلی*، 1976).

نمک‌های کلراید و سولفات از نمک‌های غالب خاک-های شور به‌حساب می‌آیند. در شرایط شور، رشد گیاه، توسعه سیستم ریشه‌ایی، جذب عناصر غذایی، متابولیسم‌های سلولی و سنتز بسیاری از پروتئین و آنزیم‌ها به‌شدت آسیب می‌بینند (*کوردوویلا* و همکاران، 2001). به‌عقیده *پیساراکی* و همکاران (1992) تاخیر در جوانه‌زنی و رشد گیاه موجب کاهش عملکرد محصول خواهد شد که یکی از آسیب‌های جدی شوری خاک‌ها برای تولید محصولات زراعی به‌شمار می‌آید (*پیساراکی* و همکاران، 1992).

به‌عقیده *ماترون* و همکاران (2001) ریزوبیوم‌های جدا شده از خاک‌های شور سطوح بالا و بازدارنده را بیش‌تر از سویه‌های تهیه شده از مناطق غیرشور تحمل کرده و قادرند تا در شرایط شور کلنیزاسیون موفق‌تری داشته باشند (*کوردوویلا* و همکاران، 2001).

سوبارائو و همکاران (1999) اعلام کرده‌اند که سویه-های ریزوبیومی که قادر به ایجاد یک هم‌زیستی موثر در شوری‌های بالا بوده‌اند الزاما منشا یافته از خاک‌های شور

1. Vincent
2. Singleton and Bohlool
3. Allen *et al.*
4. Bernstein.and Francois
5. Worrall and Roughly
6. Hafeez *et al.*
7. Cordovilla *et al.*
8. Pessaraki and Tucker
9. Sprent
10. Subbarao
11. Bhardwaj
12. Kfck *et al.*
13. Lbernstein, and Ogata
14. Materon
15. Lakshmi-Kumari and Subbarao
16. Vmanchanda and Garg

Archive of SID
www.SID.ir

نیست (*وماچاندرا* و *گراگ*، 2008) در مقابل، *دوکا* و همکاران (1998) گزارش کردند که ایزوله‌های نمونه‌برداری شده از اراضی خشک و شور برای ایجاد گره‌های ریشه‌ای در شرایط شور موفق‌ترند (*وارال* و *راگلی*، 1976).

گیاهان لگوم طیف وسیعی از مقاومت در برابر شوری دارند، در بین آن‌ها از گونه‌های حساس تا انواع نسبتا مقاوم دیده می‌شود (*هانسون*[1] و همکاران، 1998؛ *مس*[2]، 1996 و *زهران*[3]، 2001) در اکثر گیاهان لگوم با افزایش شوری و خشکی میزان رشد و عملکرد محصول کاهش می‌یابد، این کاهش در رشد ممکن است در نتیجه سمیت ناشی از تجمع املاح در بافت‌های گیاهی، افزایش فشار اسمزی و کاهش جذب آب توسط ریشه‌ها و یا اثرات سوء نمک بر فعالیت بعضی از آنزیم‌های گیاهی باشد. هم‌چنین کاهش درصد جوانه‌زنی بذرها و یا صدمات وارد بر هیپوکتیل در هنگام عبور از لایه‌های نمکی خاک از دیگر عوامل هستند (*هانسون* و همکاران، 1998 و *سوبارائو* و همکاران، 1999).

توانایی سویه‌های ریزوبیومی برای ایجاد گره‌های تثبیت کننده نیتروژن مولکولی در شرایط شور و خشک بسیار متفاوت گزارش شده است (*اسپرنت*، 2000 و *دیوکسون*[4] و وولر، 1995) علیخانی و همکاران (۱۳۷۳) نشان نشان دادند که سویه‌های ریزوبیومی از لحاظ تثبیت نیتروژن ملکولی در شرایط شور با یکدیگر تفاوت دارند و این تفاوت بسیار زیاد و از کاملا حساس تا کاملا مقاوم می‌باشد و دیگر این که در شرایط شور، تلقیح گیاه یونجه با استفاده از سویه‌های کاملا مقاوم به شوری موجب موفقیت بیش‌تر هم‌زیستی و افزایش عملکرد محصول می‌شود. فراوانی جمعیت باکتری‌های ریزوبیومی در خاک‌های خشک و فعال بودن گره‌ها و رشد گیاه همگی تاکیدی بر این موضوع است که باکتری‌های ریزوبیومی می‌توانند در خاک‌هایی با رطوبت کم حضور داشته باشند، گرچه میزان جمعیت این باکتری‌ها با افزایش خشکی کاهش می‌یابد ولی با بهبود رطوبت خاک، مجددا افزایش پیدا می‌کند (*وارال* و *راگلی*، 1976).

عدس از جمله محصولات زراعی در مناطق خشک است که اغلب به‌صورت دیم کشت می‌شود به‌طوری‌که از کل سطح زیر کشت عدس (۲۲۰۲۱۳ هکتار)؛ مقدار کشت دیم ۲۰۵۴۴۶ هکتار و تنها ۱۴۷۶۸ هکتار به‌صورت آبی کشت می‌شود؛ لذا این پژوهش به‌منظور ارزیابی و برآورد میزان تحمل شوری و خشکی باکتری‌های *ریزوبیوم لگو مینوزارم* بیو وار *ویسیه* هم‌زیست گیاه عدس از طریق غربال‌گری و انتخاب سویه‌های برتر و یا سوپر استرین‌ها انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و تهیه ایزوله‌های ریزوبیومی

در ابتدا دو منطقه عمده از دیم‌زارهای کشت عدس کشور در استان‌های اردبیل و قزوین-زنجان شامل دشت مغان و دشت کوهین انتخاب و اقدام به برداشت ریشه‌های گیاهان عدس شاداب و سپس جداسازی و شستشوی گره‌های ریشه‌ای شد. گره‌های هر بوته عدس (هر نمونه) درون یک دسیکاتور کوچک دستی حاوی سلیکوژل قرار داده شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و کد گذاری گردید. نمونه‌های شماره ۱ الی ۱۱۰ مربوط به دشت مغان و نمونه‌های شماره ۱۱۱ الی ۲۲۰ مربوط به دشت کوهین می‌باشد. مراحل اولیه شامل خیساندن مجدد گره‌ها، له کردن گره‌ها و تهیه سوسپانسیون ریزوبیومی، کشت بر روی محیط کشت YMA+ کنگورد و نیز YMB+ بر موتیمول بلو (BTB) هم‌چنین رنگ‌آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکوپی و آزمون توان آلوده‌سازی گیاه (PIT) Plant Infection Test به روش وینسنت (1982) انجام پذیرفت. نمونه‌های خالص شده بر روی محیط کشت YMA درون لوله‌های اوریب (Slant) در دمای ۵°C-۲ و نیز محیط نگهدارنده YMB+ گلیسرول (۳۰٪) در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند (*وینست*[5]، 1982).

تعیین میزان تحمل به شوری جدایه‌های ریزوبیومی هم‌زیست عدس

در این آزمون محیط کشت پایه مورد استفاده YMA بود که به آن معرف BTB اضافه شده است در صورت رشد باکتری رنگ آبی محیط کشت به زرد تبدیل می‌شود. برای شور کردن محیط کشت YMA+ BTB از نمک NaCl استفاده شد. پتری‌های حاوی محیط کشت استریل YMA + BTB با شوری ۱۰ و ۲۰ و ۳۰ و ۴۰ و ۵۰ دسی‌زیمنس بر متر شوری آماده و هر پلیت توسط یک ایزوله تلقیح گردید. سپس پتری‌های تلقیح شده درون انکوباتور در دمای ۲۸°C گرماگذاری و پس از ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و در صورت رشد باکتری و زرد شدن رنگ محیط کشت به‌عنوان مثبت و در غیر این‌صورت به‌عنوان ناتوان از رشد در آن سطح از شوری درنظر گرفته شد. ابتدا جدایه‌ها

1. Hanson *et al.*
2. Mass
3. Zahran
4. Dioxon and Wheeler
5. Vincent

Archive of SID
www.SID.ir

در شوری ۱۰ دسی‌زیمنس بر متر مورد بررسی قرار گرفتند و سپس به ترتیب توان رشد باکتری‌ها به شوری‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ دسی‌زیمنس مورد ارزیابی واقع شد.

تعیین میزان تحمل به خشکی سویه‌های ریزوبیومی

برای تعیین میزان تحمل باکتری به سطوح مختلف خشکی از روش (Burlyn E. Michel & Merrill R. Kaufmann 1973) استفاده شده است. در این روش از ماده PolyEthylene Glycol 6000 (PEG) برای تامین پتانسیل آبی مورد نیاز بر حسب بار (Bar) در محیط کشت YMB استفاده گردید (*زهران*، 1999).

پتانسیل آبی 0-، 5-، 10- و 15- (Bar) به ترتیب با افزودن مقادیر 0، 10.8، 16.2 و 20.6 گرم از ماده PEG در هر لیتر از محیط کشت YMB مطابق فرمول زیر ایجاد شده است (سالاردینی، ۱۳۶۶).

$$Water\ potential\ (wp) = -(1018e-2)c - (1.18e-4)c^8 2 + (2.67e-4)ct + (8.39e-7)c^8 2T$$

(Burlyn E. Michel & Merrill R. Kaufmann (1973)

(T= دمای کلوین، c= غلظت پلی اتیلن گلیکول، t = دمای محیط، e =ضریب ثابت، *wp*= پتانسیل آبی)

محیط کشت حاوی PEG+YMB در ظروف 100ml توزیع و سپس درون اتوکلاو استریل شد. آن‌گاه پس از تلقیح در شرایط استریل با سویه مورد نظر به‌مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر دورانی در دمای $۲۹^{o}C$ قرار گرفتند. پس از این مدت در هر نمونه مقدار دانسیته نوری (OD) در طول موج ۵۷۰^{nm} قرائت گردید. بدیهی است افزایش مقادیر PEG موجب افزایش پتانسیل آبی و کاهش رشد باکتری شده و لذا مقدار OD اندازه‌گیری شده کم‌تر خواهد بود. نتایج حاصله در نرم افزار Excell جمع‌آوری و اقدام به تهیه میانگین و گروه-بندی شدند. درجه‌بندی سویه‌ها به کاملا محتمل، متحمل، حساس و کاملا حساس بر اساس میزان OD آن‌ها در محیط کشت PEG+YM در پتانسیل آبی ۱۵- بار می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: میزان تحمل به خشکی سویه‌های ریزوبیومی
Drought Tolerance of Rizobial Isolates

OD	Drought Tolerance
O.D <0.3	Compeletly Sensitive
O.D = 0.3-0.4	Sensitive
O.D = 0.4-0.5	Tolerant
O.D > 0.5	Compeletly Tolerant

نمونه‌برداری از خاک تحت کشت مزارع گیاه عدس در دشت مغان و دشت کوهین هم‌زمان با تهیه نمونه‌های گیاهی انجام پذیرفت. نمونه‌برداری از خاک یک محل بدین-صورت بود که در هر منطقه از کشت‌زارها اقدام به برداشت یک نمونه مرکب خاک که نماینده خاک آن منطقه باشد، گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و مقدار EC و pH هر نمونه خاک اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول شماره ۲ منعکس می‌باشد.

جدول۲: میزان EC و pH خاک نمونه‌برداری شده از دشت‌های مغان و کوهین
Ec and pH of sampled soils from Moghan and Koohin Plain

Soil No.	Sampling Site	EC(dS/m)	pH	Soil No.	Sampling Site	EC(dS/m)	pH
12	Koohin Plain	2.8	7.5	1	Moghan Plain	1.1	8.1
13	Koohin Plain	2.3	7.2	2	Moghan Plain	2.3	7.9
14	Koohin Plain	2	7.6	3	Moghan Plain	1.1	7.6
15	Koohin Plain	3.9	7.4	4	Moghan Plain	1.3	7.8
16	Koohin Plain	2.5	7.5	5	Moghan Plain	1.3	7.4
17	Koohin Plain	2.6	7.7	6	Moghan Plain	1.2	7.5
18	Koohin Plain	2.4	7.7	7	Moghan Plain	2	8
19	Koohin Plain	2.3	7.2	8	Moghan Plain	2.5	7.6
20	Koohin Plain	2.5	7.5	9	Moghan Plain	1.4	7.2
21	Koohin Plain	3.6	7.2	10	Moghan Plain	1.2	7.1
22	Koohin Plain	3.2	7.5	11	Moghan Plain	1.4	7.5
		Average	Average			Average	Average
		2.74	7.45			1.53	7.61

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

تعداد نمونه‌های گیاهی برداشت شده از دیم‌زارهای عدس دشت مغان در استان اردبیل و نیز دیم‌زارهای عدس موجود در استان های قزوین-زنجان (دشت کوهین) برابر یکدیگر و جمعا معادل ۲۲۰ نمونه بود. از تعداد کل نمونه‌های برداشت شده (گره‌های ریشه‌ای عدس)، به جز ۶ نمونه، تعداد ۲۱۴ جدایه باکتری از روی محیط‌های کشت YMA+ کنگورد و نیز BTB+YMA جداسازی شد، کلنی‌های جدا شده از محیط کشت YMA+ کنگورد به‌صورت بی‌رنگ، لعابی، لزج با قطر mm ۵-۳ شامل باکتری‌های میله‌ای شکل گرم منفی بود که در مقابل کلنی‌های با رنگ قرمز ناشی از کاربرد رنگ کنگورد می‌باشد به‌علاوه این‌که کلنی‌های جدا شده رنگ محیط کشت BTB+YMA را به زرد تبدیل کرده بودند. طی عمل باز کشت‌های متوالی جدایه‌های باکتری بر روی محیط کشت YMA از خالص‌سازی جدایه‌ها اطمینان کافی حاصل شد. جدایه‌های خالص شده به‌طور هم‌زمان به دو شکل متفاوت تهیه و نگهداری شدند، یکسری درون لوله‌های آزمایش در پیچدار به‌صورت اوریب[1] حاوی محیط کشت YMA درون یخچال در دمای ۵°C-۲ و سری دیگر جدایه‌ها که در محیط کشت YMA+ گلیسرول (۳۰٪) درون فریزر در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند.

آزمون توان آلوده‌سازی گیاه[2] (PIT) که درون لوله-های آزمایش حاوی محیط کشت مناسب لگوم‌های ریز دانه به مدت ۶۰ روز درون گلخانه انجام شد نیز نشان‌داد که از بین ۲۱۴ جدایه باکتری مورد آزمون تنها تعداد ۲۵ جدایه از جنس و گونه *Rhizobium leguminosarum* b.v. (*Rlv*) *viciea* (Lenti) نبودند. انجام این آزمون به منظور اطمینان نهایی از باکتری ریزوبیومی هم‌زیست یک گیاه لگوم خاص می‌باشد. نتیجه حاصله نشان می‌دهد که مراحل جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریشه‌ایی می‌تواند با دقت بالایی انجام شود تا نتایج بعدی رضایت بخش باشد.

نتایج آزمون تعیین میزان تحمل به شوری جدایه‌های ریزوبیومی نشان داد که از بین ۱۸۹ سویه ریزوبیومی هم-زیست گیاه عدس (*Rlv*) تعداد سویه‌های رشد یافته در سطوح مختلف شوری به‌صورت: ۱- EC=۱۰ dS/m برابر ۱۰۱ سویه معادل ۵۳/۴۴٪ به‌عنوان کاملا حساس، ۲- EC=۲۰ dS/m برابر ۹۳ سویه معادل ۴۹/۲۱٪ به‌عنوان حساس، ۳- EC=۳۰ dS/m برابر ۷۱ سویه معادل ۳۷/۵۷٪ به‌عنوان نسبتا مقاوم، ۴- EC=۴۰ d/Sm برابر ۳۵ سویه معادل ۱۸/۵۲٪ به‌عنوان مقاوم، ۵- EC=۵۰ dS/m برابر ۳۵ سویه معادل ۱۸/۵۲٪ به‌عنوان کاملا مقاوم بودند، (جدول شماره ۲). از بین سویه‌های رشد یافته در شوری برابر ۵۰ dS/m تعداد ۲۵ سویه علی‌رغم اینکه رنگ محیط کشت خود را از آبی به زرد تبدیل کرده بودند ولی دارای رشد قوی؛ لعابی و لزج بر روی سطوح محیط کشت درون ظروف پتری نبودند که به‌عنوان سویه‌های کاملا متحمل دسته‌بندی شدند. تعداد ۱۰ سویه ریزوبیومی (۵/۲۹٪) دارای رشد بسیار خوب و کلنی‌های رشد یافته به‌صورت لعابی و لزج با قطر حدود mm ۵-۳ بودند که به‌عنوان سوپر استرین‌های (سویه) فوق-العاده متحمل به شوری دسته‌بندی گردید.

نتایج حاصله نشان‌داد که از جدایه‌های مربوط به دشت مغان در شوری ۱۰dS/m، از تعداد کل ۱۱۰ جدایه تنها ۴۶ جدایه (۴۱/۸۲٪) رشد کرده در صورتی که تعداد جدایه-های رشد یافته در همین شوری در دشت کوهین برابر ۵۵ جدایه (۵۰٪) بود.

بر اساس جدول شماره ۳ به‌ترتیب در شوری‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰و ۵۰ دسی‌زیمنس بر متر، تعداد جدایه‌های رشد یافته مربوط به دشت مغان برابر ۴۶ (۴۱,۸۲٪)؛ ۴۲ (۳۸/۲٪)، ۲۱ (۱۹/۱٪)، ۸ (۷/۳٪) و ۶ (۵/۵٪) جدایه در صورتی که تعداد جدایه‌های رشد یافته مربوط به دشت کوهین در شوری‌های ۱۰ و بیش‌تر به‌ترتیب معادل ۵۵ (۵۰٪)، ۵۱ (۴۶/۴٪)، ۵۰ (۴۵/۵٪)، ۲۷ (۲۴/۵٪) و ۲۹ (۲۶/۴٪) بود. از بین ۱۰ سویه سوپر استرین، تنها ۲ سویه مربوط به دشت مغان و ۸ سویه دیگر مربوط به دشت کوهین بود.

به‌طور کلی می‌توان گفت که در نمونه‌های برداشت شده از دشت کوهین فراوانی سویه‌های متحمل به شوری خصوصا در شوری‌های بالا (۳۰، ۴۰ و ۵۰ دسی‌زیمنس بر متر) بسیار بیش‌تر از جدایه‌های مربوط به دشت مغان است (جدول ۳).

گرچه شوری و نمک رشد و تکثیر باکتری‌های ریزوبیومی را محدود می‌سازد ولی سویه‌هایی از این باکتری وجود دارند که سطوح بالای نمک را به‌خوبی تحمل کرده و زنده می‌مانند (*لاکشمی و سوبارائو*، 1984؛ *وماچاندرا و گراگ*، 2008 و *زهران*، 2001) .

سوبارائو (1994) اختلاف بسیار زیادی را در میزان رشد سویه‌های مختلف ریزوبیومی کشت شده بر روی یک محیط کشت شور YMA مشاهده کرده است (*سوبارائو*، 1994

1. Slant
2. Plant Infection Test

Archive of SID
www.SID.ir

و *وماچاندرا* و *گراگ*، 2008) ولی در هر حال مقاومت باکتری-های ریزوبیومی در برابر شرایط شور به مراتب بیش‌تر از گیاهان میزبان آن‌ها می‌باشد (*حفیظ* و همکاران، 1998؛ *بهاروای*، 1985 و *اسپرنت*، 2000).

سوبارائو و همکاران (1999) نیز اعلام کرده‌اند که سویه‌های ریزوبیومی که قادر به ایجاد یک هم‌زیستی موثر در شوری‌های بالا بوده‌اند الزاما منشا یافته از خاک‌های شور نیست (*وماچاندرا* و *گراگ*، 2008). در مقابل، *دوکا* و همکاران (1998) گزارش دادند که ایزوله‌های نمونه‌برداری شده از اراضی خشک و شور برای ایجاد گره‌های ریشه‌ای در شرایط شور موفق‌ترند (*وارال* و *راگلی*، 1976).

پژوهش‌ها به‌خوبی نشان‌دادند که برخی از باکتری-های ریزوبیومی به‌صورت آزادزی (در شرایط ساپروفیتی) قادرند در شرایط استرس خشکی و یا پتانسیل آبی پایین به حیاط خود ادامه دهند.

یک سویه ریزوبیومی جدا شده از خاک‌های خشک قادر است شرایط خشک خاک را تا حدود یک ماه تحمل نموده و رشد نماید این در صورتی است که برخی سویه‌های تجاری قادر نیستند در این شرایط رشد نمایند (*زهران*، 2001).

یکی از علایم سریع تنش آبی بر باکتری‌های ریزوبیومی تغییرات مورفولوژیکی باکتری می‌باشد. یکی از سویه‌های جنس *ریزوبیوم* (*زهران*، 1999) و *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (*وارال* و *راگلی*، 1976) مورفولوژی غیرعادی از خود نشان دادند. تغییرات سلول‌های *ریزوبیومی* در نتیجه‌ی اثر تنش آبی در عاقبت منجر به کاهش آلودگی و گره‌زایی لگوم-ها می‌گردد (*وارال* و *راگلی*، 1976).

نتایج تعیین میزان تحمل باکتری‌های ریزوبیومی هم-زیست عدس به خشکی نشان-داد که از بین ۳۴ سویه کاملا متحمل و سوپر استرین‌های فوق‌العاده متحمل به شوری انتخاب شده از آزمون تعیین میزان تحمل به شوری، تعداد ۶ (۱۷/۶۵٪) سویه ریزوبیومی کاملا حساس به خشکی می-باشند که تنها یکی از آن‌ها (ایزوله ۶۳) مربوط به دشت مغان و مابقی مربوط به دشت کوهین هستند. هم‌چنین تعداد ۸ سویه (۲۳/۵٪) در محدوده حساس قرار دارند که ایزوله‌های ۱۷، ۲۳ و ۲۹ جمعا ۳ ایزوله (۸/۸۲٪) مربوط به دشت مغان و مابقی (۵ سویه ۱۴/۷٪) مربوط به دشت کوهین می‌باشند باکتری‌های متحمل به خشکی شامل ۱۵ ایزوله می‌باشد که ۲۴، ۵۸، ۶۹ و ۷۰ (۴ جدایه ۱۱/۷۶٪) مربوط به دشت مغان و مابقی ۱۱ سویه ریزوبیومی (۳۲/۳۵٪) سویه‌های مربوط به دشت کوهین و در نهایت از بین ۵ سویه (۱۴/۷٪) کاملا متحمل به خشکی بودند که فقط ایزوله ۶۴ (۲/۹۴٪) مربوط به دشت مغان و مابقی ۴ سویه (۱۱/۷۶٪) متعلق به دشت کوهین هستند که در جدول شماره ۴ و ۵ منعکس می‌باشد.

خشکی یکی از فاکتورهای محیطی است که اغلب محصولات را تحت تاثیر خود قرار داده و موجب کاهش عملکرد می‌شود (*وماچاندرا* و *گراگ*، 2008). در شرایط خشک با کاهش رطوبت از جمعیت باکتری‌های خاک‌زی کاسته می-شود ولی هیچ‌گاه این جمعیت به صفر نمی‌رسد لذا برخی از سویه‌های باکتری‌های خاک‌زی شرایط فوق‌العاده خشک را تحمل می‌کنند. این باکتری‌ها از آب نگاه‌داری شده منافذ ریز خاک بهره‌مند شده، زنده مانده و با حداقل فعالیت‌های متابولیکی به حیات خود ادامه می‌دهند (*زهران*، 2001).

جدول۳: فراوانی سویه‌های ریزوبیومی رشد یافته در سطوح مختلف شوری

Rizobial Isolates ferquency grown in different salinity levels

Salinity tolerancy of *Rizobium leguminosarum* b.v. *Viciea Lentile* Symbiosis	different salinity levels EC (dSm^{-1})	ferquency grown of Rizobial Isolates ferquency	%
Compeletly sensitive	10	101	53.44
sensitive	20	93	49.21
Relatively tolerant	30	71	37.57
Tolerant	40	35	18.52
Compeletly tolerant	50	35	18.52
Extrimly salinity tolerant super strains	50	10	5.29

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۴: فراوانی سویه‌های ریزوبیومی مربوط به دشت‌های مغان و کوهین در شوری‌های مختلف
Ferquency Rizobial Isolates indifferent salinity levels in relation to Koohin and Moghan Plain

Salinity tolerancy of *Rizobium leguminosarum* b.v. *Viciea Lentile* Symbiosis	different salinity levels EC (dSm^{-1})	ferquency grown of Rizobial Isolates			
		Koohin Plain		Moghan Plain	
		ferquency	%	ferquency	%
Compeletly sensitive	10	55	50	46	41.82
Sensitive	20	51	46.4	42	38.2
Relatively tolerant	30	50	45.5	21	19.1
Tolerant	40	27	24.5	8	7.3
Compeletly tolerant	50	29	26.4	6	5.5
Extrimly salinity tolerant super strains	50	8	7.3	2	1.8

جدول ۵: میزان تحمل به خشکی سویه‌های ریزوبیومی هم‌زیست گیاه عدس
Drought tolerancy of Rizobial-Lemtile Symbiosis Isolates

میزان O.D	Drought tolerancy	ferquency
O.D <0.3	Compeletly sensitive	6
O.D = 0.3-0.4	Sensitive	8
O.D = 0.4-0.5	Resistance	15
OD > 0.5	Compeletly resistance	5

جدول ۶: فراوانی سویه‌های ریزوبیومی در سطوح مختلف شوری
Ferquency Rizobial Isolates indifferent salinity levels

O.D	ferquency			
	Moghan Plain		Koohin Plain	
	ferquency	%	ferquency	%
O.D> 0.5	1	2.94	5	14.7
O.D = 0.3-0.4	3	8.83	5	14.7
O.D = 0.4-0.5	4	11.76	11	32.35
O.D < 0.3	1	2.94	4	11.76

حمایت و زندگی یک سویه‌ی برادی ریزوبیوم در خاک‌های لوم شنی بسیار ضعیف بود این سویه توانایی ادامه حیات تا کشت بعدی را نداشت لذا حیات و فعالیت ریزموجودات ممکن است تابع نحوه‌ی توزیع باکتری‌ها در درون مکان‌های میکروسکوپی خاک و تغییرات رطوبت خاک قرار بگیرد. فراوانی باکتری‌های جنس *ریزوبیوم لگومینوزارم* در خاک‌های شن لومی و لوم سیلتی متاثر از میزان رطوبت اولیه‌ی خاک می‌باشد. رطوبت‌های متوسط موجب کاهش حرکت باکتری *ریزوبیوم تریفولی* شد. حرکت باکتری‌ها زمانی که حفرات خاک در نتیجه استرس آبی خالی می‌باشد کند می شود (*ورال* و *راگلی*، 1976).

در نهایت نتایج جدول ۳ و ۵ در درجه اول نشان می‌دهند که در خاک‌های تحت دیم‌زارهای ایران سوپر استرین‌های ریزوبیومی فوق‌العاده متحمل به شوری و هم‌چنین سویه‌های ریزوبیومی کاملا مقاوم به خشکی (با قدرت رشد در پتانسیل آبی ۱۵- بار) را می‌توان جداسازی و خالص سازی کرد. به‌علاوه این که سویه‌های ریزوبیومی جدا شده از دشت مغان همان‌طور که مقاومت اندکی به شوری نشان دادند و

www.SID.ir

اکثرا در گروه‌های کاملا حساس (۴۶ ایزوله) و حساس (۴۲ ایزوله) قرار گرفتند در آزمون میزان مقاومت به خشکی نیز توان بالایی از خود نشان ندادند و در تمامی گروه‌های کاملا حساس تا کاملا متحمل تعداد این سویه‌ها کم‌تر از سویه‌های دشت کوهین می‌باشد این موضوع می‌تواند ثابت کند که تحمل به خشکی با تحمل به شوری باکتری‌های ریزوبیومی تقریبا در یک راستا می‌باشد. هم‌چنین ثابت شد که سویه‌های باکتری حساس به شوری سطوح بالای خشکی را نیز تحمل نمی‌کند و به‌طور کلی پدیده‌های شوری و خشکی به نوعی با یکدیگر مرتبط می‌باشند (*زهران*، 2001). امید است با انجام پژوهش‌های تکمیلی بتوان سویه‌های برتر و اختصاصی این محصول را به بخش صنعت جهت تولید انبوه کود بیولوژیک هم‌زیست عدس معرفی نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

سالار دینی علی اکبر ،۱۳۶۶، حاصل‌خیزی خاک- دانشگاه تهران.

علیخانی، حسینعلی و همکاران .۱۳۷۳. پایان-نامه کارشناسی ارشد. بررسی مشخصات سمبیوتیک نژادهای *ریزوبیوم ملیلوتی* بومی خاک‌هایی از ایران و مطالعه تغییرات آن در سطوح مختلف شوری، دانشگاه تهران.

Allen, S. G. Dobrenz, A. K, Schonhorst, M. H. and Stonr, G. E. 1995. Heritability of NaCl tolerance in germinating alfalfa seeds, AGRO. JOU, 77:99-101.

Bernstein, L. and Francois, L. E. 1983. Leaching requirement studies: Sensivity of alfalfa to salinity of irrigation and drainage water. Soil Soc. AM. PROC. 37: 931-943.

Bhardwaj, K. K. R, 1985. Survival and symbiotic characteristics of *Rhizobium* in saline alkaline soils. Plant and soil 43: 377-385.

Cordovilla, M. P., Francisco, L. and Carmen, L. 2001. Effects of salinity on growth, nodulation and nitrogen assimilation in nodules of Fababeans (*Vicia Faba* L.). Applied soil Ecology. 11-1-7.

Dioxon, R. O. D and Wheeler, C. T. 1995. Nitrogen fixation in plants. (Chapman and Hall).

Hafeez, Y. ASLAM, Z. and MALIK, K. A. 1998. Effect of salinity and inoculation growth, nitrogen fixation and nutrient uptake of Vigna Radiata (L.) Wilczek. Plant and soil. 106: 3-8.

Hanson, A. A.Barnes, D. K. and Hill, R. R. 1998. Alfalfa and alfalfa improvement (ASA).

Kfck, T. G., Wagenet, R. G., Campbell, W. F. and Knightonr, E. 1994. Effects of water and saline stress on growth and acetylene production in alfalfa, Soil. Sci. Soc. AM. J. 48: 1310-1316.

Lakshmi-Kumari, MS. and Subbarao ,N. S. 1984. Root hair infection and nodulation Lucerne as influenced by salinity and alkalinity .Plant and soil 40:261-268.

Lbernstein, and Ogata, 1976. Effects of salinity on nodulation, nitrogen fixation and growth of Soybeans and Alfalfa. Agro Jou. 58:201-203.

Materon, L. A. 2001. Symbiotic characteristic of *Rhizobium meliloti* in west Asian soil. Soil boil.biochem.23:5:429-434.

Mass, E. V. 1996. salt tolerance of plant U.S Salinity laboratory.USDA.

Pessaraki, M., Tucker, T. C. 2005. Ammonium (15N) metabolism in cotton under salt stress. J. Plant Nutr. 8.1025-1045.

Singleton, P. W. and Bohlool, B. 1994, Effects of salinity on nodule formation by Soybean, Plant physiol 74:72-76.

Sprent, J. and Sprent. P. 2000, Nitrogen fixing organisms. (Chapman and Hall).

Subbarao, N. S. 1998. Soil microorganisms and plant growth.

Subbarao, G. V., Johnseng, C., Kumarrao, J. V. D. K. J and, M. K. 1999. Response of the Pigeon pea *Rhizobium* symbiosis to salinity stress: variation among *Rhizobium* strain in symbiotic ability. Biol. and ferti.9:49-53.

Vincent, J. M. 1982. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. (Handbook NO.15),Academic Press INC., san diego California 92101.

Vmanchanda, I. and Garg. 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. J. Plant Physiology. 7-1-45.

Worrall, V. S. and Roughly, R. J. 1976. The effects of moisture stress on infection of *Trifolium subteerraneum L.* by *Rhizobium trifoli* Dang .J.Exp.Bot.27:1233-1241.

Zahran, H. H. 2001. Condition for successful *Rhizobium*-Legume symbiosis saline environment, Biol. Fertil. Soils.12:73-80.

Zahran, H. H. 1999. *Rhizobium*-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and molecular biology reviews.Vol:63.No.4.

Archive of SID

www.SID.ir

Assessing Tolerance of Rhizobial - Lentil Symbiosis Isolates to Salinity and Drought in Dry Land Farming Condition

Alikhani[1], H. A, and Mohammadi, L.

Abstract

In this research 220 rhizobial bacteria were isolated from two lentil dry land farming flat plains of Moghan and Koohin, and then they were tested in vivo and in vitro to assurance of 184 purified strains of *rhizobium leguminosarum* biovar *vicial* (lentil). BTB +YMA culture media with different levels of salinity by NaCl (10, 20 …50dS/m) was used in saline tolerance test of rhizobial lentil symbiosis strains. Among 184 rhizobial strains, 101 strains were completely sensitive (EC=10 dS/m) and 25 strains were very tolerant and 10 strains were super strains which were completely tolerant to salinity. The number of Koohin flat plain grown rhizobial strains in salinity levels of 10 to 50 was respectively 55, 51, 50, 27, 29 while for Moghan flat plain , these numbers were as 46,42, 21, 8 and 6. Altogether Koohin flat plain rhizobacteria were more high saline *tolerant* than Moghan flat plain rhizobacteria. Drought tolerance test of rhizobial strains was performed in PEG 6000 +YMA culture media. The drought level was evaluated based on optical density of bacterial suspension in this test. Drought tolerance of rhizobacteria were grouped in 4 levels of completely tolerant, tolerant, sensitive and completely sensitive by optical density of OD<0.3, OD=0.3-0.4 OD=0.4-0.5, OD>0.5, respectively. Among 10 super strains(very completely tolerant) which are thoroughly tolerant, 6 super strains of Moghan flat plain and 8 super strains of Koohin flat plain were selected. At last we hope that the super strains (salinity and drought) in this step of research can be used in later green house studies.

Key words: Drought, NaCl, PEG, *Rhizobium*, Salinity

Archive of SID

1. Associate Porfessor and Research Officer respectively in Soil Science Engineering Department., Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj.

∗: Corresponding author

www.SID.ir