Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

مقایسه محتوای رنگیزه‌ای و ویژگی‌های رشدی گیاه لوبیا (*Phasaeolus vulgaris* L.) تلقیح شده با ریزوباکترهای بومی استان کرمان

حکیمه علومی[۱*]، محمود ملکی[۲] و فاطمه رستمی[۳]

[۱]گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، [۲]گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. [۳]گروه زیست شناسی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۳/۲۸، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۸/۰۳)

چکیده

کمبود نیتروژن یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تولیدات گیاهی است. بنابراین شناسایی باکتری‌های همزیست بومی با قابلیت تثبیت نیروژن می‌تواند نقش مهمی در کشاورزی داشته باشد. در این پژوهش، برخی از ریزوباکتری‌های جداشده از گرهک تعدای از لگوم‌های کاشته شده در مزارع استان کرمان، جداسازی شد. توانایی ایزوله‌ها برای رشد در محیط فاقد نیتروژن مورد بررسی قرار گرفت. تعدا هشت ایزوله با بیشترین رشد در محیط برای مطالعات بعدی مورد استفاده قرار گرفت و سایر ایزوله‌ها حذف شدند. قابلیت تولید آمونیوم ایزوله‌های انتخاب شده در شرایط درزیوه (*in vivo*) بررسی گردید. اثر ایزوله‌ها همچنین روی ویژگی‌های رشدی و گرهک‌زایی گیاهان لوبیا در شرایط گلخانه‌ای با ده سطح تیماری (به همراه سطوح عدم مصرف و مصرف نیتروژن معدنی) مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد تمام ایزوله‌ها بطور کاملا معنی‌داری ($P<0.01$) ویژگی‌های رشدی گیاهان را درمقایسه با شاهدی که نیتروژن دریافت نکرده، بهبود بخشید. کلروفیل a نیز در حضور تلقیح باکتریایی افزایش یافت که معادل کاربرد نیتروژن معدنی بود و محتوای کلروفیل کل نیز در رتبه بعد از مصرف نیتروژن معدنی بود. ایزوله‌های MPV2 و GMS که بیشترین میزان گرهک‌زایی را در ریشه نشان دادند، قابلیت بیشتری در بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه شامل ارتفاع و محتوای آب گیاه نشان دادند. ایزوله‌های MCA و GMS بیشترین مقدار نیتروژن در گیاه را در مقایسه با سایر گروه‌های تلقیح شده باعث شدند. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گرفت که ایزوله‌های MPV2، GMS و MCA که به ترتیب از گرهک ریشه گیاهان *Phaseulus vulgaris*، *Medicago sativa* و *Cicer arietinum* استخراج شدند، انتخاب مناسبی بعنوان کودزیستی تثبیت کننده نیتروژن برای بهبود رشد گیاه لوبیا می‌باشند. هرچند قابلیت این ایزوله‌ها در شرایط مزرعه‌ای باید مورد بررسی قرار گیرد.

واژگان کلیدی: ریزوباکتری، گیاهان لگوم، ویژگی رشدی، تثبیت نیتروژن، گرهک‌زایی

مقدمه

جایگزینی کودهای شیمیایی با کودهای زیستی یک شیوه مهم در حفظ کشاورزی پایدار است (de Souza *et al.*, 2015). نیتروژن عنصر پرمصرف در گیاهان بوده که بطور قابل توجهی می‌تواند منجر به محدودیت در رشد و تولید گیاهان لگوم و غیر لگوم گردد (Flores-Félix *et al.*, 2013). تثبیت نیتروژن درگیاهان شامل تبدیل نیتروژن موجود در اتمسفر به آمونیوم می باشد. این واکنش به وسیلهٔ میکروارگانیسم‌های پروکاریوت

*نویسنده مسؤل، نشانی پست الکترونیکی: oloumi.ha@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

و با استفاده ازآنزیم نیتروژناز صورت می گیرد. سویه‌های جنس *Rhizobium* و *Bradyrhizobium* مهمترین و برترین نوع باکتری بوده که با تشکیل گره روی ریشه گیاهان بویژه لگوم‌ها به تثبیت نیتروژن کمک می‌نمایند. میزان تثبیت سالانهٔ نیتروژن توسط این میکروارگانیسم ها با توجه به گیاه میزبان، نوع خاک و شرایط محیطی متفاوت بوده و بین تا ۳۰۰-۳۰ کیلوگرم درهکتار در هرسال تخمین زده شده است (Dixit and Appu Kuttan, 2015).

ریزوبیوم‌ها باکتری‌های خاکزی هستند که توان ایجاد گره وهمزیستی تثبیت کننده نیتروژن با گیاهان خانواده لگومینوز را دارا می‌باشند. نیتروژن تثبیت شده توسط این سیستم همزیستی می‌تواند به صورت کامل جایگزین کودهای شیمیایی نیتروژندار شده و یا بخشی از نیاز گیاه را فراهم نماید و سبب پایداری تولید در کشت گیاهان لگوم گردد (Dixit and Appu Kuttan, 2015). مطالعات نشان داده است که باکتری های محرک رشد ریشه‌ای (ریزوباکتری‌ها) و ریزوبیوم ها با تاثیر بر ویژگی های فیزیولوژیکی و افزایش مقاومت آنتی اکسیداتیو قادر به بهبود رشد گیاهان و نیز ایجاد مقاومت گیاهان به تنش ها می‌باشند (Yang *et al.*, 2009).

مطالعات نشان داده است که قابلیت تثبیت نیتروژن مولکولی در لگوم‌ها علاوه بر فاکتورهای محیطی متاثر از عواملی مانند نژاد باکتری و رقم گیاهی قرار دارد. انتخاب باکتری مناسب، برای هر گیاه، سیستم همزیستی بالاترین کارائی را از نظر تثبیت نیتروژن خواهد داشت (Peoples *et al.*, 1995). شناسایی ریزوباکترهای همزیست و بومی مناطق می‌تواند در جداسازی و انتخاب بهترین ریزوبیوم های کارآمد مؤثر بوده و سبب افزایش کارایی مایه تلقیح‌های تولیدی برای هر گیاه گردد. تولید مایه تلقیح ریزوبیومی نیازمند در اختیار داشتن باکتری‌های مؤثر و شناخته شده می‌باشد. نصراصفهانی و همکاران (۲۰۱۳) درمقایسه تثبیت زیستی نیتروژن در سویه های مختلف *Mesorhizobium ciceri* در گیاه نخود نشان دادند که در حداقل یک تیمار ریزوبیومی بومی وجود دارد که نه تنها می تواند جایگزین کود ازته گردد بلکه حتی گاهی افزایش محصولی بیشتر از کود ازته نیز دارد (Nasr Esfahani *et al.*, 2014). یادگاری و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی اثرسویه های باکتری بر عملکرد و خصوصیات کیفی لوبیا گزارش نمودند که سویه برتر معرفی شده درشرایط مزرعه ای باعث افزایش ۸۷درصد عملکرد دانه و افزایش پروتئین دانه گردید (Yadegari *et al.*, 2008). در بادام زمینی اثبات شده است که میزان تثبیت نیتروژن همبستگی مثبت و معنی داری با صفات گره (وزن، قطر و تعداد گره) داشته و این صفات می‌تواند به عنوان یک معیارغیر مستقیم برای میزان تثبیت نیتروژن در نظرگرفته شوند. گزارش شده است که برخی از سویه های باکتری های تثبیت کننده نیتروژن با وجود تولید گره های بیشتر و با وزن زیادتر، از میزان تثبیت نیتروژن پایینی برخوردارند و این موضوع را به کارایی نسبی پایین گره ها نسبت دادند. بنابراین تعداد و وزن گره ها معیار مناسبی برای ارزیابی کارایی سویه گره ها نیست و فقط برای تعیین توان گره زایی آنها است. در مقابل وزن اندام هوایی معیارمناسب تری برای میزان تثبیت نیتروژن به شمارمی‌رود (Herridge *et al.*, 2008).

لوبیا از مهمترین گیاهان زراعی خانواده بقولات است که در دنیای جدید یکی از منابع مهم پروتئینی و کالری در تغذیه انسان محسوب می شود. این لگوم ۵۰ درصد حبوبات مورد استفاده در جهان را به خود اختصاص داده است. دانه لوبیا دارای ۲۵-۲۰ درصد پروتئین و ٥٦-۵۰ درصد هیدرات کربن می باشد بطوریکه در مقایسه با غلات ۲ تا ۳ برابر و نسبت به گیاهان نشاسته‌ای ۱۰ تا ۲۰ برابر دانه آن دارای پروتئین بیشتری است (Broughton *et al.*, 2003).

نظر به اهمیت مطالعه و شناسایی گونه های بومی تثبیت کننده نیتروژن هر منطقه در بهبود عملکرد گیاهان زراعی و اینکه مطالعات محدودی روی تاثیر ریزوباکترهای بومی استان کرمان بر رشد لوبیا صورت گرفته است، این بررسی با هدف اصلی شناسایی و معرفی بهترین سویه‌های بومی تثبیت کننده نیتروژن استان کرمان برای لوبیا انجام گرفت. در این بررسی

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

ویژگی‌های رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی بعنوان شاخصه رشد گیاه بررسی شد. همچنین برای شناسایی باکتری‌ها در حد جنس ریزوبیوم، قابلیت رشد باکتری‌ها در محیط فاقد نیتروژن و نیز توانایی تولید آمونیوم در محیط کشت بررسی شد. قابلیت گرهک‌زایی ایزوله‌ها در ریشه گیاهان لوبیا نیز مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری سویه های باکتریایی: در این پژوهش در مجموع ۲۱ نمونه ریشه حاوی گرهک در اواخر فروردین ماه ۱۳۹۵ از سطح مزارع لگوم استان کرمان شامل جوپار، گشیگان–راین و ماهان جمع آوری گردید. گیاهان لگوم میزبان ریزوباکتر شامل لوبیا، نخود، یونجه و شبدر بود.

جداسازی ریزوباکترها: جهت جداسازی سویه‌های باکتریایی، گرهک‌های سالم و صورتی رنگ جداشده از ریشه گیاهان به مدت پنج دقیقه در هود لامینار در هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ حاوی توین غوطه‌ور شد. گرهک‌ها پس از شست و شو با آب مقطر استریل، سه مرتبه هر بار به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار گرفتند. گرهک‌ها در۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل له شدند و بر روی محیط کشت جامد YM (Yeast Extract Mannitol Medium) به عنوان محیط کشت پایه بمدت ۲٤ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۰°C نگهداری شدند (Beattie and Handelsman, 1989). به منظور خالص سازی سویه‌ها، باکتری‌های رشد کرده، واکشت شده و برای انجام آزمایشات بعدی در دمای ٤°C نگهداری شدند. از بین سویه‌های جداشده ۸ سویه بهترین رشد را در شرایط آزمایشگاهی و محیط کشت ویژه ریزوبیوم نشان دادند. این سویه ها به ترتیب از گیاهان مناطق زیر جمع‌آوری گردید. نامگذاری سویه‌ها بر اساس حرف اول محل جمع‌آوری سویه و حروف اول اسم جنس و گونه میزبان انجام گرفت.

بررسی توان تولید آمونیوم توسط سویه‌های ریزوبیومی: توانایی ایزوله‌های باکتریایی در احیاء امونیاک در محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌ها به مدت ٤۸ ساعت در لوله‌های فالکون حاوی۱۰ میلی‌لیترآب پپتون و در دمای ۲۸°C در دستگاه شیکر- انکوباتور رشد کردند. پس از سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتری، نیم میلی‌لیتر معرف نسلر به مایع رویی هر لوله اضافه شد. پتاسیم تترایدومرکورات ترکیب غیرآلی است که به عنوان معرف نسلر شناخته می شود که برای تشخیص یون‌های آمونیوم در محلول به کار می‌رود (Cappuccino and Sherman, 1992). جذب رنگ زرد حاصل شده در طول موج ٤۲۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

آماده سازی سویه‌های ریزوبیومی و نمونه‌های گیاهی: جهت آماده سازی سویه‌ها برای مایه زنی ریشه گیاه، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع YM اتوکلاو گردید و پس از سرد شدن، نمونه باکتریایی به داخل آن مایه‌زنی گردید. محیط کشت‌های تلقیح شده به مدت ۲٤ ساعت در دستگاه شیکر- انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شد. پس از رشد باکتری‌ها، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و بر اساس فاکتور رقت و با استفاده از آب مقطر استریل، جمعیت باکتری ها در تمام سوسپانسیون‌ها تنظیم گردید تا تعداد یکسان سلول ریزوباکتر زنده برای هر یک از آزمایشات موردنظر فراهم گردد.

بذرهای لوبیا قرمز با نام علمی *P. vulgaris* L. از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران تهیه شد. بذرها پس از شست و شوی سطحی با محلول سدیم هیپوکلریت ۵٪ و آب مقطر استریل به ظروف پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب منتقل شده و در تاریکی قرار گرفتند. پس از گذشت سه روز از کاشت بذر جهت آلوده شدن ریشه‌چه، دانه‌رست‌ها به مدت یک ساعت در محلول حاوی سویه‌های ریزوبیومی جداشده قرار گرفته و سپس به گلدان‌های حاوی ماسه شسته و اتوکلاو شده انتقال یافتند.

گلدان‌ها با سه تکرار و هر گلدان با سه گیاه، به مدت ۲۷ روز در گلخانه با شرایط کنترل شده با دمای ۲۲°C/۲٦°C و دوره روشنایی ۸/۱٦ ساعت به ترتیب در روز و شب و رطوبت نسبی ٤۰–۵۰ درصد و میزان نور ۱۰۰۰۰ لوکس رشد کردند و

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

سه بار در هفته با محلول غذایی استریل بدون نیتروژن حاوی عناصر پرمصرف و کم مصرف، آبیاری شدند. در مجموع ۱۰ سطح تیماری در آزمایش وجود داشت.

در هفته دوم و سوم پس از کاشت، جهت تجدید مایه‌زنی باکتری‌ها در محیط ریزوسفر، محلول باکتری های مورد نظر با تعداد مساوی سلول که در مرحله رشد لگاریتمی بودند به محیط رشد ریشه اضافه شد. در این پژوهش دو گروه گلدان به عنوان شاهد کشت گردید که عاری از باکتری بودند. محلول غذایی گروه اول با نیتروژن (کنترل) و گروه دوم شاهد فاقد نیتروژن (NF) بود. برای تامین نیتروژن گروه کنترل، مقدار ۰/۸ میلی‌لیتر در لیتر نیترات پتاسیم به محلول غذایی اضافه گردید.

پس از برداشت، پارامترهای ریختی گرهک‌ها شامل وزن و تعداد گرهک‌ها در هر تکرار محاسبه گردید. جهت سنجش محتوای رنگیزه‌ای، برگ‌ها بلافاصله پس از چیده شدن در نیتروژن مایع فریز و در فریزر در دمای $-80\ ^{\circ}C$ نگهداری شد.

ویژگی‌های رشدی گیاه و محتوای نسبی آب برگ (RWC): طول ساقه و وزن تر و خشک اندام هوایی و زمینی گیاهان و همچنین وزن و تعداد گرهک‌ها در گروه‌های تیماری مختلف اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در فویل آلومینیومی درآون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. وزن خشک نمونه‌ها با ترازوی Sartorious مدل BP211 با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و بر حسب گرم بر گیاه گزارش گردید.

برای محاسبه درصد نسبی آب بافت، وزن تر اندام هوایی گیاهان اندازه‌گیری گردید. نمونه ها به مدت ۵ ساعت در آب دیونیز قرار گرفته و و وزن حالت تورگور آن ها نیز اندازه گیری گردید. سپس نمونه ها به مدت ۷۲ ساعت درآون در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در فویل آلومینیومی خشک شدند. وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و RWC با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (Türkan *et al.*, 2005):

$$RWC\ (\%) = \frac{\text{وزن خشک} - \text{وزن تر}}{\text{وزن خشک} - \text{وزن اشباع شده}} \times ۱۰۰$$

رنگیزه های فتوسنتزی: برای سنجش مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی شامل کلروفیل a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئیدها (کاروتنوئید و گزانتوفیل) با استفاده از روش (Lichtenthaler, 1987)، مقدار جذب در طول موج های ٦٤٦/٨، ٦٦٣/٢٠ و ٤٧٠ نانومتر مقدار ۰/۲ گرم از برگ عصاره گیری‌شده در ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده و غلظت رنگیزه‌ها بر حسب میکروگرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

$$Chla = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$$
$$Chlb = 21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$$
$$Total\ Chl = chla + chlb$$
$$Carotenids = (1000A_{470} - 1.8\ chla - 85.02\ chlb)/198$$

رابطه ۳-۲

محتوای فلاونوئیدهای کل: محتوای فلاونوئید بر اساس روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید انجام شد (Toor and Savage, 2005). ۰/۱ بافت برگ گیاه در ۱۰ میلی لیتر متانول عصاره گیری و ۰/۵ میلی‌لیتر از آن با آب مقطر به حجم ۵ میلی لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۰/۳ میلی لیتر $NaNO_2$ ۵ درصد و پس از ۵ دقیقه، ۰/٦ میلی لیتر $AlCl_3$ ۱۰درصد اضافه گردید. در نهایت ۲ میلی لیتر NaOH ۱ مولار و ۲ میلی لیتر آب مقطر اضافه و شدت جذب در طول موج ۵۱۰ نانومتر اندازه گیری شد. غلظت نمونه ها با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین به دست آمد.

محتوای آنتوسیانین‌ها: مقدار ۰/۱گرم برگ خشک در ده میلی لیتر متانول اسیدی (الکل متیلیک ۹۹/۵ درصد و کلریدریک اسید خالص به نسبت ۹۹ به ۱) همگون گردید. عصاره حاصل پس از ٢٤ ساعت در تاریکی و در دمای آزمایشگاه، به مدت ۱۰ دقیقه در g × ٤٠٠٠ سانتریفیوژ گردید. شدت جذب ۳ میلی‌لیتر از محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط اسپکتوفتومتر UV-Visble خوانده شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین‌ها از ضریب خاموشی معادل mM^{-1} ٣٣٠٠٠ Cm^{-1} و فرمول $A=\varepsilon bc$ استفاده گردید (Wagner, 1979).

سنجش نیتروژن: برای سنجش فسفر و نیتروژن کل، به ترتیب خاکستر خشک و خاکستر مرطوب گیاهی استفاده شد. سنجش نیتروژن کل به روش خاکستر مرطوب (قراردادن ماده خشک گیاهی در اسید پرکلریک ٧٦ درصد)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

انجام شد (Thomas *et al.*, 1967). یک گرم از نمونه های گیاهی خشک شده در معرض ۲۵ میلی لیتر اسید پرکلریک ۷٦ درصد و با کمک حرارت هضم شد. حجم محلول‌ها با آب دوبار تقطیر به ۵۰ میلی لیتر رسید. به ۰/۱میلی لیتر از محلول حاصل ۲ میلی لیتر سیترات سدیم- سود، ۰/۸ میلی لیتر فنل در الکل و ٦/ ۱ میلی لیتر هیپوکلریت سدیم افزوده شد. حجم نهایی محلول با آب دوبار تقطیر به ۱۰ میلی لیتر رسید. شدت جذب هر محلول به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ٦۲۵ نانومتر اندازه گیری شد. با کمک منحنی حاصل از جذب محلول استاندارد سولفات آمونیوم غلظت نیتروژن کل برگ‌ها سنجش گردید.

سنجش فسفر: سنجش فسفر به روش خاکستر خشک (قرار دادن ماده خشک گیاهی به مدت ٦ ساعت در حرارت ۵۵۰ درجه سانتیگراد کوره الکتریکی) انجام شد (Thomas *et al.*, 1967). به خاکستر نمونه های گیاهی، یک میلی لیتر معرف بارتن و نیم میلی لیتر اسید پرکلریک ۷۰ درصد افزوده و حجم نمونه با آب دوبار تقطیر به ۱۰ میلی لیتر رسید. به ۲میلی لیتر هر نمونه دوباره یک میلی لیتر معرف بارتن افزوده شد. حجم نهایی با آب دوبار تقطیر به ۱۰ میلی لیتر رسید. مقدار جذب هر محلول به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ٤۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. با کمک منحنی حاصل از شدت جذب محلول استاندارد دی هیدروژن فسفات پتاسیم غلظت فسفر در نمونه‌های گیاهی سنجش شد.

بررسی‌های آماری: برای ارزیابی اثر ریزوبیوم روی صفات اندازه‌گیری شده گیاه لوبیا، داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS17، تحت آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) قرار گرفتند و میانگین داده‌ها با آزمون دانکن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

نتایج

جداسازی سویه‌های ریزوباکتر بومی تثبیت کننده نیتروژن در کرمان: مناطق مختلف استان کرمان با استفاده از محیط کشت اختصاصی ریزوبیوم جداسازی شدند. ۸ سویه بهترین رشد را در محیط کشت و در آزمایشگاه نشان دادند که در ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند. در جداول و شکل‌ها، NF به گروه شاهد فاقد نیتروژن و control به گروه کنترل که با نیتروژن تیمار شده بودند اطلاق می‌گردد.جدایه‌های ریزوباکتری تثبیت کننده نیتروژن از کشت باکتری های بدست آمده از گرهک گیاهان لگوم جمع آوری شده از قابلیت تولید آمونیوم جدایه‌ها با استفاده از معرف نسلر مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۱ خلاصه شده است. بر اساس نتایج آزمون دانکن، سویه های غربال شده تفاوت معنی‌داری در تولید آمونیوم نشان دادند ($P<۰/۰۵$). سویه GMS و پس از آن جدایه JTR و MPV2 بیشترین قابلیت را تولید آمونیوم داشتند. ایزوله JCM کمترین آمونیوم را بر اساس معرف نسلر تولید کرد ($P<0.05$).

ویژگی‌های رشدی گیاه و محتوای نسبی آب برگ (RWC): نتایج حاصل از تجزیه واریانس ویژگی‌های ریختی و محتوای آب برگ گیاه لوبیا تلقیح شده با ایزوله‌های ریزوبیومی غربال شده از خاک‌های مزارع لگوم در مناطق مختلف استان کرمان در جدول ۱ آورده شده است. بر اساس نتایج، عامل جدایه با احتمال ۹۹٪ بر ویژگی‌های رشدی گیاه لوبیا شامل وزن تر و خشک ریشه و شاخه، ارتفاع گیاه، سطح برگ و محتوای آب برگ تاثیرگذار است.

چنانچه در شکل ۲ نشان داده شده است، بیشترین میزان وزن‌تر و خشک در ریشه و شاخه لوبیا در گیاه تحت شرایط کنترل تیمار شده با نیتروژن معدنی مشاهده شد. از بین ریزوباکترهای تثبیت کننده نیتروژن جدایه‌های MCA و MPV2 به ترتیب بیشترین مقدار وزن‌تر شاخه را باعث شدند. بیشترین مقدار وزن خشک ریشه و شاخه هم در گیاهان تیمار شده با ایزوله JCM مشاهده شد. کمترین میزان وزن تر ریشه و نیز وزن خشک ریشه و شاخه در گیاهان کنترل فاقد نیتروژن (NF) ثبت گردید ($P<0.05$).

شکل ۲- مقایسه میانگین وزن تر (a) و وزن خشک (b)

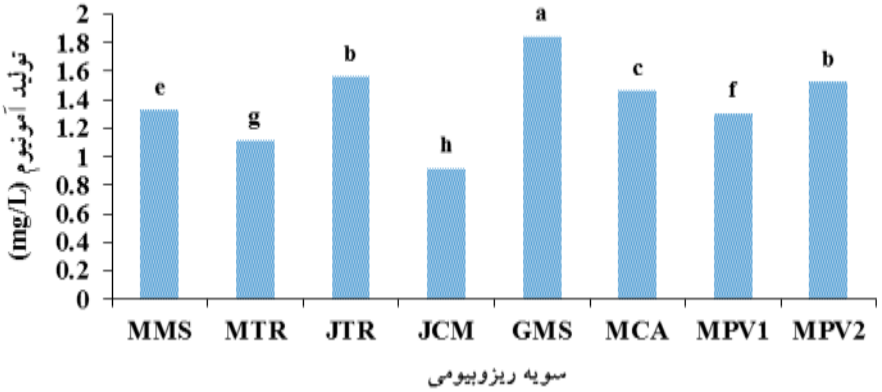
www.SID.ir

Archive of SID

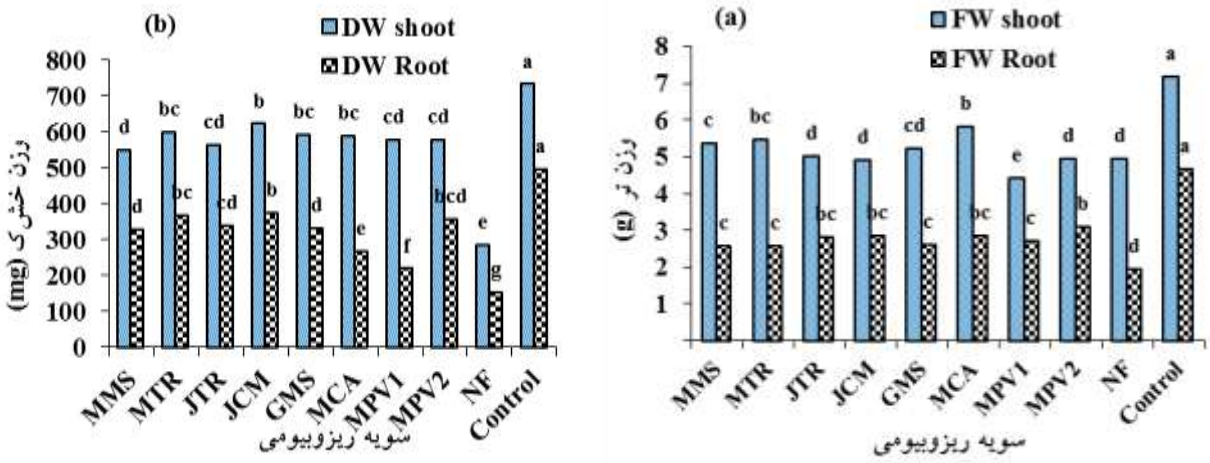
Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

جدول ۱- محل جمع‌آوری سویه‌های ریزوبیومی و گیاه منبع

ردیف	نام سویه ریزوبیومی	گیاه منبع سویه	محل کاشت گیاه
۱	MMS	*Medicago sativa* L.	ماهان
۲	MTR	*Trifolium resupinatum* L.	ماهان
۳	JTR	*Trifolium resupinatum* L.	جوپار
٤	JCM	*Cicer arietinum* L.	جوپار
٥	GMS	*Medicago sativa* L.	گشیگان راین
٦	MCA	*Cicer arietinum* L.	ماهان
۷	MPV1	*Phaseolus vulgaris* L.	ماهان
۸	MPV2	*Phaseolus vulgaris* L.	جاده جوپار-ماهان



شکل ۱- توان تولید آمونیوم در محیط کشت توسط ریزوباکترهای غربال شده. مقایسه میانگین ۳ تکرار توسط آزمون دانکن و در سطح معنی داری ۹۵٪ انجام گرفت. حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد.



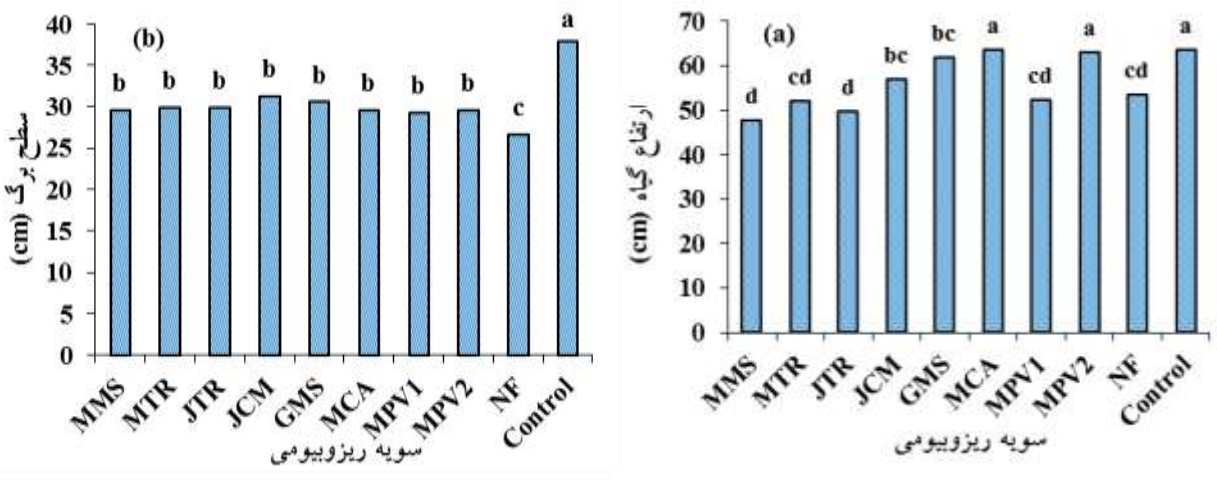
شکل ۲- مقایسه میانگین وزن تر (a) و وزن خشک (b) ریشه و شاخه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد ($P<0.05$). NF: گروه شاهد فاقد نیتروژن و control به گروه کنترل تیمارشده با نیتروژن.

ریشه و شاخه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد ($P<0.05$). NF: گروه شاهد فاقد نیتروژن و control به گروه کنترل تیمارشده با

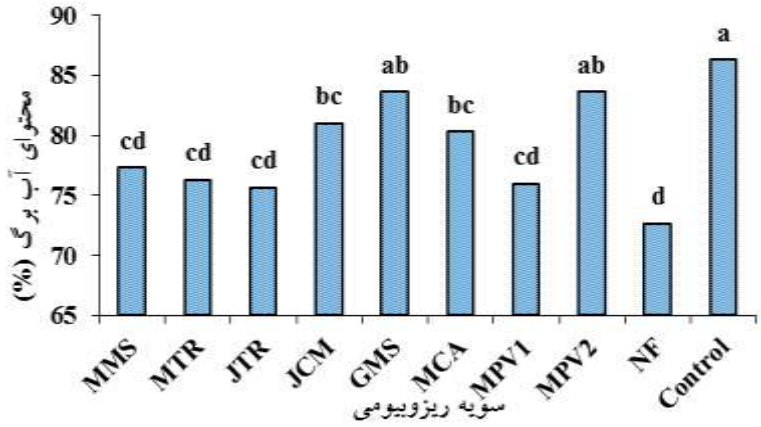
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019



شکل ۳- مقایسه میانگین ارتفاع (a) و سطح برگ (b) گیاه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد ($P<0.05$). NF: گروه شاهد فاقد نیتروژن و control به گروه کنترل تیمارشده با نیتروژن.



شکل ٤- مقایسه محتوای آب برگ گیاه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد ($p<0.05$).

نیتروژن.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین ارتفاع گیاه و سطح برگ بر اساس آزمون دانکن ($P<0.05$) به ترتیب در شکل ۳- a و ۳-b نشان داده شده است. گروه کنترل مشابه گروه مایه‌زنی شده با جدایه‌های MPV2 و MCA و پس از آن GMS بیشترین ارتفاع گیاه را در بین سایر گروه‌ها نشان داد. ریزوباکترهای MMS و JTR نیز کمترین رشد طولی گیاه را داشتند.

سطح برگی در گروه کنترل بیشترین میزان را داشت (۳-b). کمترین میزان نیز در گروه شاهد فاقد نیتروژن مشاهده شد ($P<0.05$). بین سطح برگ در سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

محتوای آب برگ بین گروه‌ها تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P<0.05$). بیشترین میزان محتوای آب برگ در گروه‌های کنترل، MPV2 و GMS مشاهده شد. گروه شاهد فاقد نیتروژن نیز کمترین میزان محتوای آب برگی را دارا بود (شکل ٤).

محتوای رنگیزه‌ای: نتایج حاصل از تجزیه واریانس رنگیزه‌های فتوسنتزی و فلاونوئیدها و آنتوسیانین گیاه لوبیا تلقیح شده با جدایه‌های غربال‌شده از خاک‌های کشاورزی در مناطق مختلف استان کرمان در جدول ۲ آورده شده است. ایزوله‌ها با اطمینان ۹۹٪ بر محتوای کلروفیل a، b، و کلروفیل

www.SID.ir

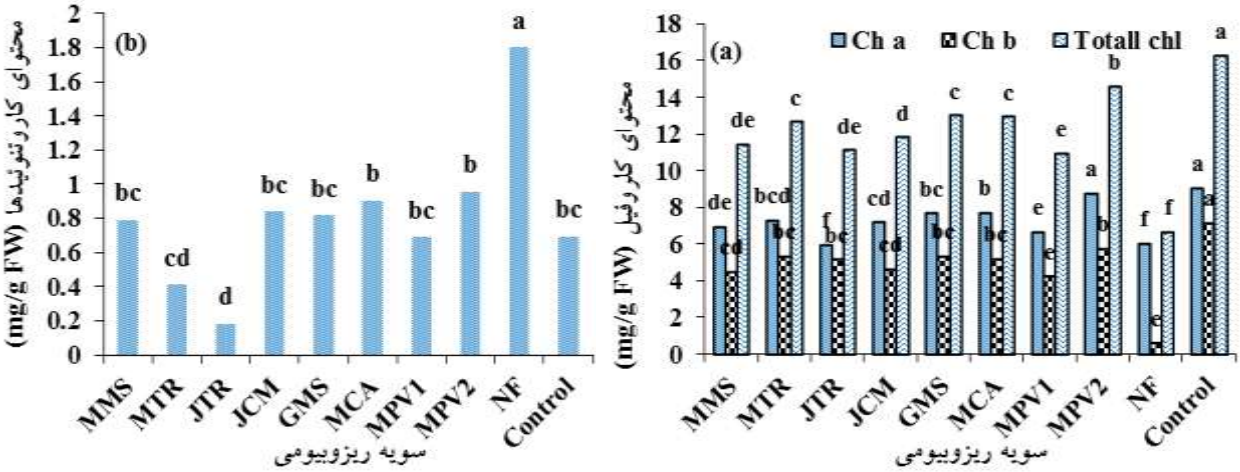
Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

جدول ۲- تجزیه واریانس محتوای رنگیزه‌ای گیاه لوبیا تحت تاثیر ریزوباکترهای تثبیت کننده نیتروژن

	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئیدها	فلاونوئیدکل	آنتوسیانین‌ها
		mg/g FW					mmol/g FW
تیمار	۹	۷/۳٤۳۲**	٤/۸۱۱۲**	۱۲/۱٥٤٤**	۰/۸۰۹۸**	۲٥۱/۰۲٤**	۰/۲۱۸۸**
ضریب تغییرات		۰/۱۸٥۹۰	۰/۳۰٤۷٥	۰/٤٤۸٦۷	۰/۰۸۳۲٦	۱۲/۹٥٥۱	۰/۰۰٤۲

اعداد شامل میانگین مربعات می‌باشد. ** نشان‌دهنده معنی داری در سطح ۰/۰۱ درصد می‌باشد.



شکل ٥- مقایسه محتوای کلروفیل (a) و کاروتنوئیدهای (b)گیاه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد ($p<0.05$). NF: گروه شاهد فاقد نیتروژن و control به گروه کنترل تیمارشده با نیتروژن.

کل، کاروتنوئیدها، فلاونوئید کل و آنتوسیانین‌ها اثر داشت.

گروه کنترل و گروه مایه‌زنی شده با ریزوباکتری جدایه MPV2 بیشترین محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل کل را نشان داد (شکل ٥-a). کمترین میزان این رنگیزه‌ها در گروه شاهد NF و در مقدار بالاتر در MPV1 وجود داشت.

مقدار رنگیزه کاروتنوئیدی بطور کاملا قابل توجهی در گروه شاهد NF بالاتر از سایر گروه‌ها بود. سویه MTR و JTR کمترین میزان محتوای کاروتنوئیدی را نشان داد. بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی داری مشاهده نشد ($P<0.05$).

محتوای فلاونوئیدی برگ گیاهان لوبیا در گروه کنترل و MPV2 نسبت به سایر گروه‌ها مقدار بیشتری داشت (شکل ٦-a). گروه شاهد NF کمترین میزان و پس آن گروه‌های مایه‌زنی شده با جدایه‌های JCM، JTR و MMS کمترین میزان فلاونوئیدکل را شامل شدند ($P<0.05$).

در شکل ٦-b نتایج مربوط به محتوای آنتوسیانین برگ گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های مختلف نشان داده شده است. گروه‌های کنترل، MPV2، و JTR بالاترین میزان محتوای آنتوسانین‌ها را داشتند و کمترین میزان این ترکیبات پس از شاهد NF در جدایه‌های MPV1 و GMS مشاهده شد ($P<0.05$).

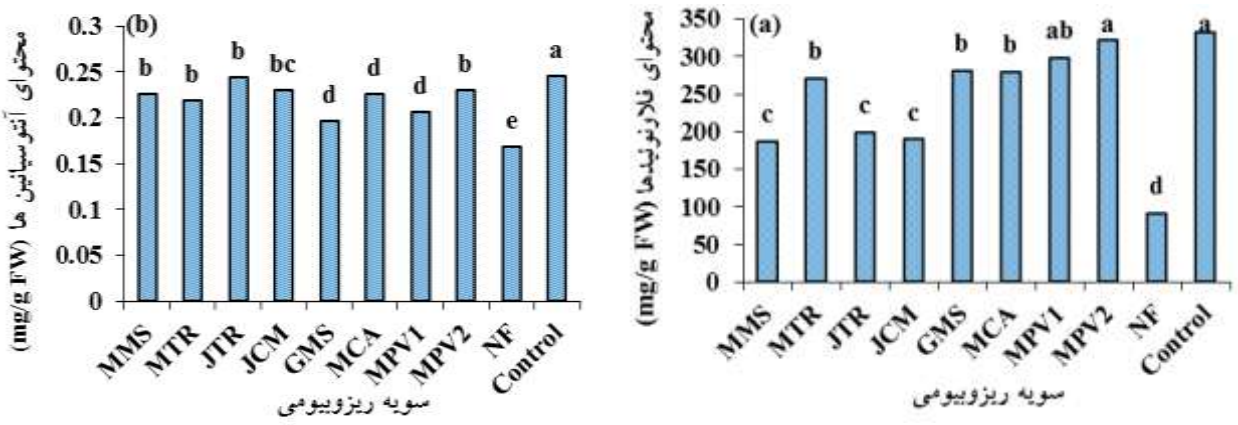
مقدار فسفر، نیتروژن و تشکیل گرهک: نتایج حاصل از تجزیه واریانس مقدار فسفر، نیتروژن و تشکیل گرهک در گیاه لوبیا تلقیح شده با جدایه‌های ریزوبیومی در جدول ۳ آورده شده است. بر اساس نتایج، جدایه‌ها بطور قابل توجهی بر میزان جذب فسفر، نیتروژن و تشکیل گرهک و وزن گرهک بطور معنی‌داری موثر است ($P<0.01$).

نتایج مربوط به میزان نیتروژن و فسفر در ریشه و شاخه گیاه لوبیا در شکل ۷ مشاهده می‌شود. مقدار نیتروژن و فسفر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

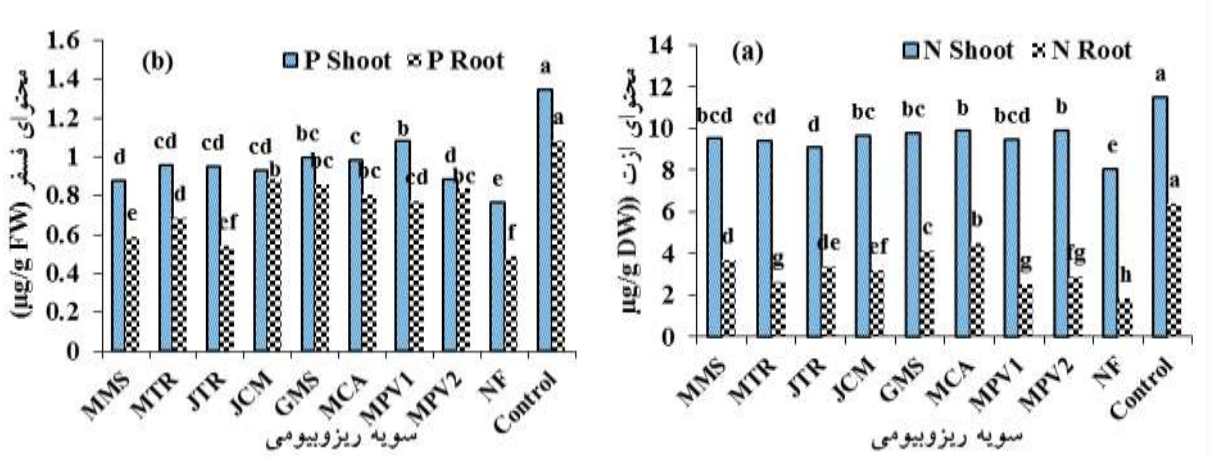


شکل ٦- مقایسه محتوای فلاونوئیدها (a) و آنتوسیانین (b) گیاه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد ($p<0.05$). NF: گروه شاهد فاقد نیتروژن و control به گروه کنترل تیمارشده با نیتروژن.

جدول ۳-تجزیه واریانس مقدار فسفر، نیتروژن و تشکیل گرهک گیاه لوبیا تحت تاثیر ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن

	درجه آزادی	نیتروژن شاخه	نیتروژن ریشه	فسفر شاخه	فسفر ریشه	تعداد گرهک	وزن گرهک
		mg/g DW				/Plant	g/plant
تیمار	۹	۹/٦۰٦۰**	۳/٥۲۰۳**	۰/۹۷٥۲**	۰/۷٥۲٤**	**٦۷/۱۰۳٤	۰/۷۷۲۱**
ضریب تغییرات		۰/۱٥٤۹٤	۰/۲۲٦٥۸	۰/۰۲۸۰۷	۰/۰۳۲۷٦	۷/۳۰۹۸۸	۰/۰۸۸۱٤

اعداد شامل میانگین مربعات می‌باشد. ** نشان‌دهنده معنی داری در سطح ۰/۰۱ درصد می‌باشد.



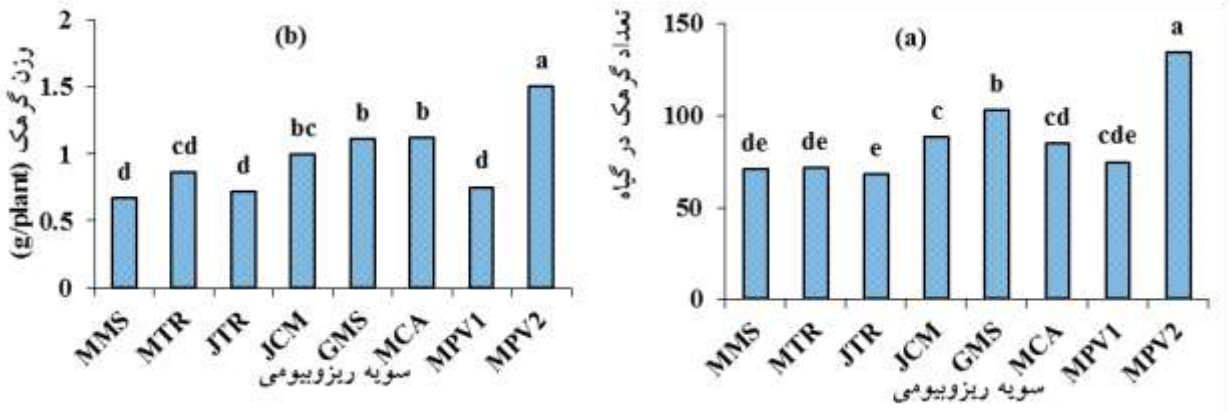
شکل ۷- مقایسه میانگین جذب نیتروژن (a) و فسفر (b) گیاه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد ($p<0.05$). NF: گروه شاهد فاقد نیتروژن و control به گروه کنترل تیمارشده با نیتروژن.

در شاخه و ریشه گروه کنترل، بیشترین و در شاخه گیاهان گروه NF کمترین میزان بود ($P<0.05$). بین مقدار نیتروژن شاخه سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. مقدار نیتروژن ریشه گروه تلقیح شده با جدیه MCA و GMS پس از کنترل بیشترین میزان نیتروژن کل را نشان داد (شکل ۷-a). تفاوت قابل توجهی در محتوای فسفر ریشه و شاخه سایر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019



شکل ۸- مقایسه میانگین تعداد گرهک (a) و وزن گرهک (b) در گیاه لوبیا تلقیح شده با ریزوباکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن. ستون‌ها شامل میانگین تکرارها می‌باشد. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم معنی‌داری می‌باشد (P<0.05).

گروه‌ها مشاهده نشد.

تشکیل گرهک: گروه کنترل و شاهد نیتروژن فاقد گرهک ریشه‌ای بود. از بین سویه‌های مورد مطالعه، جدایه MPV2 و پس از آن به ترتیب جدایه‌های GMS و JCM بالاترین تعداد گرهک در گیاه را ایجاد نمود. میانگین وزن گرهک در هر تکرار نیز در MPV2 و پس از آن در MCA، GMS و JCM بیشترین مقدار بود (شکل ۸-a و b). جدایه JTR کمترین تعداد تشکیل گرهک و سویه‌های PMV1، JTR و MMS کمترین وزن گرهک را در گیاه باعث شدند (P<0.05).

بحث

روش‌های درشیشه متنوعی برای انتخاب سویه‌های باکتریایی مناسب برای تشویق رشد در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Kifle and Laing, 2015). هرچند گاهی تطابق کاملی بین نتایج درشیشه و در زیوه مشاهده نمی‌شود، اما استفاده از این شیوه‌ها، راهی کارامد و ساده برای شناسایی ایزوله‌های مناسب در اختیار می‌گذارد (Khalid *et al.*, 2004). بنابراین استفاده ترکیبی از شیوه‌های درشیشه و درزیوه می‌تواند در شناسایی سویه‌های موثر پیشنهاد می‌شود. در این بررسی برخی جدایه‌های بومی ریشه گیاهان خانواده لگوم غربالگری گردید. بهترین ایزوله‌ها در محیط کشت ویژه ریزوبیوم انتخاب و در معرض ریشه گیاهچه لوبیا خالص سازی شد. ویژگی‌های رشدی و رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی گیاهان مایه‌زنی شده با سویه ها مورد بررسی قرار گرفت.

تولید آمونیوم در سویه‌های جداسازی شده توسط معرف نسلر در این پژوهش بررسی شد. در این روش در اثر تولید آمونیاک محیط کشت باکتری به رنگ زرد تا قهوه‌ای در می‌آید (Kifle and Laing, 2015). از بین جدایه‌های مورد بررسی سویه GMS بیشترین قابلیت را تولید آمونیوم داشتند. این ایزوله از گرهک‌های ریشه گیاه یونجه از منطقه راین کرمان جمع‌آوری گردیده بود. سویه‌های JTR و MPV2 که به ترتیب از ریشه گیاهان شبدر و لوبیا در مناطق جوپار و ماهان جمع‌آوری شدند، تولید آمونیوم بالاتری نسبت به سایر سویه‌ها نشان دادند در حالیکه سویه بدست آمده از ریشه گیاه نخود منطقه جوپار کمترین تولید آمونیوم را در محیط آزمایشگاه داشت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت میزان تولید آمونیوم توسط ایزوله ریزوبیومی در شرایط محیط آزمایشگاهی، ارتباط صد در صدی با گیاه میزبان و منطقه جمع‌آوری سویه ندارد.

نتایج حاصل از بررسی اثر جدایه‌های ریزوبیومی روی پارامترهای رشد و ریختی گیاه لوبیا نشان داد شاخصه‌های رشدی در گیاه کنترل بهتر بود که می‌توان رشد بهتر را به فراهمی نیتروژن در درسترس گیاه (بصورت معدنی) نسبت دارد. همچنین مشاهده شد که استفاده از ایزوله MPV2، در بهبود وزن شاخه و ریشه و نیز ارتفاع گیاه بطور قابل توجهی موثر است. بنظر می‌رسد افزایش رشد گیاه مایه‌زنی شده با این ایزوله می‌تواند بدلیل محتوای آب بالاتر و توانایی گیاه در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

جذب بهتر آب در حضور آن باشد. در حضور جدایه‌های MCA بدست آمده از گرهک نخود در مزارع ماهان و GMS حاصل از ریشه یونجه مزارع راین نیز شاخصه‌های رشدی در مقایسه با سایر جدایه‌ها و شاهد فاقد نیتروژن، بهبود یافت. با توجه به قابلیت بالای این جدایه‌ها در تولید آمونیاک در دسترس گیاه، بنظر می‌رسد، توانایی جدایه‌ها ریزوبیومی در تولید آمونیوم با ارتقاء ویژگی‌های رشدی گیاه ارتباط مستقیم دارد. همانطور که در جدایه JCM که از ریشه نخود مزارع جوپار بدست آمده است، نیز توانایی تولید آمونیوم بالا و همچنین قابلیت بهبود وزن خشک گیاه دیده می‌شود. سایر جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه که تولید آمونیوم کمتری را با استفاده از معرف نسلر نشان دادند، قابلیت کمتری در بهبود پارامتر رشدی نشان دادند. هرچند تمامی جدایه‌ها در مقایسه با گروه شاهد که نیتروژن معدنی و ریزوبیوم دریافت نکرده است، تمامی ویژگی‌های رشد از جمله وزن تر و خشک گیاه، ارتفاع، گسترش سطح برک و نیز محتوای آب برگ را ارتقاء دادند. گزارشات متعددی وجود دارد که بهبود ویژگی‌های رشدی گیاهان را در حضور تثبیت‌کننده‌های نیتروژن تایید می‌نماید. گزارش شده است که ایزوله‌های باکتری می‌توانند منجر به افزایش بیومس و وزن گیاه ذرت شیرین در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه شوند (Mehnaz *et al.*, 2010). در یک بررسی De Souza و همکاران بیان کردند که تلقیح جدایه‌های باکتریایی می‌تواند را با جذب بهتر مواد غذایی بیومس ریشه و رشد گیاهان لوبیا و منداب را بهبود بخشد (de Souza *et al.*, 2015). بهبود رشد گیاهان در حضور باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن در غیر لگومی‌ها نیز به اثبات رسیده است (Flores-Félix *et al.*, 2013). گزارش شده است که استفاده از باکتری‌های ریزوبیومی تثبیت کننده نیتروژن می‌تواند حتی منجر به بهبود رشد گیاهان غیرلگومی مانند کاهو و هویج گردد و با بهبود جذب فسفر و نیتروژن، میزان رشد ریشه و شاخه را در این گیاهان افزایش دهد (Flores-Félix *et al.*, 2013).

نتایج این بررسی نشان داد که گروه مایه‌زنی شده با ریزوباکتری MPV2 مشابه با گروه کنترل که نیتروژن معدنی را در محیط ریشه دریافت نموده است، بالاترین مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل را داشت. هرچند محتوای کلروفیل در سایر ایزوله‌های باکتریایی نیز نسبت به گروه شاهد NF بطور معنی‌داری بالاتر بود. افزایش در محتوای کلروفیل می‌تواند نشان‌دهنده توانایی گیاه در بیوسنتز کلروفیل و در نتیجه فتوسنتز و عملکرد متابولیکی گیاه باشد. فراهمی نیتروژن برای گیاه، امکان بیوسنتز کلروفیل را فراهم می‌نماید. بنابراین مقادیر بالاتر کلروفیل گیاهان در حضور سویه MPV2 امکان بهبود شرایط رشدی گیاه را نیز فراهم آورده است. . در یک بررسی Kifle و Laing (۲۰۱۵) در بررسی ریزوباکتری‌ها روی رشد گیاهچه ذرت، مشاهده نمودند که هدایت روزنه‌ای و محتوای کلروفیل برخی از جدایه‌های مورد بررسی افزایش نشان داد. این محققان افزایش محتوای کلروفیل را به افزایش نیتروژن تثبیت شده در گیاه توسط ریزوباکتری‌ها نسبت دادند (Kifle and Laing, 2015). در مطالعه اثر ریزوبیوم و میکوریز در گیاه *Vigna unguiculata*، Arumugam و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که افزایش در محتوای کلروفیل a، b و کلروفیل گیاه می‌تواند به دلیل افزایش هدایت روزنه‌ای، فتوسنتز، تعریف و افزایش رشد گیاه باشد (Arumugam *et al.*, 2010). چنانچه نتایج این پژوهش نیز تایید کننده این ادعا بوده و ایزوله‌هایی که رشد بیشتری داشتند از محتوای کلروفیل بالاتری برخوردار بودند.

محتوای کاروتنوئیدهای برگ گیاه بطور کاملا معنی‌دار و قابل توجهی در گروه شاهد فاقد نیتروژن و ایزوله ریزوباکتریایی نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود. در بین سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. کاروتنوئیدها رنگیزه‌های فتوسنتزی هستند که در بازدارندگی نوری نقش قابل توجه داشته و در شرایط تنش بویژه تنش نوری، نقش قابل توجهی ایفا می‌نماید. بنابراین به نظر می‌رسد بدلیل القاء شرایط تنش در گیاهان گروه NF محتوای این رنگیزه‌ها، پاسخی دفاعی برای جبران نقص فتوسنتزی در این گیاهان باشد. ایزوله JTR که قابلیت بالایی در تولید آمونیوم در شرایط

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

درشیشه نشان داد، نیز نسبت به سایر ایزوله‌های مورد بررسی، مقادیر پایین‌تری از میزان کاروتنوئیدها را باعث شد. اطلاعات محدودی درباره اثر ریزوباکتری‌ها و ریزوبیوم‌ها بر محتوای کاروتنوئید وجود دارد. در یک بررسی (Mahmood *et al.*, 2016) گزارش شده است که ریزوباکتری‌ها منجر به افزایش محتوای کلروفیل و کاروتنوئیدهای گیاهی در پاسخ به بهبود تغذیه گیاه می‌گردد. اگرچه نتایج ما با این گزارش کاملا تناقض دارد و بنابراین علت و چگونگی این تغییرات در محتوای کاروتنوتیدها نیاز به بررسی بیشتر دارد.

افزایش در محتوای کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با ایزوله MPV2، در تطابق با افزایش مقدار فلاونوئیدکل و همچنین مقدار آنتوسیانین بود. ایزوله‌های MPV2 و JTR که ویژگی‌های رشدی گیاه را بهبود بخشیدند، محتوای آنتوسیانین بالایی نشان دادند. مقادیر بالاتر فلاونوئیدها و آنتوسیانین در گیاه نیز می‌تواند نشان دهنده توان بالاتر گیاه برای مقاومت در شرایط محیطی نامطلوب باشد. لذا بنظر می‌رسد جدایه MPV2 با افزایش مقدار کلروفیل عملکرد متابولیکی خود را بهبود و منجر به افزایش رشد گیاه در شرایطی که هیچگونه نیتروژن معدنی در دسترس گیاه قرار نگرفته است، می‌گردد. ایزوله MPV1 که از ریشه گیاهان لوبیا مزارع ماهان جمع‌آوری شده بود، مقادیر پایین کلروفیل و آنتوسیانین را نشان داد. بنظر می‌رسد محتوای پایین آب برگ و ارتفاع در گیاهان مایه‌زنی شده با ایزوله MPV1 در مقایسه با سایر ایزوله‌ها، بدلیل توانایی پایین‌تر بیوسنتز کلروفیل در حضور این ریزوباکتری باشد. قابل توجه است در ایزوله‌های JCM و MMS که محتوای فلاونوئیدی پایین‌تری نسبت به سایر ایزوله‌ها نشان دادند، ویژگی‌های رشدی نیز ارتقاء کمتری پیدا نمود.

ریزوباکترهای محرک رشد گیاه مثل ریزوبیوم سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند که این افزایش رشد می‌تواند به صورت مستقیم و غیرمستقیم اتفاق بیفتد (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003). نتایج این پژوهش نشان داد که مقدار نیتروژن در شاخه و ریشه گروه‌های مایه‌زنی شده با ریزوباکتری‌ها بطور قابل توجهی در مقایسه با گروه شاهد NF افزایش یافت. البته مقدار نیتروژن در شاخه در بین ایزوله‌ها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد اما مقدار نیتروژن ریشه گروه تلقیح شده با جدایه MCA و GMS پس از کنترل بیشترین میزان نیتروژن کل را نشان داد. با توجه به اینکه ویژگی‌های رشدی گیاهان در حضور ایزوله‌های MCA و GMS بهبودی قابل توجهی نشان داد و همچنین گرهک‌زایی بالاتری در حضور این جدایه‌ها مشاهده شد، بنظر می‌رسد مقدار نیتروژن ریشه ارتباط مستقیم و موثری با گرهک‌زایی و ویژگی رشدی گیاه لوبیا داشته باشد. بررسی‌ها نشان داده است که قابلیت تثبیت نیتروژن مولکولی در حبوبات علاوه بر عوامل محیطی محیطی به شدت تحت تاثیرسویه باکتری و گیاه قرار دارد. در صورتی که این دو عامل بطور مناسبی استفاده شوند سیستم همزیستی ای مناسب ایجاد شده و منجر به کارآئی بیشتر در تثبیت نیتروژن خواهد شد (Hardarson *et al.*, 1993). اثرات متفاوت ژنوتیپهای مختلف گیاه وسویه باکتری روی صفات مرتبط با تثبیت بیولوژیک نیتروژن ازجمله تعداد و گرهکهای ریشهای فعالیت سیستم آنزیمی نیتروژناز در لگومهایی مثل نخود معمولی، بادام زمینی، لوبیا هندی، سویا، لوبیا سبز در چند دهه پیش به اثبات رسیده است (Peoples and Herridge, 1990).

نظر به اهمیت فسفر در تشکیل مولکول‌های پرانرژی از جمله ATP و پیروفسفات، وجود فسفر کافی در گیاه برای فرایند تثبیت نیتروژن ضروری است (Ortas, 2008). در این پژوهش مقدار فسفر هم مشابه نیتروژن در شاخه و ریشه گروه‌های مایه‌زنی شده با ریزوباکتری‌ها بطور قابل توجهی در مقایسه با گروه شاهد NF افزایش یافت. گزارش شده است که باکتری‌های ریزوبیومی منجر به افزایش فسفر در دسترس گیاه می‌گردند (Flores-Félix *et al.*, 2013). در حبوبات وجود فسفر کافی نه تنها برای رشد گیاه، بلکه برای تشکیل غده های تثبیت کننده نیتروژن بسیار ضروری می باشد. باکتری در حالت مستقیم با تثبیت نیتروژن، محلول‌سازی فسفر، افزایش آهن در دسترس، تولید هورمون‌های گیاهی و ویتامین‌ها و در حالت غیرمستقیم با افزایش مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی سبب رشد گیاه می‌شود (Piccini *et al.*, 1988). جذب فسفر

www.SID.ir

Archive of SID

به خصوص از منابع غیرمحلول این عنصر در صورت برقراری یک همزیستی سه گانه بین گیاه به عنوان میزبان، ریزوبیوم و قارچ های مایکوریز ا موجب ترقی فعالیت آنزیم نیتروژناز و افزایش عملکرد محصول بقولات گردیده است (Piccini *et al.*, 1988).

در بسیاری از مطالعات وزن خشک بالای گرهک و میزان تثبیت نیتروژن به عنوان صفت همزیستی کارآمد استفاده می‌شود (Laguerre *et al.*, 2007). قابلیت گرهک‌زایی در بین ایزوله‌های جدا شده مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به نظر می‌رسد میزان گرهک‌زایی ریشه توسط ایزوله‌ها ارتباط مستقیمی با ویژگی‌های رشدی گیاه دارد. چنانکه ایزوله MPV2، و بدنبال آن GMS که بیشترین تعداد و وزن گرهک‌زایی را باعث شدند، بر ویژگی‌های رشدی مانند ارتفاع گیاه و محتوای آب برگ نیز بیشترین تاثیر بهبودی را نشان دادند. وزن شاخه و ارتفاع گیاه در گیاه مایه‌زنی شده با ایزوله MCA بدست آمده از گرهک ریشه گیاه نخود در مزارع ماهان که توانایی بالای تولید گرهک داشت، بیشتر از سایر ایزوله‌ها بود. اثرات متفاوت ژنوتیپ های مختلف گیاه و سویه باکتری روی صفات مرتبط با تثبیت بیولوژیک نیتروژن مثل تعداد و وزن گره و فعالیت سیستم آنزیمی نیتروژناز برای لگوم هایی مثل نخود معمولی، بادام زمینی، لوبیا هندی، سویا، لوبیا و لوبیا سبز تا قبل از دهه هشتاد به اثبات رسیده است. در نخود گزارش شده است تعداد گرهک نیز در بین همزیستی های مورد بررسی، متفاوت بود که به نوع رقم نخود و سویه ریزوبیوم وابسته است (Romdhane *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده است که یک ارتباط مثبت بین تثبیت نیتروژن و وزن خشک گرهک وجود دارد و تاثیر متقابل بین سویه و ریزوبیوم یک فاکتور مهم در این ارتباط محسوب می شود (He *et al.*, 2011). هرچند بر اساس نتایج ما ایزوله MCA بین سایر ایزوله‌ها، بیشترین وزن تر را در گیاهان لوبیا باعث شد. از طرف دیگر نتایج نشان داد در حضور ایزوله JTR که بیشترین تولید آمونیوم را درشرایط درشیشه داشت، کمترین توانایی را در گرهک‌زایی در بین سایر ایزوله‌ها دارد. بنابراین، تولید امونیوم در شرایط در شیشه اگرچه می‌تواند نشان‌دهنده قابلیت باکتری در تثبیت نیتروژن باشد، فاکتور مطلقاً مناسبی برای ایجاد همزیستی با گیاه و بهبود رشد گیاهی نمی‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مجموع مایه‌زنی گیاه با تمامی سویه‌های تثبیت کننده نیتروژن با دارا بودن توانایی تولید آمونیوم در محیط کشت، قادر به بهبود رشد و ویژگی‌های ریختی گیاه شامل تولید بیوماس و وزن گیاه، رشد طولی و محتوای آبی گیاه می‌باشند. همچنین محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و غیرفتوسنتزی در شرایط گلخانه‌ای و در حضور سویه‌های تثبیت کننده نیتروژن افزایش می‌یابد. گرهک‌زایی در تمامی سویه‌های تثبیت کننده نیتروژن انجام گرفت اما لزوما ویژگی گرهک‌زایی سویه‌ها با بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه مطابقت ندارد. محتوای نیتروژن و فسفر اگرچه در حضور ریزوباکتری‌ها در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش می‌یابد، اما تفاوت معنی‌داری بین سویه‌ها وجود نداشت. بنظر می‌رسد نتایج نشان می دهد که همزیستی لوبیا با با جدایه‌های MPV2، GMS و MCA بیشترین میزان رشد را باعث می‌شود. بنابراین، مایه‌زنی گیاه لوبیا با ریزوبیوم‌های جداشده از میزبان‌های متفاوت نیز می‌تواند منجر به بهبود رشد و متابولیسم گیاه گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی بخاطر حمایت مالی پروژه (شماره قرارداد ۹٤/۲٦۳۵/ص/۷) قدردانی می‌نمایند.

References

Arumugam, R., Rajasekaran, S. and Nagarajan, S. (2010) Response of *Arbuscular mycorrhizal* fungi and Rhizobium inoculation on growth and chlorophyll content of *Vigna unguiculata* (L) Walp Var. Pusa 151, Journal of Applied Sciences and Environmental Management 14: 113-115.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

Beattie, G. A. and Handelsman, J. (1989) A rapid method for the isolation and identification of Rhizobium from root nodules, Journal of Microbiological Methods 9: 29-33.

Broughton, W. J., Hernandez, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. and Vanderleyden, J. (2003) Beans (*Phaseolus* spp.)–model food legumes, Plant and Soil 252: 55-128.

Cappuccino, J. and Sherman, N. (1992) Negative staining, Microbiology: A Laboratory Manual 3: 125-179.

de Souza, E. M., Bassani, V. L., Sperotto, R. A. and Granada, C. E. (2015) Inoculation of new rhizobial isolates improve nutrient uptake and growth of bean (*Phaseolus vulgaris*) and arugula (*Eruca sativa*), Journal of the Science of Food and Agriculture 96: 3446-3453.

Dixit, S. and Appu Kuttan, K. (2015) A review: role of phosphorous solubilising and sulfur oxidizing bacteria in mine reclamatiion, International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR) 5: 33-40.

Flores-Félix, J. D., Menéndez, E., Rivera, L. P., Marcos-García, M., Martínez-Hidalgo, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., Velázquez, M. d. l. E., García-Fraile, P. and Rivas, R. (2013) Use of *Rhizobium leguminosarum* as a potential biofertilizer for Lactuca sativa and Daucus carota crops, Journal of Plant Nutrition and Soil Science 176: 876-882.

Hardarson, G., Bliss, F. A., Cigales-Rivero, M., Henson, R. A., Kipe-Nolt, J. A., Longeri, L., Manrique, A., Pena-Cabriales, J., Pereira, P. A. A. and Sanabria, C. (1993) Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean, Plant and Soil 152: 59-70.

He, Y., Guo, L., Zhang, H. and Huang, G. (2011) Symbiotic effectiveness of pea-rhizobia associations and the implications for farming systems in the western Loess Plateau, China, African Journal of Biotechnology 10: 3540-3548.

Herridge, D. F., Peoples, M. B. and Boddey, R. M. (2008) Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems, Plant and Soil 311: 1-18.

Khalid, A., Arshad, M. and Zahir, Z. (2004) Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat, Journal of Applied Microbiology 96: 473-480.

Kifle, M. H. and Laing, M. D. (2015) Isolation and screening of bacteria for their diazotrophic potential and their influence on growth promotion of maize seedlings in greenhouses, Frontiers in Plant Science 6: 1-8.

Laguerre, G., Depret, G., Bourion, V. and Duc, G. (2007) *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae genotypes interact with pea plants in developmental responses of nodules, roots and shoots, New Phytologist 176: 680-690.

Lichtenthaler, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, Methods in Enzymology 148: 350-382.

Mahmood, S., Daur, I., Al-Solaimani, S. G., Ahmad, S., Madkour, M. H., Yasir, M., Hirt, H., Ali, S. and Ali, Z. (2016) Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Silicon Synergistically Enhance Salinity Tolerance of Mung Bean, Frontiers in Plant Science 7: 1-14.

Mehnaz, S., Kowalik, T., Reynolds, B. and Lazarovits, G. (2010) Growth promoting effects of corn (*Zea mays*) bacterial isolates under greenhouse and field conditions, Soil Biology and Biochemistry 42: 1848-1856.

Nasr Esfahani, M., Sulieman, S., Schulze, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. and Tran, L. S. (2014) Approaches for enhancement of N2 fixation efficiency of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under limiting nitrogen conditions, Plant Biotechnology Journal 12: 387-397.

Ortas, I. (2008) The effect of mycorrhizal inoculation on forage and non-forage plant growth and nutrient uptake under field conditions, Options Mediterraneennes Sustainable Mediterranean grasslands and their multifunctions 79: 463-469.

Peoples, M., Herridge, D. and Ladha, J. (1995) Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? , Plant and Soil 174: 3-28.

Peoples, M. B. and Herridge, D. F. (1990) Nitrogen fixation by legumes in tropical and subtropical agriculture, Advances in Agronomy 44: 155-223.

Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. and Robaglia, C. (2003) Tales from the underground: molecular, Plant, Cell & Environment 26: 189-199.

Piccini, D., Ocampo, J. and Bedmar, E. (1988) Possible influence of Rhizobium on VA mycorrhiza metabolic activity in double symbiosis of alfalfa plants (*Medicago sativa* L.) grown in a pot experiment, Biology and Fertility of Soils 6: 65-67.

Romdhane, S. B., Trabelsi, M., Aouani, M. E., De Lajudie, P. and Mhamdi, R. (2009) The diversity of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) under water deficiency as a source of more efficient inoculants, Soil Biology and Biochemistry 41: 2568-2572.

Thomas, R., Sheard, R. and Moyer, J. (1967) Comparison of conventional and automated procedures for nitrogen, phosphorus, and potassium analysis of plant material using a single digestion, Agronomy Journal 59: 240-243.

Toor, R. K. and Savage, G. P. (2005) Antioxidant activity in different fractions of tomatoes, Food Research International 38: 487-494.

www.SID.ir

Archive of SID

Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F. and Koca, H. (2005) Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress, Plant Science 168: 223-231.

Wagner, G. J. (1979) Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts, Plant Physiology 64: 88-93.

Yadegari, M., Rahmani, H., Noormohammadi, G. and Ayneband, A. (2008) Evaluation of bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds inoculation with Rhizobium phaseoli and plant growth promoting rhizobacteria on yield and yield components, Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS 11: 1935-1939.

Yang, J., Kloepper, J. W. and Ryu, C.M. (2009) Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress, Trends in Plant Science 14: 1-4.

Downloaded from jispp.iut.ac.ir at 10:06 IRDT on Sunday June 9th 2019

www.SID.ir