Archive of SID

کارایی حل‌کنندگی فسفات سیانوباکتری‌های جداسازی‌شده از خاک‌های شالیزاری و تأثیر آن بر جذب فسفر و عملکرد برنج

صاحب سودایی مشایی[1]، ناصر علی‌اصغرزاد، قربانعلی نعمت‌زاده و ندا سلطانی

استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد؛ ssoodaie78@gmail.com

استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

استاد گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری؛ gh.nematzadeh@sanru.ac.ir

استاد پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران؛ soltani6@yahoo.com

دریافت: 97/6/18 و پذیرش: 97/12/20

چکیده

فسفر، یکی از عناصر پرمصرف و ضروری برای رشد گیاهان می‌باشد که اغلب خاکها ذخایر کافی آن را داشته ولی مقادیر قابل استفاده آن برای گیاهان بسیار ناچیز است. یکی از روش‌های تأمین فسفر مورد نیاز برنج در شرایط شالیزار، بهره‌گیری از سیانوباکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد زیرا اغلب سویه‌های این گروه باکتری، ضمن استقرار مناسب در شرایط غرقابی، توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن نیز دارند. در این تحقیق، پس از جداسازی سیانوباکتری‌ها از اراضی شالیزاری گیلان، خالص‌سازی و شناسایی مورفولوژیک و مولکولی (ژن 16S rDNA) جدایه‌ها، توانایی حل‌کنندگی فسفات آنها ارزیابی شده و سپس سویه‌های برتر برای کشت گلدانی گیاه برنج (رقم طارم هاشمی) انتخاب شدند. آزمایش گلدانی بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با چهار سطح کود نیتروژن (صفر، 0/23، 0/35و 0/46 گرم اوره در گلدان) و هفت سویه سیانوباکتری و تیمار شاهد بدون باکتری در سه تکرار اجرا گردید. نتایج شناسایی مورفولوژیک و مولکولی، سویه‌های جداسازی شده را در چهار راسته *Chroococcales*، *Oscillatoriales*، *Nostocales* و *Stigonematales* طبقه‌بندی نمود. سویه *Anabaena* sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه سویه‌ها بالاترین توان حل‌کنندگی فسفات (641 میلی‌گرم بر لیتر) داشت و بعد از آن سویه *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 (130 میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفت. بیشترین عملکرد دانه (15/6 گرم در گلدان)، بیشترین میزان جذب نیتروژن (14/3 گرم در گلدان) و فسفر (2/08 گرم در گلدان) در تیمار تلقیح شده با سویه *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 حاصل گردید. این سویه را می‌توان همانند سویه‌های برتر در بهبود رشد و عملکرد برنج بعد از آزمایش در شرایط شالیزار در تولید کود زیستی سیانوباکتری پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: جذب فسفر، ژن 16S rDNA، سیانوباکتری‌های حل‌کننده فسفات، عملکرد برنج

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: چهارمحال و بختیاری، شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم خاک، صندوق پستی 115.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

برنج (*Oriza sativa* L.) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی محسوب می‌شود که سالیانه تقریباً 35 تا 70 درصد از کالری مورد نیاز 3 میلیارد نفر از جمعیت دنیا را تأمین می‌کند (فائو، 2011). گزارش شده است که برای تأمین نیاز غذایی جمعیت جهان تا سال 2025 نیاز به افزایش 60 درصد در تولید برنج است (یانگ و زانگ،2011). گیاه برای تولید حداکثر، نیاز به عناصر غذایی کافی از جمله نیتروژن، فسفر و پتاسیم دارد و نقش کودهای زیستی در تأمین مواد غذایی برای گیاهان غیرقابل انکار است. فسفر یک عنصر غذایی مهم و محدودکننده رشد گیاهان بوده و بر خلاف نیتروژن، منبع اتمسفری ندارد. در اغلب خاک‌ها، مقدار فسفر قابل دسترس گیاه حدود یک میکرومول بر لیتر است اما مقدار مورد نیاز حدود 30 میکرومول بر لیتر تخمین زده شد (ادهایا و همکاران، 2015). برای این منظور کافی است که سویه‌های سیانوباکتری توانمند از نظر انحلال فسفات را از خاک جداسازی و با تلقیح آنها در خاک از کارایی آنها استفاده نمود. ضرورت یافتن جایگزینی مناسب برای انحلال و رهاسازی فسفات‌های تجمع یافته در خاک زمانی بیش‌تر احساس می‌شود که بدانیم منابع فسفاته موجود در خاک قابلیت تأمین فسفات مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا 100 سال دارا می‌باشد (خان و همکاران، 2007).

سیانوباکتری‌ها یک گروه بسیار متنوع از پروکاریوت-ها هستند که باکتری‌های اکسیژنیک و فتوتروفیک را شامل می‌شوند. سیانوباکتری‌ها یکی از شاخه‌های اصلی باکتری-ها بوده و رابط دوری را با باکتری‌های گرم مثبت نشان می‌دهند (مادینگان و همکاران، 2012). نقش سیانوباکتری‌ها در حفظ نیتروژن خاک از طریق تثبیت نیتروژن (هندرایانتی و همکاران، 2018) و افزایش فعالیت فسفاتازی که فسفر نامحلول را به فرم محلول متحرک کرده (میشرا، 2005)، بخوبی اثبات شده است. علاوه بر این سیانوباکتری‌ها در حفظ ظرفیت نگهداری آب خاک با افزودن مواد آلی، به‌ویژه مواد پلی ساکاریدی موجود در پوشش سلولی کمک بسزایی می‌کنند (کودهاری و بیمال، 2010). فسفر، عنصری ضروری برای همه موجودات از جمله سیانوباکتری‌ها می‌باشد، بنابراین در شرایط فقدان یا محدودیت فسفر، فسفاتاز قلیایی برون سلولی تولید و ترشح می‌کنند که تجزیه انواع فسفات آلی پیچیده را تسریع می‌کند (پاندی و پروین، 2011). سیانوباکتری‌ها می‌توانند فسفاتهای معدنی نامحلول از جمله فسفات کلسیم، فسفات آهن، فسفات آلومینیم، هیدروکسی آپاتیت در خاک و رسوبات در محیط کشت باکتری را حل کنند. مکانیسم‌های مختلف شامل تولید اسیدهای آلی، سنتز کلات کننده‌ها، احیای آهن فریک و حل کردن آنزیمی یا عمل کردن همزمان چند مکانیسم گزارش شده‌اند (یاندیگری و همکاران، 2011). تولید اسیدهای آمینه برون سلولی نظیر اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک، پرولین، والین، گلایسین و آلانین در مراحل مختلف رشد در محیط توسط سیانوباکتری‌ها گزارش شده است. کربن زیست‌توده میکروبی سیانوباکتریایی، در مقادیر مساوی از NPK، در آزمایش گلدانی برنج با سویه‌های سیانوباکتری، افزایش معنی‌دار را از لحاظ ارتفاع گیاه، وزن خشک و عملکرد دانه نشان داد (کارتیکیان، 2007). نئین و همکاران (2010) اثرات سینرژیستی برخی سویه‌های باکتریایی و سیانوباکتری‌ها را به عنوان کود زیستی بر عملکرد گندم ارزیابی کردند و نتیجه گرفتند که تلقیح سیانوباکتری‌ها باعث افزودن مواد آلی، سنتز و آزاد کردن اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و اکسین‌ها، کاهش مقدار مواد قابل اکسایش خاک، فراهم کردن اکسیژن برای ریزوسفر در شرایط غرقاب، بهبود شرایط شوری و افزایش خاصیت بافری، حل شدن فسفات‌ها شده و در نتیجه افزایش راندمان مصرف کود در محصولات زراعی و افزایش رشد محصول را به دنبال دارد.

اگر چه شناسایی و رده‌بندی سیانوباکتری هنوز با تکیه بر خصوصیات ساده مورفولوژیک امکانپذیر است ولی باید در نظر داشت که در دهه اخیر اطلاعات جدیدی حاصل از مطالعات فراساختاری و به خصوص بیولوژی مولکولی نقش بسیار مهمی در تحول رده‌بندی این گروه از باکتری‌ها ایفا نموده است (کومارک و همکاران، 2014)، به همین منظور بخشی از روند شناسایی در این تحقیق بر پایه شناسایی مولکولی قرار داده شد. امروزه آنالیز مولکولی توالی ژن‌های کدکننده زیرواحدهای سازنده RNA ریبوزومی به منظور شناسایی میکروارگانیسم‌های مختلف گسترش قابل توجهی یافته است. ناحیه کد کننده 16s rDNA باکتری‌ها و سیانوباکتری‌ها ناحیه‌ای به شدت حفاظت شده است و می‌توان توالی ژن کدکننده این بخش از ژنوم را پس از تکثیر به کمک تکنیک PCR تعیین کرد (نوبل و همکاران، 1997).

محققین نشان دادند که وقتی زیست‌توده سیانوباکتریایی یا کود شیمیایی سوپرفسفات بعنوان تیمارهای جداگانه در خاک دچار کمبود فسفر برای رشد گیاهچه برنج به مدت 30 روز بکار برده شد، مقدار فسفات قابل جذب آزاد شده از سوپر فسفات 1/8- 2/6 برابر بیشتر از زیست توده سیانوباکتری بود. اما فسفر آزاد

www.SID.ir

Archive of SID

شده از سوپر فسفات، هشت برابر بیشتر از حد بحرانی فسفر برای برنج بود، در حالی‌که فسفات آزاد شده از طریق سیانوباکتری فقط 3- 4/4 برابر بیشتر از حد بحرانی بود. این محققین اهمیت مصرف زیست‌توده سیانوباکتری در کشاورزی به‌عنوان کود زیستی حاوی پلی‌فسفات آلی (ولوتین[1]) برای اجتناب از سمیت شیمیایی فسفر خاک را نشان دادند (رای و همکاران، 2013).

با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیط و اقلیمی زیستگاه اصلی آنها، تولید کود زیستی از باکتری‌های غیربومی که از مناطقی با ویژگی‌های اقلیمی متفاوت نسبت به شرایط زیستگاه اصلی به دست آمده‌اند کارایی مطلوبی نخواهد داشت (یو و همکاران، 2011). بررسی توان میکروارگانیسم‌های بومی در حضور گیاهان مختلف و شرایط متفاوت خاک‌ها نیاز به انجام آزمایش-های بیشتری دارد. به این منظور پس از جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های سیانوباکتری از اراضی شالیزاری استان گیلان، آزمون حل‌کنندگی فسفات بر روی آنها انجام شد و هفت سویه برتر مورد شناسایی مورفولوژیک و مولکولی قرار گرفتند. سپس اثر سویه‌های منتخب بر عملکرد، اجزای عملکرد و میزان جذب فسفر گیاه برنج در شرایط گلدانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی سیانوباکتری‌ها

جداسازی سیانوباکتری‌ها از نمونه‌های خاک بر اساس روش کوشیک (1987) انجام گرفت. برای تشکیل کلنی-های اولیه سیانوباکتری و جداسازی آنها از خاک، 30 گرم از هر نمونه خاک (نمونه‌برداری شده از خاک‌های شالیزاری تا عمق 10 سانتیمتری از 20 مزرعه در بهمن ماه 1392) به پتری‌های استریل با قطر نه سانتیمتر منتقل، سپس مقدار مناسبی از محیط کشت مایع BG11 (با نیتروژن) و $BG11_0$ (بدون نیتروژن) در تیمار جداگانه به آنها اضافه شد (استینر و همکاران، 1971). نمونه‌ها حدود 3-4 هفته در اتاق کشت در دمای 27 درجه سلسیوس و شدت نور 2500 لوکس با نور دائمی قرار داده شدند. بعد از پیدایش کلنی‌های سیانوباکتری بر روی سطح خاک حاوی محیط کشت، نمونه‌های سیانوباکتری به صورت کلنی به پتری‌های حاوی محیط کشت جامد BG11 و $BG11_0$ (با افزودن آگار 1/5 درصد) منتقل شدند. سپس طی واکشت‌های مکرر (شش مرتبه) نمونه‌های سیانوباکتری خالص گردیدند. سپس مقداری از کلنی در کشت جامد به ارلن‌های 100 میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مایع (BG11 یا $BG11_0$) منتقل شده و به مدت سه هفته در اتاقک رشد و روی دستگاه تکان دهنده (با سرعت 150 دور در دقیقه)، قرار داده شدند (جانسون و برگمن، 1994). برای شناسایی اولیه جدایه‌ها به روش مورفولوژیک، با تهیه لام نیمه دائمی از کلنی‌ها و با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی سیانوباکتری‌ها، مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نمونه‌های مورد نظر شناسایی شدند (دیسیکاچری، 1959؛ جون و همکاران، 2003). در ابتدا تعداد 30 جدایه خالص شدند که همه این جدایه‌ها به روش مورفولوژیک شناسایی شدند و بر اساس توانایی حل‌کنندگی فسفات جدایه‌ها (بند فقط 10 جدایه برای شناسایی مولکولی جهت تأیید شناسایی مورفولوژیک انتخاب شدند.

شناسایی مولکولی سویه‌های سیانوباکتری

استخراج DNA برای 10 جدایه خالص با روش ساگی-ماروف و همکارن (1984) انجام شده است، به این منظور از کیت استخراج DNA ژنومی، محصول شرکت فرمنتاز به نام (K0512) Genomic DNA Purification Kit استفاده شد که مراحل انجام آن به صورت زیر می‌باشد: با استفاده از دستگاه هموژنایزر ابتدا سلول‌ها هموژن شده، حدوداً 0/5-0/2 گرم از نمونه‌ها در ویال2 میلی‌لیتر ریخته و سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته، سپس به میزان 400 میکرولیتر محلول لیزکننده (100 Mm NaCl, 10 Mm Tris-HCl, 1Mm EDTA, pH=8) به ویال اضافه و ورتکس شد تا کاملاً مخلوط شود. سپس به مدت چهار ساعت در بن‌ماری 65 درجه سلسیوس قرار داده شد و در همین حال هر نیم ساعت یکبار از بن‌ماری خارج شده و به مدت 15 ثانیه ورتکس شدند و به مقدار 600 میکرولیترکلروفرم به آنها اضافه شد و به آرامی مخلوط شدند. سپس به مدت دو دقیقه در (g) 10000 سانتریفیوژ شدند. در این مرحله مایع داخل ویال-ها دو فاز را تشکیل داد. فاز شفاف رویی با سمپلر جدا شده و داخل میکروتیوپ جدید ریخته شد و سپس محلول رسوب‌دهی به ویال‌ها اضافه شد. بعد از سانتریفیوژ((g)10000 ، 5 دقیقه) ته ویال رسوب سفید رنگی مشاهده شد. مایع رویی خالی شده و 100میکرولیتر کلریدسدیم (4 مولار) به رسوب اضافه شد. سپس به آرامی مخلوط شد تا رسوب در نمک حل شود، 300 میکرولیتراز اتانول سرد به نمونه اضافه شده و 10 دقیقه در فریزر 20- درجه سلسیوس قرار داده شدند، در مرحله بعد سانتریفیوژ شده و سپس اتانول تخلیه گردید و 50 میکرولیترآب مقطر دیونیزه اضافه نموده و داخل فریزر نگهداری شدند (سلطانی و همکاران، 1387).

[1] Volutin (polyphosphate granules)

www.SID.ir

Archive of SID

تکثیر DNA ژنومی و تعیین توالی ژنی 16s rDNA

تکثیر ژن 16s RNA به وسیله سیستم PCR و با استفاده از دو پرایمر اختصاصی 106F (5′ CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTGA 3′) و 781Rb (5′ GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTTT3′) صورت پذیرفت (لیرا و همکاران، 1997). مخلوط واکنش برای انجام PCR به داخل ترموسایکلر Bio-Rad منتقل گردید. سیکل‌های دمایی استفاده شده در جدول 1 آورده شده است.

جدول 1- برنامه چرخه دمایی انجام واکنش PCR شناسایی نمونه‌ها

مراحل PCR	دما (درجه سیلسیوس)	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	94	3 دقیقه	یک سیکل
دناتوراسیون	94	60 ثانیه	
آنیلینگ	55	30 ثانیه	35 سیکل
بسط زنجیره	72	60 ثانیه	
بسط نهایی	72	7 دقیقه	یک سیکل

پس از اتمام PCR و بدست آوردن محصول، جهت اطمینان از کیفیت محصول PCR و مناسب بودن آن برای تعیین توالی، الکتروفورز محصول PCR صورت گرفت. پس از دستیابی به محصولات PCR مناسب با حدود 600 و 1500 جفت باز (بسته به نوع پرایمر بکاررفته)، محصولات PCR جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام بیوتکنولوژی ارسال گردید. قطعات تکثیر شده ژنومی با استفاده از DNA Sequencer، به روش اتوماتیک و بر اساس روش ختم زنجیره (Chain Termination method) و به سفارش شرکت ذکر شده تعیین توالی شد. پس از تعیین توالی ژنی ناحیه مورد نظر، توالی ژنی حاصل با انجام عملیات BLASTn[1] با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک‌های جهانی ژن (NCBI) مقایسه گردید. درصد تشابه ژنی نمونه مورد نظر با نمونه‌های موجود در بانک ژن تعیین و صحت شناسایی نمونه‌های مورد نظر در سطح جنس تأئید شدند. درخت فیلوژنی نیز جهت نشان دادن فاصله ژنتیکی تاکسون‌های توالی‌یابی شده، توالی ژنی این نمونه‌ها به همراه تعدادی از توالی‌های دریافت شده از بانک ژن جهانی (NCBI) به کمک نرم افزار فیلوژنی MEGA6 و با استفاده از الگوریتم Neighbor-joining رسم گردید.

سنجش حل‌کنندگی فسفات

فعالیت حل‌کنندگی فسفات 30 سویه سیانوباکتری (شناسایی اولیه بر اساس خصوصیات مورفولوژیک) در پتری‌های حاوی محیط کشت جامد BG11 و $BG11_0$ و تری‌کلسیم فسفات (0/3 درصد) بطور کیفی تعیین گردید. توسعه هاله شفاف اطراف منطقه رشد سیانوباکتری‌ها بعد از 15 روز در اتاقک کشت در دمای 28 درجه سلسیوس و با نور 3000 لوکس (با 16: 8 ساعت روشنایی: تاریکی) مشاهده گردید (یاندیجری و همکاران، 2011). برای تعیین کمی میزان حل‌کنندگی فسفات هر سویه، محیط کشت مایع سیانوباکتریایی (BG11 و $BG11_0$) فاقد فسفر تهیه شده و بعد از کشت سیانوباکتری‌ها، به مدت دو هفته در اتاقک رشد نگهداری شد. سپس محیط کشت مایع (BG11 و $BG11_0$) جدید حاوی تری‌کلسیم فسفات (0/3 درصد) تهیه شده (یاندیجری و همکاران، 2011) و در هر ارلن مقدار 100 میلی‌لیتر محیط کشت ریخته شده و با 5 میلی‌لیتر از سوسپانسیون سیانوباکتری تلقیح گردید. سوسپانسیون سیانوباکتری با تراکم جمعیتی OD_{750}=0.5 بکار رفت. در آنها تلقیح شدند. پس از 15 و 30 روز نگهداری این محیط‌های کشت در اتاقک رشد، سوسپانسیون سیانوباکتری در دور 6000 rpm و به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار فسفر معدنی محلول در مایع روشناور به روش اسید اسکوربیک (علی‌اصغرزاد، 1389؛ قادری و همکاران، 2008) و فسفر کل به روش وانادات-مولیبدات اندازه‌گیری شدند (کلسکری و همکاران، 1999).

کشت گلدانی

آزمایش گلدانی برای ارزیابی پیامد کاربرد 7 سویه‌های برتر گزینش شده سیانوباکتری بر رشد، عملکرد و اجزای عملکرد گیاه برنج (*Oriza sativa*) رقم طارم هاشمی انجام گردید. سویه‌های برتر سیانوباکتری شناسایی شده بر پایه توان تثبیت نیتروژن اتمسفری (سودایی و همکاران، 1395) و حل‌کنندگی فسفات گزینش شدند. این سویه‌ها شامل *Cylindrospermum sp.* GGuCy-25، *Anabaena sp.* GGuCy-42، *Calothrix sp.* GGuCy-43،

[1] Basic Local Alignment Search Tool (nucleotide)

www.SID.ir

Archive of SID

Anabaena sp. GGuCy-17، *Anabaena sp.* GGuCy-23، *Chroococcus sp.* GGuCy-34 و *Hapalosiphon sp.* GGuCy-32 بودند. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی که در آن، فاکتور اول نیتروژن با چهار سطح شامل صفر، 0/23، 0/35و 0/46 گرم اوره در گلدان (معادل 100، 150 و 200 کیلوگرم اوره در هکتار) با دو تقسیط و فاکتور دوم مایه‌زنی با سیانوباکتری در 8 سطح شامل 7 سویه سیانوباکتری و شاهد بدون سیانوباکتری، با سه تکرار در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان اجرا گردید. گلدان‌ها هر کدام با پنج کیلوگرم خاک مزرعه شالیزاری (0 تا 20 سانتیمتر) پر شده و برای دو هفته غرقاب نگه داشته شدند. از کشت مایع هر سویه سیانوباکتری (کشت 15 روزه) به مقدار 50 میلی‌لیتر با تراکم جمعیتی یکسان (OD_{750}=0.55) با 20 گرم پرلیت (قطر 2-3 میلی‌متر) سترون مخلوط و در خاک هر گلدان در عمق 5 سانتی-متری جاگذاری شد. چند روز پیش از نشاکاری 50 درصد از سطوح تیماری کود نیتروژن، 0/7 گرم سوپرفسفات تریپل و 0/8 گرم سولفات پتاسیم در گلدان‌ها بکار رفت. سپس بذور برنج ضدعفونی شده (با الکل 70 درصد به مدت یک دقیقه، با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت 10 دقیقه و 10 بار شستشو با آب مقطر سترون) درون گلدان‌های مربوط به هر تیمار کاشته شد و پس از گذشت نزدیک 20 روز گیاهچه‌ها تنک شده و در درون هر گلدان 3 بوته نگه داشته شد.

این گلدان‌ها در گلخانه با شدت نور 3000 لوکس، دمای 30 تا 35 درجه سلسیوس و رطوبت 75 درصد نگهداری شده و آبیاری گلدان‌ها دوبار در هفته انجام شد. باقیمانده کود نیتروژن بصورت سرک، 40 روز بعد از کاشت بذر در گلدان‌ها مصرف گردید. در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک بعد از گذشت 115 روز از کاشت بذر، برداشت کامل گیاه انجام شده و تعداد پنجه، تعداد خوشه، ارتفاع بوته‌ها، عملکرد دانه، تعداد دانه پر و پوک در هر خوشه، طول خوشه، وزن خشک اندام هوایی گیاه، عملکرد دانه و غلظت عناصر غذایی از جمله فسفر و نیتروژندر دانه و کاه تعیین شدند (بهمنیار و همکاران، 2012؛ اصفهانی و همکاران، 2005؛ پراسانا و همکاران، 2012). محاسبات آماری به کمک نرم افزار SAS (نسخه 9.2) و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه-ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

با انجام کشت‌های اولیه در نمونه‌های خاک در محیط کشت‌های BG11 و $BG11_0$ و همچنین انجام کشت‌های پی در پی، نهایتاً 30 جدایه سیانوباکتری خالص‌سازی و بر اساس مشخصات مورفولوژیک (میکروسکوپی) شناسایی اولیه شدند که به چهار راسته *Chroococcales*، *Oscillatoriales*، *Nostocales* و *Stigonematales* تعلق داشتند.

بررسی مولکولی ناحیه ژنی 16S rDNA تعدادی از نمونه‌های خالص شده (10 نمونه) تأیید کننده صحت نتایج شناسایی مورفولوژیک در سطح جنس انجام گردید. مقایسه توالی‌های ژنی نمونه‌های مورد بررسی با توالی‌های ژنی ثبت شده در بانک جهانی ژن NCBI[1] به‌واسطه انجام عملیات BLASTn نشاندهنده وجود بالاترین سطح تشابه[2] میان برخی نمونه‌های مورد مطالعه با نمونه‌های ثبت شده با جنس مشابه در بانک ژن NCBI بود (جدول 2). روابط فیلوژنتیک میان ژن‌ها و موجودات را می‌توان با یک درخت فیلوژنتیک شرح داد. درخت فیلوژنتیک رسم شده برمبنای هم‌ترازی چندگانه توالی ژنی ناحیه 16S rDNA، پنج شاخه را نشان داده است (شکل 1). سویه‌های GGuCy-25، GGuCy-49، GGuCy-47 و GGuCy-26 از یک ریشه هستند که مربوط به راسته *Nostocales* می‌شود و سویه‌های GGuCy-35، GGuCy-15 و GGuCy-34 نیز از یک ریشه هستند که به راسته *Chroococcales* تعلق دارند. با در نظر گرفتن اهمیت مورفولوژی در هر طبقه‌بندی و این واقعیت که اطلاعات ژنتیکی به تنهایی برای حل و فصل ابهامات تاکسونومی کافی نبوده، بنابراین برای بهبود اساس طبقه‌بندی، موفولوژی ضرورت دارد (میشرا و همکاران، 2014). در میان توالی‌های ژن 16S rDNA نمونه‌های خالص شده، سویه GGuCy-32 تشابهی را با توالی‌های پایگاه جهانی NCBI نشان نداد یا درصد تشابه پایینی را نشان داد که نیاز به کارهای مولکولی بیشتر جهت شناسایی بهتر آن دارد که احتمال می‌رود سویه جدید و ثبت نشده باشد. سویه‌های GGuCy-34 و GGuCy-35 هم از لحاظ مورفولوژیکی جنس *Chroococcus* تشخیص داده شدند ولی در شناسایی مولکولی با توالی 16S rDNA به ترتیب سویه *Cyanobium gracile* و *Cyanobacterium aponinum* تعیین شدند (جدول 2).

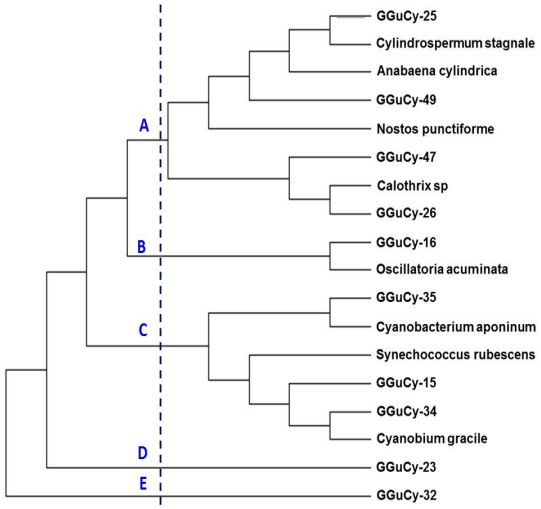
1. National Center for Biological Information
2. Similarity

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نمونه‌ها با استفاده از توالی ژن 16S rDNA

ردیف	کد سویه سیانوباکتری	سویه احتمالی	نزدیکترین همسایه تعیین شده براساس BLAST		شماره ژنی NCBI
			درصد تشابه	جنس موردنظر	
1	GGuCy-15	*Synechococcus* sp.	98	*Synechococcus elongatus*	NC 007604.1
2	GGuCy-16	*Oscillatoria* sp.	97	*Oscillatoria acuminata*	NC 019693.1
3	GGuCy-23	*Anabaena* sp.	92	*Anabaena* sp.	NZ CP011456.1
4	GGuCy-25	*Cylindrospermum* sp.	97	*Cylindrospermum stagnale*	NC 019757.1
5	GGuCy-26	*Calothrix* sp.	97	*Calothrix* sp.	NC 019682.1
6	GGuCy-32	*Hapalosiphon* sp.	-	uncultured	-
7	GGuCy-34	*Chroococcus* sp.	95	*Cyanobium gracile*	NC 019675.1
8	GGuCy-35	*Chroococcus* sp.	99	*Cyanobacterium aponinum*	NC 019776.1
9	GGuCy-47	*Nostoc* sp.	97	*Nostoc punctiforme*	NC 010628.1
10	GGuCy-49	*Anabaena* sp.	97	*Anabaena cylindrica.*	NC O19771.1



شکل 1- درخت فیلوژنتیک رسم شده برمبنای هم‌ترازی چندگانه توالی ژنی ناحیه 16S rDNA به کمک نرم افزار فیلوژنتیک MEGA6 و با استفاده از الگوریتم Neighbor-joining

یکی از دلایل احتمالی عدم تشابه، تک سلولی بودن این سویه‌هاست که شناسایی مورفولوژیکی آنها را با مشکل مواجه می‌سازد. قابل ذکر است که عدم تطابق برخی شواهد مورفولوژیک نمونه‌های بررسی شده با نتایج حاصل از مطالعه فیلوژنتیک انجام گرفته در این تحقیق امری غیرمعمول نبوده و در سایر مطالعات فیلوژنتیک صورت گرفته در سیانوباکتری‌ها نیز گاه روابط ژنتیکی موجود با نتایج حاصل از رده‌بندی مبتنی بر مورفولوژیک و خصوصیات فنوتیپی در تضاد بوده‌اند (هندرایانتی و همکاران، 2018؛ جیوگر و هوفمن، 2004؛ ایتمن و همکاران، 2002). طول ژن رمزکننده قطعه 16S rDNA حدود 1500 جفت باز می‌باشد که بایستی طول کامل آن در پایگاه‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. ولی معمولاً به منظور صرفه‌جویی در هزینه، تنها به توالی‌یابی 300 تا 700 جفت باز اکتفا می‌شود که ضمن دقت لازم در تفسیر نهایی شاید عدم تطابق ذکر شده را منجر شود (ماکری، 2002).

نتایج حل‌کنندگی فسفات

حل‌کنندگی فسفات سیانوباکتری‌های خالص‌سازی شده (30 جدایه) در پتری‌های حاوی محیط کشت جامد و تری‌کلسیم فسفات (0/3 درصد) بطور کیفی تعیین گردید. توسعه هاله شفاف اطراف کلنی سیانوباکتری‌ها به‌وضوح مشاهده نگردید. هرچند برخی محققین ارزیابی حل‌کنندگی فسفات به روش پتری‌دیش (تولید هاله) را روش معتبری نمی‌دانند (جوهری و همکاران، 1999).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های فسفر حل شده به روش کمی توسط جدایه‌های سیانوباکتری‌ها برای روز 15 ام و روز 30 ام بعد از تلقیح اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین جدایه‌های سیانوباکتری نشان داد.

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه میانگین فسفر معدنی محلول روشناور و فسفر کل روشناور در روزهای 15 و 30 بعد از تلقیح در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول 3). غلظت فسفر معدنی محلول در روز پانزدهم بعد از تلقیح بین 24 تا 641 میلی‌گرم فسفر بر لیتر متغیر بود. جدایه *Anabaena* sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه جدایه‌ها از لحاظ مقدار حل‌کنندگی فسفات (641 میلی‌گرم فسفر بر لیتر) برتری قابل ملاحظه‌ای را نشان داد، و بعد از آن بیشترین غلظت فسفر معدنی محلول (130/4 میلی‌گرم فسفر بر لیتر) را جدایه *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 نشان داد (جدول 3). در اغلب جدایه‌ها میزان فسفر معدنی محلول روشناور محیط کشت با گذشت زمان در روز 30 ام کاهش یافت که می‌تواند به دلیل تغییر مرحله رشدی جدایه‌ها و تبدیل شدن به شکل آلی فسفر باشد چون سیانوباکتری‌ها به‌عنوان یک مخزن[1] کارآمد برای فسفر در نظر گرفته می‌شوند (ماندال، 1992). با توجه به اندازه‌گیری pH محیط کشت (جدول 3)، عموماً جدایه‌هایی که توانایی حل‌کنندگی فسفر بیشتری داشتند pH محیط کشت آنها کمتر بوده است چرا که اسیدی کردن محیط با تولید اسیدهای آلی و یا با آزاد کردن یون هیدروژن، یکی از فرآیندهای میکروبی حل شدن فسفات معدنی می‌باشد (ماندال، 1992؛ یاندجری و همکاران، 2011). تولید اسید فتالیک به‌عنوان یک شیوه ممکن برای حل‌کنندگی فسفر توسط سیانوباکتری‌ها توسط یاندجری و همکاران (2011) پیشنهاد شده است. براساس نظرات محققان، این میکروارگانیسم‌ها با اکسیداسیون ناقص قندها، اسیدهای آلی تولید می‌کنند.

این اسیدها از طریق کاهش pH منطقه پیرامون ریشه و کلات نمودن یون‌های آلومینیم و کلسیم موجود در خاک‌های اسیدی و قلیایی منجر به افزایش فسفر قابل دسترس می‌شوند (کیوسی، 1983). تولید اسیدهای آلی و پروتون و ایجاد کلات توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات معدنی، کاملاً به اثبات رسیده است (موخرجی و همکاران، 2015). اوسبورن و رنگل (2002) بیان کردند که جذب فسفر با سطح تماس ریشه ارتباط دارد، به‌طوری‌که افزایش سطح تماس ریشه باعث جذب فسفر توسط ارقام گیاهی و کاهش تثبیت فسفر توسط ذرات خاکی شد. از سوی دیگر فعالیت میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات نیز منجر به هیدرولیز ترکیبات آلی شده و قابلیت استفاده فسفر معدنی برای گیاه را افزایش دادند.

نتایج آزمایش گلدانی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که پیامد تیمارهای سیانوباکتری بر صفت عملکرد دانه در سطح احتمال پنج درصد و بر ویژگی‌های ارتفاع بوته، طول خوشه و درصد دانه پوک در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری بود، و بر ویژگی‌های تعداد پنجه، تعداد خوشه در گلدان، تعداد دانه پر و تعداد کل دانه پیامد معنی‌داری دیده نشد (جدول 4).

مقایسه میانگین اثر تیمار تلقیح سیانوباکتری‌ها برای صفت عملکرد دانه، عملکرد کاه و اجزای عملکرد در جدول 5 نشان داده شد. مقایسه میانگین میان تیمارها برای صفت عملکرد دانه، سویه *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 بیشترین عملکرد (15/6 گرم در گلدان) را داشته که از لحاظ آماری با تیمار شاهد بدون تلقیح اختلاف معنی‌داری داشته است (23/6 درصد افزایش در مقایسه با شاهد)، بعد از آن، تیمار مربوط به سویه‌های *Anabaena* sp. GGuCy-42، *Calothrix* sp. GGuCy-43 و *Chroococcus* sp. GGuCy-34 به ترتیب بیشترین عملکرد دانه را نشان دادند. میزان جذب عناصر غذایی نیتروژن و فسفر در اندام هوایی گیاه برنج در پایان دوره رشد در شکل 3 نشان داده شده است.

1. Sink

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 3- اندازه حل کنندگی فسفر نامحلول توسط سیانوباکتری‌های جداسازی شده از خاک شالیزاری گیلان

جدایه‌های سیانوباکتری	فسفر معدنی محلول (15 روز)	فسفر معدنی محلول (30 روز)	فسفر کل (15 روز)	فسفر کل (30 روز)	pH محیط کشت
	میلی‌گرم فسفر بر لیتر (mgP/l)				
Microcystis sp. GGuCy-02	33/9^{k-m}	18/2^{f-i}	43/8^{n}	22/8^{fg}	7/50
Phormidum sp. GGuCy-11	39/4^{j-m}	19/5^{f-i}	61/3^{n}	37/8^{efg}	7/50
Phormidum sp. GGuCy-12	62/7^{f-k}	33/4^{d-g}	100/1^{i-l}	41/8^{c-g}	8/10
Synechococcus sp. GGuCy-15	24/3^{l-n}	53/0^{cd}	50/2^{n}	63/5^{cde}	7/58
Oscillatoria sp. GGuCy-16	49/4^{h-l}	17/4^{f-i}	82/3l^{m}	33/9^{efg}	6/98
Chrococcous sp. GGuCy-34	53/1^{h-l}	46/1^{cde}	74/9^{l-n}	53/2^{cde}	7/24
Chrococcous sp. GGuCy-35	54/3^{h-k}	64/8^{c}	85/7^{j-m}	75/3^{cd}	6/95
Oscillatoria sp. GGuCy-38	39/4^{j-m}	5/8^{hi}	67/6^{n}	42/3^{c-g}	6/58
Phormidum sp. GGuCy-45	52/5^{h-l}	10/2^{g-i}	82/9^{k-m}	56/2^{cde}	7/05
Anabaena sp. GGuCy-17	641^{a}	281^{a}	821^{a}	309^{a}	6/05
Nostoc sp. GGuCy-19	64/7^{e-i}	18/6^{f-i}	111^{h-k}	28/4^{efg}	6/20
Nostoc sp. GGuCy-20	39/9^{j-l}	34/3^{def}	90/9^{j-m}	56/5^{cde}	6/00
Anabaena sp. GGuCy-21	60/4^{g-k}	10/9^{g-i}	114^{g-j}	39/9^{d-g}	6/84
Anabaena sp. GGuCy-23	102^{bcd}	23/4^{e-i}	155^{bcd}	57/9^{cde}	6/42
Anabaena sp. GGuCy-24	82/8^{d-g}	17/2^{f-i}	184^{b}	50/6^{c-f}	6/35
Cylendrospermum sp. GGuCy-25	130^{b}	38/2^{def}	184^{b}	84/3^{c}	6/09
Calothrix sp. GGuCy-26	117^{ab}	24/8^{e-h}	178^{bc}	28/2^{efg}	7/10
Calothrix sp. GGuCy-27	83/2^{d-g}	18/3^{f-i}	118^{f-i}	29/1^{efg}	7/25
Nostoc sp. GGuCy-31	52/4^{h-l}	16/8^{f-i}	85/0^{k-m}	26/7^{efg}	7/05
Hapalosiphon sp. GGuCy-32	81/8^{d-h}	20/1^{f-i}	111^{g-k}	58/2^{cde}	7/01
Anabaena sp. GGuCy-33	98/4^{cde}	99/5^{b}	176^{bc}	127^{b}	7/15
Westillopsis sp. GGuCy-39	73/5^{d-i}	16/7^{f-i}	137^{e-h}	39/0^{d-g}	7/05
Anabaena sp. GGuCy-41	45/6^{i-l}	20/0^{f-i}	94/5^{i-m}	45/6^{c-f}	6/82
Anabaena sp. GGuCy-42	79/6^{d-i}	16/2^{g-i}	117^{f-i}	42/0^{c-g}	6/21
Calothrix sp. GGuCy-43	61/1^{h-k}	6/3^{hi}	104^{i-k}	41/0^{c-g}	6/85
Nostoc sp. GGuCy-46	79/9^{d-h}	29/6^{d-g}	145^{cde}	38/6^{d-g}	6/40
Nostoc sp. GGuCy-47	90/7^{c-g}	62/6^{c}	139^{def}	84/5^{c}	6/30
Anabaena sp. GGuCy-48	95/3^{c-g}	27/9^{e-h}	169^{bcd}	63/7^{cde}	6/88
Anabaena sp. GGuCy-49	79/4^{d-i}	17/3^{f-i}	123^{f-i}	26/5^{efg}	6/65
Anabaena sp. GGuCy-50	96/7^{cde}	22/1^{f-i}	124^{e-h}	43/3^{c-g}	7/61

حروف یکسان نشان دهنده نداشتن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر پایه آزمون دانکن است.

جدول 4- تجزیه واریانس عملکرد و اجزای عملکرد برنج تلقیح شده با سیانوباکتری‌ها در کشت گلدانی

منبع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع بوته	تعداد خوشه در گلدان	عملکرد دانه	عملکرد کاه	طول خوشه	تعداددانه پر در خوشه	درصد دانه پوک
بلوک	2	86/7	8/04**	20/7*	36/1*	0/79	14/1	14/9
سیانوباکتری	7	337/5**	1/57	13/4*	8/4	6/73**	113/2	35/4**
نیتروژن	3	1206/2**	150/2**	679/8**	1356/1**	37/85**	1345/9**	394/6**
نیتروژن×سیانوباکتری	21	55/8	1/06	5/2	6/5	1/13	38/1	9/9
اشتباه	62	47/8	1/34	6/1	4/9	1/79	63/3	9/7
ضریب تغییرات (CV)		5/3	14/8	13/3	12/2	5/3	10/0	14/7

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 5% و 1%. n.s. غیرمعنی‌دار .

www.SID.ir

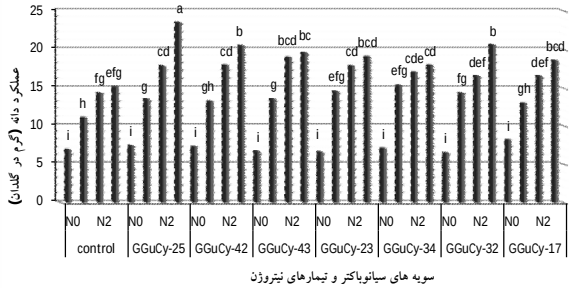
Archive of SID

حداکثر جذب نیتروژن (14/3 گرم در گلدان) در تیمار *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 مشاهده شد که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. از نظر جذب فسفر، گیاه برنج تلقیح شده با سویه‌های *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 و *Anabaena* sp. GGuCy-17 بهترین وضعیت را داشتند. با تلقیح سویه *Cylindrospermum sp.* GGuCy-25 بیشترین عملکرد دانه (15/6 گرم در گلدان) مشاهده شده است. عملکرد دانه در سطوح نیتروژن مصرف شده در همه تیمارهای تلقیح سیانوباکتری افزایشی بود. در تیمار بدون مصرف نیتروژن (N_0) تیمار *Anabaena* sp. GGuCy-17 دارای بیشترین مقدار عملکرد دانه (8/2 گرم در گلدان) بوده است. عملکرد کاه در میان تیمارهای تلقیح شده و تیمار شاهد بدون تلقیح، اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد نشان داد. در تیمار تلقیح شده با سویه *Anabaena* sp. GGuCy-42 بیشترین عملکرد کاه 19/2 گرم در گلدان حاصل گردید که نسبت به شاهد 8/9 درصد افزایش یافت. بعد از آن، سویه‌های *Anabaena* sp. GGuCy-23 (18/9 گرم در گلدان) و *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 (18/2 گرم در گلدان) به ترتیب بیشترین عملکرد کاه را نشان دادند.

جدول 5- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های سیانوباکتری بر ویژگی‌های مورد بررسی در آزمایش گلدانی برنج (سطح احتمال 5 %)

تیمار سیانوباکتری	ارتفاع بوته (سانتیمتر)	تعداد خوشه در گلدان	عملکرد دانه (گرم در گلدان)	عملکرد کاه (گرم در گلدان)	طول خوشه (سانتیمتر)	تعداددانه پر در خوشه	درصد دانه پوک
شاهد بدون تلقیح	120/4^{c}	6/5^{b}	11/93^{c}	17/5^{ab}	23/9^{c}	74/8^{b}	14/7^{a}
Cylindrospermum sp. GGuCy-25	136/1^{a}	7/5^{ab}	15/61^{a}	18/2^{ab}	26/1^{a}	83/0^{a}	9/0^{c}
Anabaena sp. GGuCy-42	129/8^{b}	7/8^{a}	14/79^{ab}	19/2^{a}	24/6^{bc}	76/1^{b}	12/7^{ab}
Calothrix sp. GGuCy-43	132/0^{ab}	7/6^{ab}	14/74^{ab}	17/8^{ab}	25/0^{ab}	78/9^{ab}	9/2^{c}
Anabaena sp. GGuCy-23	135/5^{a}	7/3^{ab}	14/57^{ab}	18/9^{ab}	25/8^{ab}	82/8^{a}	10/0^{bc}
Chroococcus sp. GGuCy-34	128/4^{b}	7/4^{ab}	14/68^{ab}	17/3^{b}	24/9^{bc}	78/2^{ab}	10/9^{bc}
Hapalosiphon sp. GGuCy-32	135/3^{a}	7/2^{ab}	14/51^{ab}	17/2^{b}	26/0^{a}	80/7^{ab}	9/7^{c}
Anabaena sp. GGuCy-17	127/6^{b}	7/1^{ab}	14/12^{b}	17/3^{b}	25/6^{ab}	77/7^{ab}	11/8^{bc}

حرف لاتین یکسان در هر ستون نشان دهنده نداشتن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر پایه آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.



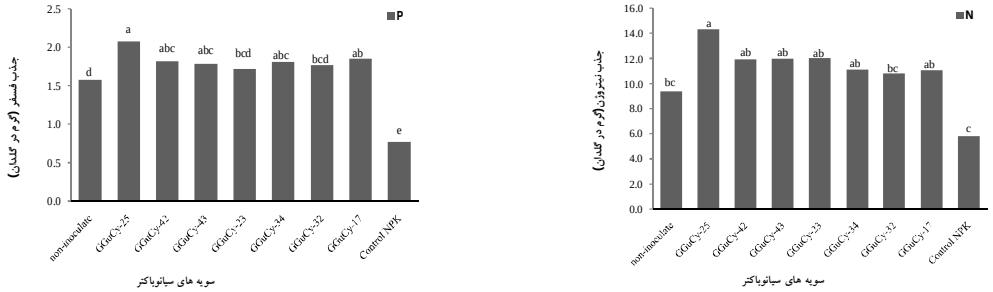
شکل 2- مقایسه میانگین عملکرد دانه برنج برای اثر متقابل تیمار تلقیح سیانوباکتری‌ها و سطوح کود نیتروژن تیمار کودی N_0، N_1، N_2 و N_3 به ترتیب صفر، 0/23، 0/35و 0/46 گرم اوره در گلدان با 7 سویه برتر گزینش شده سیانوباکتری و تیمار شاهد بدون باکتری

این نتایج با یافته‌های محققان مطابقت دارد (روجر و لادها، 1992؛ پراسنا و همکاران، 2013؛ میشرا و همکاران، 2012). قوش و ساها (1992) با تلقیح سیانوباکتری‌ها به میزان 43 کیلوگرم در هکتار نشان دادند که میزان تثبیت نیتروژن در خاک (بیش از 200 درصد متوسط) بطور معنی‌داری افزایش یافت. اثر تلقیح سیانوباکتری در مرحله حداکثر پنجه‌زنی و تشکیل دانه قابل توجه بود، وقتی‌که نیتروژن مصرف نشده بود عملکرد دانه و کاه

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش یافت. عملکرد دانه و کاه با میزان تثبیت نیتروژن در خاک‌های غرقاب و در سیستم ریشه به‌ترتیب در طی مراحل پنجه‌زنی و حداکثر پنجه‌زنی بطور معنی‌داری ارتباط داشت.



شکل 3- مقایسه میانگین جذب نیتروژن و فسفر اندام هوایی گیاه برنج تلقیح شده با سویه‌های برتر سیانوباکتری

در بین سویه‌های تلقیح شده به گیاه برنج از لحاظ جذب نیتروژن و فسفر، سویه *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 بیشترین میزان جذب نیتروژن (14/3 گرم در گلدان) و فسفر (2/08 گرم در گلدان) را نشان داد. این سویه توانایی حل‌کنندگی فسفر بهتری نسبت به بقیه سویه‌ها نیز داشت (جدول 3). این یافته‌ها با نتایج یاندیجری و همکاران (2011)، پراسانا و همکاران (2012 و 2013) و دهار و همکاران (2007) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق با هدف جداسازی و شناسایی سیانوباکتری‌های مناطقی از اراضی استان گیلان، ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیک و مولکولی سیانوباکتری‌ها و ارزیابی سویه‌ها از لحاظ حل‌کنندگی فسفات و در نهایت بررسی اثر تلقیح جدایه‌های برتر به گیاه برنج بنا نهاده شده است. بعد از شناسایی مورفولوژیک جدایه‌ها، شیوه‌های تجزیه فیلوژنتیک در راستای تأیید جنس 10 سویه‌های شناسایی شده مورد استفاده قرار گرفت. در میان نشانگرهای مولکولی مختلفی که جهت مطالعه فیلوژنتیک سیانوباکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد ژن 16S rDNA به نظر مناسب‌ترین ژن برای آنالیز فیلوژنتیک به‌شمار می‌آید. سیانوباکتری‌ها کودهای زیستی ایده‌ال برای بهبود حاصلخیزی خاک و پایداری بلندمدت تولید تحت شرایط اکوسیستم شالیزار مدنظر قرار دارند. کاربرد عملی آنها به‌عنوان منبع کود آلی نیتروژن برای برنج به‌خوبی مشخص شده است. همچنین سیانوباکتری‌ها نشان دادند که دارای خاصیت حل‌کنندگی ترکیبات فسفات معدنی هستند که اهمیت اقتصادی زیادی در تغذیه گیاه برنج دارد. غلظت فسفر در محلول شفاف رویی در روز 15 بعد از تلقیح بین 24 تا 641 میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر متغیر بود و سویه *Anabaena* sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه سویه‌ها از لحاظ اندازه حل‌کنندگی فسفات (641 میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) برتری قابل ملاحظه‌ای را نشان داد، و بعد از آن بیشترین غلظت فسفر محلول (130/4 میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) به سویه *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 تعلق داشت. بطور کلی، نتایج نشان می‌دهد که سیانوباکتری‌های بومی جداسازی شده سبب افزایش عملکرد و بهبود رشد برنج (رقم طارم هاشمی) در شرایط گلدانی شده‌اند ولی کارایی این سویه‌ها متفاوت بوده است. بیشترین عملکرد دانه با سویه‌های *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 و عملکرد کاه با سویه *Anabaena* sp. GGuCy-42 حاصل گردید. با توجه به اینکه برهمکنش سطوح نیتروژن با تلقیح سیانوباکتری‌ها معنی‌دار نشده است، به نظر می‌رسد که سطوح نیتروژن به حدی زیاد نبوده است که خللی در فعالیت و تثبیت بیولوژیک نیتروژن این باکتری‌ها ایجاد کند. با در نظر گرفتن حجم خاک و تعداد گیاه در هر گلدان چنین بر می‌آید که مقادیر نیتروژن مصرفی در حد نیاز بوده و اثر بازدارنده بر فعالیت باکتری نداشته است. برای کاربردی شدن این سویه‌های برتر در جهت توسعه زاد مایه آنها در منطقه نیاز است این سویه‌ها بتوانند به خوبی در آشیان اکولوژیک خود مستقر شوند و حداکثر مزایا را برای محصول فراهم کنند. بدیهی است برای نیل به این هدف، نیاز به انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای با این سویه‌ها می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

فهرست منابع

1. سلطانی ن.، دزفولیان م.، شکروی ش.، بافته‌چی ل.، احسان ش. 1387. جداسازی و شناسایی مورفولوژیک و مولکولی گونه‌های جدید سیانوباکتری از منطقه فیروز کوه (استان تهران) با استفاده از محیط کشت‌های مختلف. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم، جلد8، شماره4.
2. سودایی ص.، نعمت‌زاده ق.، علی‌اصغرزاد ن.، سلطانی ن. 1395. بررسی فیزیولوژیک سیانوباکترهای خاک‌زی شالیزارهای استان گیلان و به‌کارگیری سوی‌های برتر در بهبود رشد و عملکرد گیاه برنج. نشریه دانش آب و خاک، جلد 26، شماره1 : 247-258.
3. Adhya, T.K., Kumar, N., Reddy, G., Podile, A.R., Bee, H. and Samantaray, B. 2015. Microbial mobilization of soil phosphorus and sustainable P management in agricultural soils. Current Science 108: 1280–1287.
4. Aliasgharzad, N. Shirmohamadi, E. and Oustan, S. 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. Soil and Environment 28: 2. 119-123.
5. Bahmanyar, MA. and Soodaee Mashaee, S. 2012. Influences of nitrogen and potassium top dressing on yield and yield components as well as their accumulation in rice (*Oryza sativa*). African Journal of Biotechnology 9(18): 2648-2653.
6. Choudhary, KK., Bimal, R. 2010. Distribution of nitrogen-fixing cyanobacteria (*Nostocaceae*) during rice cultivation in fertilized and unfertilized paddy fields. Nordic Journal of Botany 28: 100-103.
7. Clesceri LS, Greenberg AE and Eaton AD. 1999. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20^{th} ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, pp. 1239-1263.
8. Desikhachary, T. V. 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research Publishers. pp. 565.
9. Dhar, DW., Prasanna, R. and Singh, BV. 2007. Comparative Performance of Three Carrier Based Blue Green Algal Biofertilizers for Sustainable Rice Cultivation. Journal of Sustainable Agriculture 30(2): 41-52.
10. Esfehani, M. Sadrzade, SM., Kavoosi, M. and Dabagh-Mohammad-Nasab, A. 2005. Study the effect of different levels of nitrogen and potassium fertilizers on growth, grain yield, yield components of rice (*Oryza sativa*) cv. Khazar. Iran Agronomy Journal 7(3): 226-241.
11. FAO. 2011. FAO: Food and Agricultural commodities production. Available online at: http://www.faostat.fao.org/site/339/default/aspe x/. Accessed 14 April 2011.
12. Ghaderi, A. Aliasgharzad, N. Ostan, S., Olsson, PA. 2008. Efficiency of three Pseudomonas isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). Soil and Environment 27(1): 71-76.
13. Ghosh, TK. and Saha, KC. 1992. Effects of inoculation with N_2-fixing cyanobacteria on the nitrogenase activity in soil and rhizosphere of wetland rice (*Oryza sativa* L.). Biololgy and Fertility Soils 16: 16-20.
14. Gugger, MF. and Hoffmann, L. 2004. Polyphyly of true branching cyanobacteria (*Stigonematales*), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54: 349-357.
15. Hendrayanti, D., Khoiriyah, I., Fadilah, N. and Salamah, A. 2018. Diversity of N_2-fixing cyanobacteria in organic rice field during the cycle of rice crops. Inventing Prosperous Future through Biological Research and Tropical Biodiversity Management. https://doi.org/10.1063/1.5050107.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Iteman, I., Rippka, R., TandeandeMarsac, N.,and Herdman, M. 2002. 16 rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera Anabaenopsis and Cyanospira. Microbiology 148: 481-496.
17. Johansson, C. and Bergman, B. 1994. Reconstitution of the symbiosis of Gunnera manicata Linden: cyanobacterial specificity. New Phytology 126:643–652.
18. John, D. M. Whitton, B. A. and Brook, A.J. 2003. The freshwater algal flora of the British Isles, an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press.
19. Johri, JK., Surange, S. and Nautiyal, CS. 1999. Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. Current Microbiology 39: 89–93.
20. Karthikeyan, N. Prasanna, R. Nain, L. Kaushik, B.D. 2007. Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. European Journal of Soil Biology 43 (1): 23-30.
21. Kaushik, B.D. 1987. Laboratory Methods for Blue-green Algae. Associated Publishing Company. Pp. 171.
22. Khan, M.S. Zaidi, A. Wani, P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. Agronomy Sustainable Development 27: 29-43.
23. Komarek, J., Kastovsky, J., Mares, J. and Johansen, LR. 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia 86: 295–335.
24. Korelusova, J. 2005. Polyphasic approach to the phylogeney of selected cyanobacteria. BC. Theses Faculty of Biology Science, University of south Bohemia, 139pp.
25. Kucey, R.M.N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Canadian Journal of Soil Science 63(4): 671-678.
26. Lyra, C. Hantula, J. Vainio, E. Rapala, J. Rouhiainen, L. and Sivonen, K. 1997. Characterization of Cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. Archives of Microbiology 168, 176-184.
27. Macrae, A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbiology ecology. Brazilian Journal of Microbiology 31:77-82.
28. Madingan, M.T., Martinko J.M., Stahl D.A. and Clark D.P. 2012. Brock Biology of Microorganisms (13^{th} ed).pp. 532-536. Publishing as Benjamin Cummings, San Francisco. Manufactured in the U.S.A.
29. Mandal, B., Das, SC. and Mandal, LN. 1992. Effect of growth and subsequent decomposition of cyanobacteria on the transformation of phosphorus in submerged soils. Plant and Soil 143: 289-29.
30. Mishra, U. Choudhary, KK, Pabbi, S, Dhar, DW, Singh, PK. 2005. Influence of blue green algae and Azolla inoculation on specific soil enzymes under paddy cultivation. Asian Journal Microbiology and Biotechnology Environmental Science 7: 9-12.
31. Mishra, U. Choudhary, KK. Pabbi, S. Dhar, DW. Singh, PK. 2004. Influence of blue green algae and Azolla inoculation on specific soil enzymes under paddy cultivation. Asian Journal Microbiology and Biotechnology Environmental Science 7: 9-12.
32. Mukherjee, C., Chowdhury, R. and Ray, K. 2015. Phosphorus Recycling from an Unexplored Source by Polyphosphate Accumulating Microalgae and Cyanobacteria — A Step to Phosphorus Security in Agriculture. Frontiers in Microbiology 6: 1-7.
33. Nain, L., Rana A. Joshi M., Jadhav, S.D. Kumar D. Shivay, Y.S. Paul, S. Prasanna R. 2010. Evaluation of synergistic effects of bacterial and cyanobacterial strains as biofertilizers for wheat, Plant and Soil 331: 217–230.
34. Nuble, U., Garcial-Pichel, F. and Muyzer, G. 1997. PCR primers to amplify 16s rDNA gene from Cyanobacteria, Applied Environmental Microbiology 63: 3327-3332.

www.SID.ir

Archive of SID

35. Osborne, LD. and Rengel Z. 2002. Screening cereals for genotypic variation in efficiency of phosphorus uptake and utilisation. Australian journal of agricultural research 53.3: 295-303.
36. Pandey, VD. and Parveen, S. 2011. Alkaline phosphatase activity in cyanobacteria: physiological and ecological significance. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 1(4), 295-303.
37. Prasanna, R. Jaiswal, P. Shrikrishna, J. Joshi, M., Nain, L., Rana, A. and Shivay, YS. 2012. Evaluating the potential of rhizo-cyanobacteria as inoculants for rice and wheat. Journal of Agricultural Technology 8(1): 157-171.
38. Prasanna, R., Sharma, E., Sharma, P., Kumar, A., Kumar, R., Gupta, V., Pal, R.K., Shivay, Y.S., Nain, L. 2013. Soil fertility and establishment potential of inoculated cyanobacteria in rice crop grown under non-flooded conditions. Paddy Water Environmental 11:175–183.
39. Ray, K., Mukherjee, C. and Ghosh, AN. 2013. A Way to Curb Phosphorus Toxicity in the Environment: Use of Polyphosphate Reservoir of Cyanobacteria and Microalga as a Safe Alternative Phosphorus Biofertilizer for Indian Agriculture. Environmental Science Technology 47: 11378−11379.
40. Roger, P.A. and Ladha, J. K. 1992. Biological N2-fixation in wetland rice fields, estimation and contribution to nitrogen balance. Plant and Soil 141, 41–55.
41. Stanier, R.Y. Kunisawa, R. Mandal, M. and Cohen-Bazire, G. 1971. Purification and properties of unicellular blue green algae (Order: Chroococcales), Bacteriological Reviwe. 35: 171-305.
42. Yandigeri, MS. Yadav, AK. Srinivasan, R. Kashyap, S. Pabbi, S. 2011. Studies on mineral phosphate solubilization by cyanobacteria Westiellopsis and Anabaena, Microbiology 80(4): 558-565,
43. Yang, J. Zhang, J. 2010 Crop management technique to enhance harvest index in rice. Journal of Experimental Botany, 61: 3177-3189.
44. Yu, X. Liu, X. Zhu, TH. Liu, GH. Mao, C. 2011. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization, Biology and Fertility Soils 47 (4): 437–46.

www.SID.ir

Archive of SID

Phosphate solubilizing efficiency of cyanobacteria isolated from paddy soil and their effects on rice (*Oriza sativa* L.) yield and phosphorus uptake

S. Soodaee Mashaee[1], N. Aliasgharzad, G. A. Nehmatzadeh, and N. Soltani

Assistant Professor, Dept. of Soil Science and Engineering, Shahrekord University ; E-mail: ssoodaie78@gmail.com

Professor of soil biology and biotechnology, Department of Soil Science, University of Tabriz; E-mail: n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

Professor of biotechnology, The Sari University of Agricultural and Natural Resources and Biotechnology Institute of Tabarestan, Mazandaran; E-mail: gh.nematzadeh@sanru.ac.ir

Professor, Department of Biology, Research Institute of Applied Science, Shahid Beheshti University, Tehran; E-mail: soltani6@yahoo.com

Received: September, 2018 & Accepted: March, 2019

Abstract

Phosphorus is one of the most important and essential elements for plant growth but it is not available for plants in many soils. Inoculation of paddy soils with phosphate solubilizing cyanobacteria is an efficient procedure for supplying phosphorus for rice plants. In this study, cyanobacteria isolated from Guilan paddy fields and purified. Cyanobacteria isolates identified by using morphological characteristics and molecular techniques. Their phosphate solubilization ability was evaluated and then superior strains for rice pot planting (*Tarom Hashemi* cultivar) was selected. A greenhouse experiment was conducted to evaluate the selected cyanobacteria isolates. The experiment carried out in a factorial completely randomized design with four levels of nitrogen (0, 0.23, 0.45 and 0.46 g urea per pot) and seven strains of cyanobacteria and control without bacteria with three replications. The results showed that the isolates were classified into four phyla of *Chroococcales*, *Oscillatoriales*, *Nostocales* and *Stigonematales*. *Anabaena* sp. GGuCy-17 strain had the highest phosphate solubilizing potential (641 $mg.L^{-1}$) compared to other strains, and the *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 (130 $mg.L^{-1}$) was the second in this respect. The highest grain yield (15.6 $g.pot^{-1}$), the highest total nitrogen (14.3 $g.pot^{-1}$) and phosphorus uptake (2.8 $g.pot^{-1}$) were obtained in plants inoculated with *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25. After further studies in different paddy field conditions, these efficient strains could be accounted for production of cyanobacterial biofertilizers to improve rice growth and yield.

Keywords: Phosphorus uptake, 16S rDNA gene, Phosphate solubilizing cyanobacteria, Grain yield.

[1]. Corresponding author: Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran. P.O.Box: 115.

www.SID.ir