Archive of SID

نشریه دانش آب و خاک / جلد 26 شماره 1/1 صفحه‌های 247 تا 258/ سال 1395

بررسی فیزیولوژیک سیانوباکترهای خاک‌زی شالیزارهای استان گیلان و به‌کارگیری سویه‌های برتر در بهبود رشد و عملکرد گیاه برنج

صاحب سودایی مشایی[1]*، قربانعلی نعمت‌زاده[2]، ناصر علی‌اصغرزاد[3]، ندا سلطانی[4]

تاریخ دریافت: 93/12/03 تاریخ پذیرش: 94/09/04

1- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
2- استاد گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، ساری
3- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
4- استاد پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
*مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ssoodaie78@gmail.com

چکیده

با نگاه به نقش بسیار مهم سیانوباکترها در تثبیت و فراهم آوردن نیتروژن مولکولی، در این پژوهش تلاش شد تا ضمن جداسازی سویه‌های سیانوباکتری بومی شالیزارهای استان گیلان، پاسخ‌های فیزیولوژیک آن‌ها نیز در راستای ساخت کود زیستی بررسی شود. پس از جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سیانوباکترها، اندازه کلروفیل، فیکوبیلی پروتئین‌ها و اندازه فعالیت نیتروژنازی جدایه‌ها ارزیابی‌شده و سپس جدایه‌های برتر برای کشت گلدانی گیاه برنج انتخاب شدند. این بررسی نشان داد که در میان جدایه‌های سیانوباکتری از دیدگاه کمیت فیکوبیلی پروتئین‌ها، جدایه‌های Nostoc sp. GGuCy-47، Nostoc sp. GGuCy-46، Anabaena sp. GGuCy-21، Cylindrospermum sp. GGuCy-25 و Anabaena sp. GGuCy-42 برتر هستند. همچنین جدایه‌هایی که دارای اندازه بیشتری از فیکوبیلی پروتئین‌ها بودند، توان تثبیت نیتروژن بیشتری نیز داشتند، به‌ویژه دو جدایه Cylindrospermum sp. GGuCy-25 و Anabaena sp. GGuCy-42 که بیشترین فعالیت نیتروژنازی را داشتند. بر پایه یافته‌ها، سیانوباکترهای بومی جداسازی شده سبب افزایش عملکرد و بهبود عوامل رشد برنج (رقم طارم هاشمی) شده‌اند که این اندازه در میان جدایه‌های گوناگون ناهمانند بود. جدایه‌های Cylindrospermum sp. GGuCy-25 و Anabaena sp. GGuCy-42 را شاید بتوان مانند سویه‌های برتر در ساخت کود زیستی برای شالیزارهای بررسی‌شده بکار گرفت.

واژه‌های کلیدی: برنج، تثبیت نیتروژن، رنگیزه‌ها، سیانوباکتری، فیکوبیلی پروتئین

www.SID.ir

Archive of SID

Physiological Study of Soil-Born Cyanobacteria of Rice Fields in Guilan and Application of Efficient Strains in Improving Growth and Yield of Rice

S Soodaee Mashaee[1*], G Nematzadeh[2], N Aliasgharzad[3], N Soltani[4]

Received: 22 February 2015 Accepted: 25 November 2015
[1-] Ph.D Student of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agric., Univ., of Tabriz, Iran
[2-] Prof., Dept. of Plant Breeding, Genetics & Agric., Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari, Iran
[3-] Prof., Dept. of Soil Science, Faculty of Agric., Univ., of Tabriz, Iran
[4-] Prof., Research Institute of Applied Sciences, Shahid Beheshti University, Iran
[*] Corresponding Author, Email: ssoodaie78@gmail.com

Abstract

With regard to the crucial role of cyanobacteria in molecular nitrogen fixation, the present study was aimed to isolate the native strains of cyanobacteria from paddy fields in Guilan province, and also examined their important physiological characteristics for production of bio-fertilizer. After isolation, purification and identification of efficient cyanobacterial isolates, chlorophyll content, phycobiliproteins and nitrogenase activity of isolates were determined, and then efficient strains for pot cultivation of rice plants were selected. The results showed that the Nostoc sp. GGuCy-47, Nostoc sp. GGuCy-46, Anabaena sp. GGuCy-21, Cylindrospermum sp. GGuCy-25 and Anabaena sp. GGuCy-42 had the higher phycobiliproteins content. Thus isolates which had higher content of phycobiliproteins also had a greater nitrogen fixing capacity, especially the two isolates Cylindrospermum sp. GGuCy-25 and Anabaena sp. GGuCy-42 possessed the highest nitrogenase activity. Based on the results obtained, the efficient isolates of cyanobacteria increased grain yield and improved the growth of the rice (cv. Tarom Hashemi) but the amount of growth varied among different isolates. Finally, Cylindrospermum sp. GGuCy-25 and Anabaena sp. GGuCy-42, as two more efficient isolates can be used as biofertilizer in rice paddy fields.

Keywords: Cyanobacteria, Nitrogen fixation, Phycobiliprotein, Pigments, Rice

مقدمه

سیانوباکترها (سیانوفیتا[1] یا باکتری‌های سبز- آبی)، پروکاریوت‌هایی با ساختار دیوارهٔ یاخته‌ای از نوع گرم منفی هستند که در طبیعت به ریخت‌های تک‌یاخته‌ای، کلنی شکل و رشته‌ای دیده می‌شوند. داشتن کلروفیل a، مهم‌ترین شناسه‌ای است که این جانداران را از دیگر باکتری‌ها جدا می‌سازد. دو رنگدانه فیکوسیانین[2] و فیکواریترین[3] که نام سبز- آبی این باکتری‌ها وابسته به آن‌ها است به سیانوباکترها رنگ- های گوناگونی می‌دهند (ریاحی 1387، استانیر و کوهن 1977).

سیانوباکترها دارای فیکوبیلی پروتئین‌ها هستند که در کمپلکس‌های چند مولکولی با نام فیکوبیلی‌زوم‌ها سازمان‌دهی شده‌اند و دارای هسته مرکزی از زیر واحدهای آلوفیکوسیانین و زیرساختارهای میله‌ای شکل فیکواریترین و فیکوسیانین هستند (گلازر 1994). کارکرد زیستی ویژه فیکوبیلی پروتئین‌ها برداشت نور فتوسنتزی و رساندن انرژی برانگیختگی به کلروفیل a در مراکز واکنش فتوسیستم II است (گروسمان و همکاران 2001). فیکوبیلی پروتئین‌ها در جذب بخشی از نور کارآیی ویژه‌ای دارند که آن‌ها با کلروفیل جذب

[1] Cyanophyta
[2] Phycocyanin
[3] Phycoerythrin

www.SID.ir

Archive of SID

نمی‌شوند، ازاین‌رو کارایی فتوسنتز را بالا برده و بهره-مندی از نور خورشید را در سیانوباکترها بهبود می-بخشد (سیمونوویک و همکاران 2013).

ازآنجایی‌که برنج در غذای روزانه مردم ایران، دارای جایگاهی ویژه‌ای است، این گیاه در کشاورزی ایران نوعی گیاه زراعی استراتژیک به شمار می‌رود و لزوم نیاز به بهره‌گیری از کودهای زیستی در آینده، شناخت سویه‌های برتر این ریزجانداران برای کاربرد در برنج‌زارها را بسیار سودمند ساخته است. سیانوباکترها به‌طور طبیعی در بیشتر زمین‌های شالیزاری یافت می‌شوند و بدون هیچ هزینه‌ای مایه بهبود حاصلخیزی خاک می‌شوند. سیانوباکترها گروه بسیار بزرگی از جانداران هستند که در زیستگاه‌های گوناگون مانند آب‌های شیرین، شور و خشکی زندگی می‌کنند. فتوتروف بودن و نیاز نداشتن به مواد آلی در کشت سیانوباکترها، از دیدگاه بیوتکنولوژی یک برتری ویژه به شمار می‌رود که سیانوباکترها را در برابر ریزجانداران دیگر برتری می‌بخشد. از سویی داشتن راه‌های سوخت و سازی (متابولیکی) ویژه و آگاهی اندک ما از این جانداران امکان دستیابی به ترکیبات جدید در این ریزجانداران را نیرو می‌بخشد (کولیک 1995).

بررسی گوناگونی زیستی و فراوانی سیانوباکتریایی در خاک‌های گوناگون شالیزاری هندوستان نشان داد که جنس‌های Nostoc و Anabaena بیشترین فراوانی را در همه جایگاه‌های بررسی‌شده دارند. این بررسی نشان داد که به‌کارگیری این جانداران در راستای ساخت کود زیستی ویژه هر منطقه نیاز است تا سیانوباکترها بتوانند بهتر در آشیان اکولوژیکی خود زندگی کنند و بیشترین پیامد سودمند را برای گیاهان فراهم کنند (پراسانا و نایاک 2007). مظهر و حسنین (2011) با بررسی سیانوباکترهای جداسازی شده از شالیزارها و ارزیابی آن‌ها همانند کود زیستی نشان دادند که دوسویه از جنس Phormidium دارای توان حل‌کنندگی فسفات، تثبیت نیتروژن اتمسفری و تولید اکسین هستند و دوسویه سبب افزایش 14 و 21 درصدی طول اندام هوایی و 18 و 21 درصدی طول ریشه در گیاه (گندم) مایه‌زنی شده در برابر تیمار شاهد شدند. موضوع بیشتر پژوهش‌ها، جنبه‌های کاربردی سیانوباکترها همانند کود بیولوژیک و تثبیت نیتروژن است. ازآنجایی‌که فرآیند تثبیت نیتروژن در سیانوباکترهای هتروسیست‌دار در شرایط دور از اکسیژن بهتر انجام می‌شود، غرقابی بودن خاک‌های شالیزار و در پی آن کاهش اکسیژن، سبب آن می‌شود تا آنزیم نیتروژناز بهتر فعال شود و فعالیت تثبیت نیتروژن در این زیستگاه‌ها به بیشینه خود برسد (سانترا 1993).

سیانوباکترها ترفندهای گوناگونی برای رویارویی با مشکل توقف عملکرد آنزیم نیتروژناز در برابر اکسیژن در پیش می‌گیرند. برخی سیانوباکترها فاقد توان تثبیت نیتروژن و یا دارای قابلیت تثبیت محدود هستند. برخی دیگر از آن‌ها مانند Plectonema تنها در غلظت‌های کم اکسیژن محیط قادر به تثبیت نیتروژن هستند. تثبیت نیتروژن طی مرحله تاریکی چرخه نوری یکی دیگر از سازوکار سازشی سیانوباکتری‌ها برای حفاظت از آنزیم نیتروژناز به شمار می‌آید. در کنار جدایی زمانی در فرآیند تثبیت نیتروژن و فتوسنتز اکسیژنی، جدایی مکانی نیز یکی از تخصصی‌ترین سازوکار سازشی در این سیانوباکترها محسوب می-شود. این جدایی مکانی در مواردی مانند جنس‌های Trichodesmium و Katagnymene می‌تواند در یاخته‌هایی مشابه با سایر یاخته‌ها و یا در انواعی همانند Nostoc و Anabaena در یاخته‌های تخصص‌یافته مانند هتروسیست صورت گیرد (برمن-فرانک 2003). فرآیند تثبیت نیتروژن در سیانوباکترها به‌وسیله انرژی حاصل از فتوسنتز انجام می‌شود. همچنین در صورت وجود نیتروژن آلی حل‌شده تمایز به‌سمت تولید یاخته‌های هتروسیست متوقف می‌شود و اما در صورت وجود یاخته‌های هتروسیست جذب نیتروژن از آب متوقف می-شود (هنس و بکمن 2006). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که تثبیت نیتروژن سیانوباکترها پس از رشد و تجزیه یاخته در دسترس برنج قرار می‌گیرد و مایه افزایش محصول

www.SID.ir

Archive of SID

برنج می‌شود، ازاین‌رو به سیانوباکترها، کود زنده نیز گفته می‌شود (هاشم 1998).

استان گیلان از قطب‌های مهم کشاورزی کشور است. با نگاه به ارزش بیوتکنولوژیک سیانوباکترها در زمین‌های شالیزاری، نیاز به بررسی‌های همه‌جانبه این جانداران در این استان احساس می‌شود. بدیهی است گام نخست در هر گونه پژوهش اقتصادی، شناخت فلور منطقه است که خود نیاز به بررسی و تعیین ظرفیت‌های بالقوه را می‌طلبد. در برابر پژوهش‌های فراوانی که در دنیا بر این جانداران سودمند انجام‌شده است، پژوهش‌های داخلی، شمار کمی از این پژوهش‌ها را به‌خود اختصاص داده است. در این راستا این پژوهش به جداسازی، خالص-سازی و شناسایی سیانوباکترهای مناطقی از زمین‌های شالیزاری استان گیلان و بررسی برخی ریخت‌شناسی و سوخت و سازی آن‌ها برای شناسایی و معرفی سویه‌های برتر می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

1- نمونه‌برداری خاک

نمونه‌برداری از خاک شالیزاری استان گیلان تا عمق 10 سانتی‌متری (20 نمونه خاک مرکب) از مزارع گوناگون به‌صورت تصادفی انجام‌شده و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند (شکل 1).

شکل 1- نقشه جایگاه‌های نمونه‌برداری شده از شالیزارهای استان گیلان.

2- کشت و جداسازی سیانوباکترها

در آغاز، کشت سیانوباکترهای خاک‌زی انجام شد (کوشیک 1987). برای پیدایش کلنی‌های اولیه سیانوباکتریایی و جداسازی آن‌ها از خاک، 30 گرم از هر نمونه خاک به پتری‌دیش‌های استریل با قطر 9 سانتی‌متر منتقل، سپس مقدار مناسبی از محیط کشت مایع BG11 و $BG11_0$ (بدون نیتروژن) در تیمار جداگانه به آن‌ها افزوده شد (استانیر و همکاران 1971). نمونه‌ها برای 3-4 هفته در اتاق کشت در دمای 27 درجه سلسیوس و شدت نور 2500 لوکس با نور دائمی گذاشته شدند. پس از پیدایش کلنی‌های سیانوباکتریایی بر رویه خاک دارای محیط کشت، نمونه‌های سیانوباکتری به گونه کلنی به پتری‌های دارای محیط کشت جامد BG11 و $BG11_0$ (با افزودن آگار 1/5 درصد) مایه‌زنی شدند. سپس با کشت‌های پی‌درپی (6 مرتبه) نمونه‌های سیانوباکتریایی خالص‌سازی گردیدند. سپس بخشی از کلنی آن‌ها در کشت‌گاه جامد به ارلن‌های 100 میلی‌لیتری دارای محیط کشت مایع (BG11 و یا $BG11_0$) مایه‌زنی شده و برای سه هفته در اتاقک رشد و به‌همراه تکان خوردن (با 150 دور در دقیقه)، گذاشته شدند (جوهانسون و برگمن 1994).

3- ریخت‌شناسی و عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی (SEM[4])

برای شناسایی جدایه‌ها به‌روش ریخت‌شناسی، لام نیمه دائمی از کلنی‌ها آماده‌شده و به کمک میکروسکوپ نوری دوربین‌دار (Olympus CX 40) و کلیدهای شناسایی سیانوباکترها، ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی نمونه‌های جداسازی شده شناسایی شدند (دسیکاچری 1959، پرسکات 1970).

همچنین برای آماده‌سازی عکس میکروسکوپ الکترونی (SEM)، نمونه‌ها برای 4 ساعت در گلوتارآلدهید 2/5 درصد تثبیت و در بافر فسفات (PBS) شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ شده و در غلظت‌های پی‌درپی الکل (10، 30، 50، 70، 90 و 100

[4] Scanning electron micrographs

www.SID.ir

Archive of SID

درصد) آبگیری یا دهیدراته شدند. در پایان، همه نمونه‌ها بر روی تکه‌های فلزی گذاشته‌شده و با لایه‌ای از طلا پوشش داده شدند (دیسترا و همکاران 2007).

4- اندازه‌گیری کلروفیل a و رنگ‌دانه فیکوبیلی پروتئین‌ها

سنجش اندازه کلروفیل a به‌روش پوررا (2002) انجام گردید. برای این کار، سوسپانسیون یکنواخت سیانوباکتریایی آماده و یاخته‌ها با متانول خالص استخراج شدند و بعد از 24 ساعت در دمای 4 درجه سلسیوس، توسط روش طیف‌سنجی در طول‌موج 665 نانومتر اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری فیکوبیلی پروتئین، 3 میلی‌لیتر سوسپانسیون سیانوباکتری با سانتریفوژ دور 14000 دور در دقیقه برای 5 دقیقه ته‌نشین شد و محلول رویی دور ریخته شد. سپس 150 میکرولیتر گلیسرول افزوده‌شده و در دمای 4 درجه سلسیوس برای 4 روز نگهداری شد. پس‌ازآن برای شکسته شدن یاخته‌ها به آن 1350 میکرولیتر آب و 100 میکرولیتر استات سدیم 0/3 نرمال افزوده گردید. این محلول برای دو روز در تاریکی و سرما نگهداری شد. سپس با سانتریفوژ محلول شفاف رویی جداشده و جذب نور در طول‌موج‌های 562، 652، 615 و 750 نانومتر اندازه‌گیری شد. اندازه فیکواریترین (PE)، فیکوسیانین (PC) و آلوفیکوسیانین (AP) طبق روابط تجربی زیر برآورد شده و در پایان با جمع سه رنگیزه، اندازه فیکوبیلی پروتئین کل به‌دست آمد (برمجو و همکاران 2002).

$$PE\ (\mu g/ml)= [1000(A_{652}-A_{750})-208(A_{615}-A_{750})]/5.09$$

رابطه 2
$$PC\ (\mu g/ml)= [1000(A_{615}-A_{750})-474(A_{652}-A_{750})]/5.34$$

رابطه 3
$$AP\ (\mu g/ml)= [1000(A_{562}-A_{750})-2.41(PC)-0.948(AP)]/9.62$$

5- فعالیت نیتروژنازی

توان تثبیت نیتروژن مولکولی با روش احیا استیلن به اتیلن (ARA[5]) با دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) اندازه‌گیری شد. 30 میلی‌لیتر از کشت مایع سیانوباکتریایی با چگالی نوری یکسان در یک ارلن 50 میلی‌لیتری ریخته شده و درب ارلن با درپوش پلاستیکی بسته شد. سپس 10 درصد از هوای درون ارلن با حجمی برابر از گاز استیلن جایگزین شد. 0/5 میلی‌لیتر از گاز درون ارلن پیش از انکوباسیون به دستگاه GC تزریق شد. در ادامه ارلن دارای کشت سیانوباکتریایی در شرایط مشابه با شرایط کشت قرار گرفته و پس از 30 دقیقه 0/5 میلی‌لیتر از گاز داخل ارلن برداشته و به دستگاه GC تزریق شد در پایان غلظت اتیلن پدید آمده از احیای استیلن بر حسب نانومول اتیلن بر میلی‌گرم نمونه در ساعت برآورد شد (سلطانی و همکاران 2006، کوشیک 1987).

سویه‌های برتر سیانوباکتریایی شناسایی‌شده بر پایه توان تثبیت نیتروژن اتمسفری و برخی معیارهای محرک رشد گیاه گزینش شدند. این سویه‌ها شامل Anabaena sp. ،Cylindrospermum sp. GGuCy-25 ،GGuCy-42 Anabaena sp. ،Rivularia sp. GGuCy-43 ،GGuCy-23 Chroococcus sp. ،Stigonema sp. GGuCy-32 ،GGuCy-34 و Anabaena sp. GGuCy-17 برای کشت گلدانی آزمون شدند.

6- کشت گلدانی

آزمایش گلدانی برای ارزیابی پیامد کاربرد سویه‌های برتر گزینش‌شده سیانوباکتری بر رشد، عملکرد و اجزای عملکرد گیاه برنج (رقم طارم هاشمی) انجام گردید. برای این کار اندازه‌های گوناگونی از نیتروژن شامل تیمار کودی صفر (N_0)، 0/23 (N_1)، 0/35 (N_2) و 0/46 (N_3) گرم اوره در گلدان (معادل صفر، 100، 150 و 200 کیلوگرم اوره در هکتار) با دو تقسیط و تیمار مایه‌زنی سیانوباکتری با 7 سویه برتر گزینش‌شده و تیمار شاهد بدون مایه‌زنی با سه تکرار آزمایش شد. بنابراین آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی در پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان انجام شد. گلدان‌ها هر کدام با 5 کیلوگرم خاک مزرعه شالیزاری (0 تا 20 سانتی‌متر) پر شده و برای دو هفته غرقاب نگه‌داشته شدند. از کشت

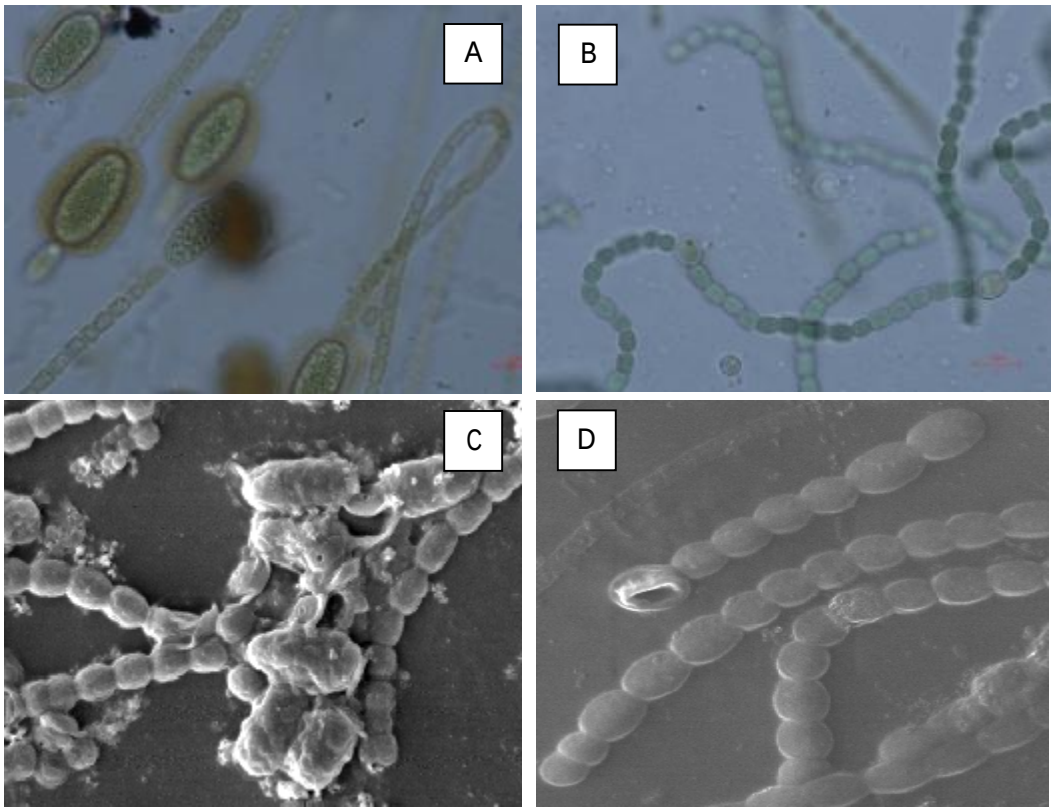
[5] Acetylene Reduction Assay

www.SID.ir

Archive of SID

مایع سیانوباکترهای گزینش‌شده (کشت 15 روزه) همانند زادمایه، به‌اندازه 50 میلی‌لیتر سوسپانسیون (با چگالی نوری 0/550 نانومتر) با پرلیت سترون (20 گرم پرلیت با 50 میلی‌لیتر سوسپانسیون برای هر گلدان) آمیخته‌شده و در خاک هر گلدان در عمق 5 سانتی‌متری خاک گلدان جاگذاری شدند. چند روز پیش از نشا تیمار کود پایه دارای 50 درصد تیمار کود نیتروژن، 0/7 گرم سوپرفسفات تریپل و 0/8 گرم سولفات پتاسیم در گلدان‌ها بکار رفت. سپس بذور برنج رقم طارم هاشمی ضدعفونی شده و با سوسپانسیون سویه‌های سیانوباکتری (با چگالی نوری 0/550 نانومتر) مایه‌زنی شده، درون گلدان‌های مربوط به هر تیمار کاشته شده و پس از گذشت نزدیک 20 روز گیاهچه‌ها تنک شده و در درون هر گلدان 3 بوته نگه‌داشته شد. این گلدان‌ها در گلخانه‌ای نیمه‌باز با شدت نور 3000 لوکس، دمای 30 تا 35 درجه سلسیوس و رطوبت 75 درصد نگهداری شده و آبیاری گلدان‌ها دو بار در هفته انجام شد. در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک بعد از گذشت 115 روز از کاشت بذر، برداشت کامل گیاه انجام‌شده و شمار پنجه، شمار خوشه، ارتفاع بوته‌ها، عملکرد دانه، شمار دانه پر و پوک در هر خوشه، طول خوشه و وزن خشک اندام هوایی گیاه تعیین شدند (بهمنیار و همکاران 2012، اصفهانی و همکاران 2005، پراسانتا و همکاران 2012).

محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها به‌روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد انجام پذیرفت..



شکل2- ریخت‌شناسی جدایه‌های سیانوباکتری با میکروسکوپ نوری (A و B) و میکروسکوپ الکترونی (C و D)، A و C جدایه Cylindrospermum sp. GGuCy-25 و B و D جدایه Anabaena sp. GGuCy-17 هستند.

نتایج و بحث

از میان جدایه‌ها، 30 جدایه خالص‌سازی شده و با عکس‌برداری به‌وسیله میکروسکوپ معمولی و الکترونی برخی ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها بررسی و سپس شناسایی شدند (شکل2). نتایج تجزیه واریانس داده‌های اندازه‌گیری رنگ‌دانه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان دادند، بنابراین مقایسه میانگین

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه رنگیزه‌های فتوسنتزی سیانوباکترهای جداسازی شده در جدول 1 نشان داده‌شده است.

جدول1- اندازه رنگیزه‌های فتوسنتزی و فعالیت نیتروژنازی سیانوباکترهای جداسازی شده از خاک شالیزاری گیلان.

جدایه سیانوباکترها	آلوفیکوسیانین ($\mu gr\ mL^{-1}$)	فیکوسیانین ($\mu gr\ mL^{-1}$)	فیکواریترین ($\mu gr\ mL^{-1}$)	فیکوبیلی پروتئین کل ($\mu gr\ mL^{-1}$)	کلروفیل a ($\mu gr\ mL^{-1}$)	فعالیت نیتروژنازی ($nmol\ C_2H_4\ h^{-1}$)
Microcystis sp. GGuCy-02	0/42^{gh}	0/10^{j}	0/14^{h}	0/66^{j}	0/229^{hijk}	-
Phormidum sp. GGuCy-11	3/78^{fgh}	9/44^{ghij}	17/53^{bc}	30/76^{efg}	0/237^{hijk}	-
Phormidum sp. GGuCy-12	2/41^{fgh}	7/18^{ghij}	11/73de	21/33^{fghij}	0/270^{hijk}	4/46^{i}
Synechocystis sp. GGuCy-15	4/01^{fgh}	0/30^{ij}	0/98^{gh}	5/29^{ij}	0/154^{k}	-
Oscillatoria sp. GGuCy-16	0/25^{gh}	5/83^{ghij}	11/12^{gh}	7/20^{hij}	0/985^{bc}	-
Chroococcus sp. GGuCy-34	0/10^{h}	0/10^{j}	0/14^{h}	0/35^{j}	0/144^{k}	11/25^{fgh}
Chroococcus sp. GGuCy-35	1/49^{gh}	43/94^{bc}	1/50^{gh}	46/93^{cd}	1/184^{b}	-
Oscillatoria sp. GGuCy-38	2/35^{fgh}	33/88^{cd}	1/00^{gh}	37/23^{def}	0/848^{cd}	-
Phormidum sp. GGuCy-45	7/53^{efg}	25/12de	0/29^{h}	32/94^{def}	0/631^{def}	-
Anabaena sp. GGuCy-17	7/01^{fgh}	13/42^{efgh}	8/43^{efg}	28/85^{efgh}	0/219^{ijk}	22/63^{cde}
Nostoc sp. GGuCy-19	8/36^{def}	13/21^{fghi}	19/53^{b}	41/10^{ed}	0/502^{fgh}	6/55^{ghi}
Nostoc sp. GGuCy-20	3/01^{fgh}	8/94^{ghij}	12/07^{cde}	24/02^{fghij}	0/795^{cde}	5/24^{hi}
Anabaena sp. GGuCy-21	14/13^{cd}	23/66^{def}	31/62^{a}	69/41^{bc}	0/382^{ghijk}	10/52^{fghi}
Anabaena sp. GGuCy-23	0/10^{h}	0/61^{ij}	0/12^{h}	0/84^{j}	0/170^{jk}	22/92^{cd}
Anabaena sp. GGuCy-24	4/63^{fgh}	11/66^{ghij}	16/52^{bc}	32/82^{defg}	0/492^{fghi}	11/77^{fgh}
Cylindrospermum sp. GGuCy-25	16/13^{bc}	47/92^{b}	1/57^{fgh}	65/62^{bc}	0/270^{hijk}	56/31^{a}
Calothrix sp. GGuCy-26	4/48^{fgh}	8/28^{ghij}	8/56^{efg}	21/32^{fghij}	1/525^{a}	16/34^{def}
Calothrix sp. GGuCy-27	5/05^{fgh}	7/67^{ghij}	8/04^{efg}	20/76^{fghij}	0/983^{bc}	21/46^{cde}
Anabaena sp. GGuCy-31	6/27^{fgh}	11/01^{ghij}	6/92^{efgh}	24/21^{efghi}	0/446^{fghij}	11/49^{fgh}
Stigonema sp. GGuCy-32	0/76^{gh}	5/43^{ghij}	0/11^{h}	6/31^{hij}	0/256^{hijk}	22/23^{cd}
Anabaena sp. GGuCy-33	0/45^{gh}	2/40^{hij}	1/55^{fgh}	4/41^{ij}	0/538^{efg}	21/11^{cde}
Westillopsis sp. GGuCy-39	1/41^{gh}	8/14^{ghij}	0/11^{h}	9/66^{hij}	0/351^{ghijk}	12/34^{fg}
Anabaena sp. GGuCy-41	0/20^{h}	3/55^{hij}	0/32^{h}	4/08^{ij}	0/771^{cde}	14/63^{ef}
Anabaena sp. GGuCy-42	15/06^{bcd}	15/40^{efg}	23/16^{b}	53/62^{bc}	0/290^{hijk}	38/56^{b}
Rivularia sp. GGuCy-43	3/36^{fgh}	6/52^{ghij}	6/14^{efgh}	16/02^{ghij}	0/281^{hijk}	26/47^{c}
Nostoc sp. GGuCy-46	19/85^{b}	51/46^{b}	4/40^{fgh}	75/71^{ab}	0/345^{hijk}	16/05^{def}
Nostoc sp. GGuCy-47	28/99^{a}	63/54^{a}	1/01^{gh}	93/55^{a}	0/429^{ghijk}	11/22^{fgh}
Anabaena sp. GGuCy-48	3/75^{fgh}	7/17^{ghij}	8/98^{ef}	19/90^{fghij}	0/161^{jk}	14/40^{ef}
Anabaena sp. GGuCy-49	9/56^{def}	17/45^{efg}	10/09de	37/10^{def}	0/732^{def}	10/63^{fgh}
Anabaena sp. GGuCy-50	0/09^{h}	2/79^{hij}	2/11^{fgh}	4/98^{ij}	0/742^{cde}	12/57^{fg}

حروف مشترک نشان‌دهنده نداشتن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر پایه آزمون دانکن است.

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه کلروفیل a در جدایه‌های Calothrix sp. GGuCy-26 ، Chroococcus sp. GGuCy-35 و Oscillatoria sp. GGuCy-16 بیشترین و در جدایه‌های Chroococcus sp. GGuCy-34، Synechocystis sp. GGuCy-15 و Anabaena sp. GGuCy-48 کمترین بود (جدول 1). محتوای کلروفیل a، یکی از معیارهای سنجش زیست‌توده جلبکی در آب‌وخاک است که همانند یک رنگیزه غالب در حدود 1 تا 2 درصد وزن خشک سیانوباکترها را شامل می‌شود (الیزابت 1997).

اندازه فیکوبیلی پروتئین در جدایه‌های Nostoc sp. GGuCy-47، Nostoc sp. GGuCy-46 و Anabaena sp. GGuCy-21 بیشترین مقدار را به‌خود اختصاص دادند (جدول1). اندازه سه رنگیزه فیکوسیانین، آلوفیکوسیانین و فیکواریترین در جدایه Nostoc sp. GGuCy-47 به‌ترتیب 63/5، 28/9 و 1/0 میکروگرم بر میلی‌لیتر و در جدایه Nostoc sp. GGuCy-46 به‌ترتیب 51/4، 19/8 و 4/4 میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داده شد ولی در جدایه Anabaena sp. GGuCy-21 به‌ترتیب 23/6، 14/1 و 36/6 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (جدول 1). فیکوبیلی پروتئین-ها که در سطح استرومای غشا تیلاکوئیدها قرار دارند، مسئول رنگ‌های ویژه سیانوباکترها هستند زیرا این پروتئین‌ها هنگامی‌که سیانوباکتری‌ها تحت شرایط نور کم رشد کنند، می‌توانند نزدیک 40 تا 50 درصد پروتئین کل در یاخته را بسازند (سکار و چاندراموان 2008). فیکوبیلی پروتئین‌ها، همانند آنتن‌های نخستین گیرنده نوری برای فتوسیستم II (PSII) عمل می‌کنند. انتقال انرژی به‌وسیله این رنگدانه‌های اضافی از فیکواریترینبه فیکوسیانین و سپس به آلوفیکوسیانین و در پایان به گیرنده‌های نور با طول موج بالا می‌رسد (سلطانی و همکاران 2006). بنابراین توان فتوسنتزی در این جدایه-ها بیشتر از جدایه‌های دیگر است. نسبت فیکوبیلی پروتئین به کلروفیل a، معمولاً به‌عنوان نسبت سیستم فتوسنتزی II (PSII) به سیستم فتوسنتزی I (PSI) در نظر گرفته می‌شود (پارمار و همکاران 2013، سلطانی و همکاران 2006). بیشترین اندازه این نسبت در جدایه‌های Cylindrospermum sp. GGuCy-25، Nostoc sp. GGuCy-46 و Nostoc sp. GGuCy-47 به‌ترتیب 246/3، 222/8 و 220/6 هست.

مقایسه میانگین اندازه فعالیت نیتروژنازی جدایه-های سیانوباکتری در سطح احتمال 5 درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول 1). برترین جدایه‌های سیانوباکتریایی از دیدگاه فعالیت نیتروژنازی Cylindrospermum sp. GGuCy-25، Anabaena sp. GGuCy-42، Rivularia sp. GGuCy-43، Stigonema sp. GGuCy-32، Anabaena sp. GGuCy-23 و Anabaena sp. GGuCy-17 بودند که به‌ترتیب 56/3، 38/6، 26/5، 22/3، 22/9 و 22/7 نانومول اتیلن بر ساعت تولید کردند. این جدایه‌های برتر در کشت گلدانی آزمون شدند. برخی جدایه‌ها هم هیچ فعالیت نیتروژنازی نشان ندادند (جدول1). سیانوباکترها می‌توانند نیتروژن هوا را تثبیت کنند و فراوانی آن‌ها در شالیزارها اهمیت بسیاری دارد (پراسانا و همکاران 2012، سینا و هادر 1996). اثبات شده که نزدیک 40 درصد نیتروژن تثبیت‌شده سیانوباکترها در گیاه برنج استفاده می‌شود (وایشامپایان و همکاران 1998).

آزمایش گلدانی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که پیامد تیمارهای سیانوباکتری بر صفت عملکرد دانه در سطح احتمال 5 درصد و بر ویژگی‌های بلندی بوته، زمان تا پنجاه‌درصد گلدهی، درازی خوشه، درصد دانه پوک و سطح برگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌داری بود، و بر ویژگی‌های شمار پنجه، شمار خوشه در گلدان، شمار دانه پر و شمار کل دانه پیامد معنی‌داری دیده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول2: مقایسه میانگین اثر جدایه‌های گوناگون سیانوباکتری بر صفات موردبررسی در آزمایش گلدانی برنج (سطح احتمال 5%).

تیمار سیانوباکتری	تعداد پنجه یک ماه بعد نشا	بلندی بوته (cm)	زمان تا 50 درصد گلدهی (day)	شمار خوشه در گلدان	عملکرد دانه (gr pot^{-1})	وزن خشک اندام هوایی (gr pot^{-1})	طول خوشه (cm)	شمار دانه پر در خوشه	درصد دانه پوک در خوشه	سطح برگ (cm^2)
شاهد بدون تلقیح	7/00^{a}	120/4^{c}	67/4^{a}	6/5^{b}	11/93^{c}	17/8^{ab}	23/9^{c}	74/8^{b}	14/7^{a}	20/8^{e}
Cylindrospermum sp. **GGuCy-25**	7/16^{a}	136/1^{a}	65/6^{b}	7/5^{ab}	15/61^{a}	17/3^{b}	26/1^{a}	83/0^{a}	9/0^{c}	30/1^{a}
Anabaena sp. **GGuCy-42**	7/83^{a}	129/8^{b}	62/2^{d}	7/8^{a}	14/79^{ab}	19/2^{a}	24/6^{bc}	76/1^{b}	12/7^{ab}	24/7^{cd}
Rivularia sp. **GGuCy-43**	8/16^{a}	132/0^{ab}	64/7^{bc}	7/6^{ab}	14/74^{ab}	17/8^{ab}	25/0^{ab}	78/9^{ab}	9/2^{c}	26/6^{bcd}
Anabaena sp. **GGuCy-23**	7/75^{a}	135/5^{a}	65/6^{b}	7/3^{ab}	14/57^{ab}	18/9^{ab}	25/8^{ab}	82/8^{a}	10/0^{bc}	27/1^{bc}
Chroococcus sp. **GGuCy-34**	7/41^{a}	128/4^{b}	64/6^{bc}	7/4^{ab}	14/68^{ab}	18/2^{ab}	24/9^{bc}	78/2^{ab}	10/9^{bc}	24/1^{d}
Stigonema sp. **GGuCy-32**	7/66^{a}	135/3^{a}	63/6^{c}	7/2^{ab}	14/51^{ab}	17/2^{b}	26/0^{a}	80/7^{ab}	9/7^{c}	28/8^{ab}
Anabaena sp. **GGuCy-17**	7/33^{a}	127/6^{b}	59/0^{c}	7/1^{ab}	14/12^{b}	17/3^{b}	25/6^{ab}	77/7^{ab}	11/8^{bc}	25/5^{cd}

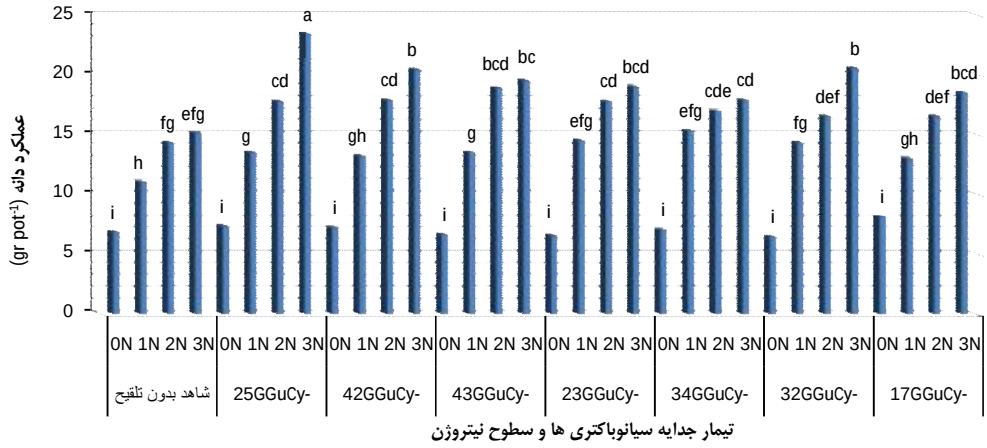
حروف مشترک نشان‌دهنده نداشتن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر پایه آزمون دانکن است.

مقایسه میانگین میان تیمارها (جدول 2) برای صفت عملکرد دانه، جدایه Cylindrospermum sp. GGuCy-25 بیشترین عملکرد (15/61 گرم در گلدان) را داشته که از لحاظ آماری با تیمار شاهد اختلاف معنی-داری داشته است (23/6 درصد افزایش در برابر شاهد)، بعدازآن، جدایه‌های Anabaena sp. GGuCy-42، Rivularia sp. GGuCy-43 و Chroococcus sp. GGuCy-34 به‌ترتیب بیشترین عملکرد دانه را نشان دادند. از لحاظ زمان تا 50 درصد گلدهی، تلقیح سیانوباکترها سبب کوتاه شدن این زمان شده است به‌ویژه در جدایه‌های Anabaena sp. GGuCy-17 و Anabaena sp. GGuCy-42 که اختلاف 8 الی 5 روز تا 50 درصد گلدهی را در برابر تیمار شاهد بدون تلقیح سیانوباکتری دارند. وزن خشک اندام هوایی میان تیمارهای مایه‌زنی شده و تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد نشان داد، که در جدایه‌های Anabaena sp. GGuCy-42 و Anabaena sp. GGuCy-23 به بیشترین مقدار رسید. این نتایج با یافته-های سایر محققان مطابقت دارد (روجر و لادها 1992، روجر و همکاران 1987، پراساننا و همکاران 2012، میشرا و پابی 2004).

مقایسه میانگین اثر متقابل تیمار تلقیح سیانوباکتری و سطوح نیتروژن برای صفت عملکرد دانه در شکل 1 نشان داده می‌شود. تفاوت عملکرد دانه در سطوح نیتروژن مصرف‌شده در همه تیمارهای تلقیح سیانوباکتری افزایشی بود. در تیمار بدون مصرف نیتروژن (N_0) جدایه Anabaena sp. GGuCy-17 دارای بیشترین مقدار عملکرد دانه (8/2 گرم در گلدان) بوده است. با توجه به اینکه در همه سویه‌های مورد آزمایش، بیشینه عملکرد دانه در سطح N_3 حاصل‌شده ولی در اکثر سویه‌ها با سطح N2 اختلاف معنی‌داری ندارد بنابراین می‌توان با کاهش مصرف کود اوره از 200 به 150 کیلوگرم در هکتار و به‌کارگیری سویه‌های سیانوباکتریایی منتخب به عملکرد دانه مناسب دست یافت.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل3- مقایسه میانگین عملکرد دانه برنج برای اثر متقابل تیمار تلقیح سیانوباکتری و سطوح کود نیتروژن.

بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌ها با میکروسکوپ الکترونی نشان داد که یاخته‌های سیانوباکترها از دیدگاه اندازه و قطر متغیر بوده و در دامنه 1-0/5 میکرومتر تا به بزرگی 40 میکرومتر تغییر می‌کنند. دیواره یاخته‌ای سیانوباکترها شبیه به دیواره یاخته‌ای باکتری‌های گرم منفی است. بسیاری از سیانوباکترها پوشش یا غلاف موسیلاژی فراوان تولید می‌کنند، که گروه‌های یاخته‌ای یا رشته‌ای را به همدیگر پیوند می‌دهد (مادیگان و همکاران 2012).

بررسی نتایج نشان داد که در میان جدایه‌های سیانوباکتری ازلحاظ کمیت فیکوبیلی پروتئین‌ها، جدایه-های Nostoc sp. GGuCy-47، Nostoc sp. GGuCy-46، Anabaena sp. GGuCy-21، Cylindrospermum sp. GGuCy-25 و Anabaena sp. GGuCy-42 برتر بودند. فیکوبیلی پروتئین‌ها سیانوباکتری را قادر می‌سازند که در شرایط کم نوری مانند شالیزارها یا درون خاک‌ها با تنش موجود مقابله کنند. فیکوبیلی پروتئین‌ها خود از رنگیزه‌های فیکوبیلینی تشکیل شده‌اند که شامل فیکوسیانین (آبی) و فیکواریترین (قرمز) است. فیکوبیلی پروتئین‌ها انرژی نورانی را به فتوسیستم II منتقل می-کنند و این انرژی جهت تجزیه آب و تولید اکسیژن مصرف می‌شود. قابل‌ذکر است که سیانوباکترها تنها پروکاریوت‌هایی هستند که فتوسیستم II دارند (سیمونوویک و همکاران 2013).

تشکیل هتروسیست در شرایط نور کم افزایش می-یابد که بستگی به قابلیت دسترسی کربن و ATP دارد که از طریق فتوسنتز و متابولیسم‌های اکسیداتیو تأمین می-شوند (ساح 2008). بنابراین میان فعالیت نیتروژنازی و مقدار فیکوبیلی پروتئین‌ها می‌توان ارتباطی برقرار کرد (هنس و بکمن 2006). بررسی نتایج نشان داد که جدایه-هایی که دارای مقادیر بیشتر فیکوبیلی پروتئین‌ها هستند، دارای تثبیت نیتروژن بیشتری نیز هستند به‌ویژه دو جدایه Cylindrospermum sp. GGuCy-25 و Anabaena sp. GGuCy-42 که دارای بیشترین فعالیت نیتروژنازی بودند. بنابراین با افزایش فیکوبیلی پروتئین‌ها و افزایش فتوسنتز سیانوباکترها، اسکلت کربنی موردنیاز برای انجام فعالیت نیتروژنازی فراهم‌شده و انرژی موردنیاز نیز از همین طریق فراهم خواهد شد. تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط سیانوباکترها اهمیت قابل‌ملاحظه‌ای دارد به‌ویژه در سیستمی که منابع دیگر نیتروژن کمتر قابل‌دسترس باشند. زمین‌های شالیزاری غرقاب برنج فرصتی برای استقرار مناسب و مفید سیانوباکترها را فراهم می‌کند که آن‌ها بتوانند با ورود نیتروژن به سیستم، خاک را غنی کرده و مایه افزایش عملکرد محصول شوند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری کلی

به‌طورکلی، نتایج نشان داد که سیانوباکترهای بومی جداسازی شده سبب افزایش عملکرد و بهبود عوامل رشد برنج (رقم طارم هاشمی) در شرایط گلدانی شده است که میان جدایه‌های گوناگون این اندازه متفاوت است. کاربرد عملی این موجودات در جهت توسعه مایه تلقیح مختص هر منطقه نیاز است تا سیانوباکترها بتوانند بهتر در آشیان اکولوژیکی خود مستقر شوند و بیشترین مزایا را برای محصول فراهم کنند (پراساننا و نایاک 2007). جها و پراساد (2006) نشان دادند که مایه تلقیح سیانوباکتریایی عملکرد دانه و کاه برنج را به‌تنهایی یا توأم با کود شیمیایی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد و صرفه‌جویی حدود 25 کیلوگرم نیتروژن در هکتار را از طریق کود زیستی سیانوباکتریایی به‌دست آورند. در پایان میان این جدایه-ها، جدایه‌های Cylindrospermum sp. GGuCy-25 و Anabaena sp. GGuCy-42 را می‌توان همانند سویه‌های برتر در بهبود رشد و عملکرد برنج در شرایط گلدانی مورداستفاده قرار داد. همچنین پیشنهاد می‌شود این سویه‌ها در شرایط گوناگون شالیزاری نیز مورد آزمایش قرار گرفته و درنهایت در تولید کود زیستی سیانوباکتریایی بکار روند.

منابع مورداستفاده

ریاحی ح. 1387. جلبک‌شناسی. انتشارات دانشگاه الزهرا (س)، 272 صفحه.

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.

Berman-Frank I, Lundgren P. and Falkowski P, 2003. Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. Research in Microbiology 154: 157–164.

Bermejo R, Talavera EM, DelValle C and Alvarez- Pez JM, 2000. C-phycocyanin incorporated into reverse micelles: a fluorescence study. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 18: 51-59.

Desikhachary TV, 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research Publishers pp. 565.

Diestra E, Esteve I, Castell O and Solé A, 2007. Ultrastructural changes in Microcoleus chthonoplastes growing in the presence of crude oil. Applications for Ecological Studies. Modern Research and Educational Topics in Microscopy 453-460.

Elizabeth JA, 1997. Method 446.0, in vitro determination of chlorophylls a, b, c1 + c2 and pheopigments in marine and freshwater algae by visible spectrophotometry. U.S. Environmental Protection Agency 1–26.

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.

Glazer AN, 1994. Phycobiliproteins—a family of valuable, widely used fluorophores. Journal of Applied Phycology 6: 105–112.

Grossman AR, Bhaya D and He Q, 2001. Tracking the light environment by cyanobacteria and the dynamic nature of light harvesting. The Journal of Biological Chemistry 276: 11449–11452.

Hashem MA, 1998. Ecophysiological Studies of Cyanobacteria in Paddy Soils of Bangladesh. Kluwer Academic Publishers, printed in Great Britian 39: 333-344.

Hense I and Beckmann A, 2006. Towards a model of cyanobacteria life cycle-effects of growing and resting stages on bloom formation of N_2-fixing species. Ecological Modeling 195: 205-218.

Jha MN and Prasad AN, 2006. Efficacy of new inexpensive cyanobacterial biofertilizer including its shelf-life. World Journal of Microbiology and Biotechnology 22: 73–79.

Johansson C. and Bergman B, 1994. Reconstitution of the symbiosis of Gunnera manicata Linden: cyanobacterial specificity. New Phytologist 126: 643-652.

Kaushik BD, 1987. Laboratory Methods for Blue-green Algae. Associated Publishing Company 171pp.

Kulik MM, 1995. The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. European Journal of Plant pathology 101(6): 585-599.

Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA and Clark DP, 2012. Brock Biology of Microorganisms (13th ed). Publishing as Benjamin Cummings, San Francisco. Manufactured in the U.S.A.

Mazhar S and Hasnain S, 2011. Screening of native plant growth promoting cyanobacteria and their impact on Triticum aestivum var. Uqab 2000 growth. African Journal of Agricultural Research 6(17): 3988-3993.

www.SID.ir

Archive of SID

Mishra U and S Pabbi, 2004. Cyanobacteria: a potential biofertilizer for rice. Resonance 6–10. (www.ias.ac.in/resonance/Volumes/09/06/0006-0010.pdf).

Parmar A, Singh NK, Dhoke R and Madamwar D, 2013. Influence of light on phycobiliprotein production in three marine cyanobacterial cultures. Acta Physiol Plant 35: 1817–1826.

Porra RJ, 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynthesis Research 73: 149–156.

Prasanna R and Nayak S, 2007. Influence of diverse rice soil ecologies on cyanobacterial diversity and abundance. Wetlands Ecology and Management 15: 127–134.

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.

Prescott GW, 1970. Algae of the Western Great Lakes Area. W.M.C. Brown Company Publishers. 977 pp.

Roger PA and Ladha J K, 1992. Biological N2-fixation in wetland ricefields, estimation and contribution to nitrogen balance. Plant and Soil 141: 41–55.

Roger PA, Santiago-Ardalles S, Reddy PM and Watanabe I, 1987. The abundance of heterocystous blue- green algae in rice fields. Biology and Fertility of Soils 5: 98-105.

Sah P, 2008. Understanding the Physiology of Heterocyst and Nitrogen Fixation in Cyanobacteria or Blue-Green Algae. Nature and Science 6(1): 28-33.

Santra SC, 1993. Biology of Rice Fields Blue-Green Algae, Daya Publishing House. 184pp.

Sekar S and Chandramohan M, 2008. Phycobiliproteins as a commodity: trends in applied research, patents and commercialization. Journal of Applied Phycology 20: 113–136.

Simeunovic J, Beslin K, Svircev Z, Kovac D and Babic O, 2013. Impact of nitrogen and drought on phycobiliprotein content in terrestrial cyanobacterial strains. Journal of Applied Phycology 25: 597–607.

Sinha RP and Hader DP, 1996. Photobiology and ecophysiology of rice field cyanobacteria. Photochemistry and Photobiology 64(6): 887-896.

Soltani N, Khavari-Nejad RA, Tabatabaei Yazdi M, Shokravi S and Fernandez-Valiente E, 2006. Variation of nitrogenase activity, photosynthesis and pigmentation of the cyanobacterium Fischerella ambigua strain FS18 under different irradiance and pH values. World Journal of Microbiology & Biotechnology 22: 571-576.

Stanier RY and Cohen Bazire G, 1977. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. Annual Reviews of Microbiology 31: 225-234.

Stanier RY, Kunisawa R, Mandal M, Cohen-Bazire G, 1971. Purification and properties of unicellular blue green algae (Order: Chroococcales). Bacteriological Reviews 35: 171-305.

Vaishampayan A, Sinha RP and Häder DP, 1998. Use of genetically improved nitrogen-fixing cyanobacteria in rice paddy fields: Prospects as a source material for engineering herbicide sensitivity and resistance in plants. Botanica Acta 111: 176–190.

www.SID.ir