



شناسایی جدایه‌های باکتری همزیست با ارقام مرسوم عدس و انتخاب به منظور توصیه مصرف در سطح کشور

مهديه شمشیری‌پور^{۱*}، الهام شمشیری‌پور^۲، کاظم خاوازی^۳ و وحیداله جهان‌دیده مهجن‌آبادی^۴

^{۱*} محقق موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران mshamshiripour@yahoo.com

^۲ کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

^۳ استاد پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

^۴ محقق موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

با توجه به اهمیت عدس در عرصه کشاورزی پایدار و تامین غذا، استفاده از راهکارها و شیوه‌های مدیریتی که می‌تواند مشکلات مربوط به تولید را در کشور برطرف نموده و در نهایت عملکرد محصول را بهینه کند بسیار اهمیت دارد. این تحقیق با هدف انتخاب برترین جدایه‌های همزیست با ارقام عدس در جهت کاهش مصرف کودهای نیتروژنی و افزایش تثبیت زیستی نیتروژن و عملکرد عدس و توصیه برای مصرف در سطح کشور انجام گردید. به منظور جداسازی و بررسی باکتری‌های همزیست تثبیت کننده نیتروژن تحقیقی در مزارع تحت کشت این گیاه در سطح ملی و در ۱۰ استان کشور انجام شد.

آزمایشات در گلخانه و بر پایه طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. سه رقم بذر بیلہ سوار، گچساران و کیمیا در سه تکرار کاشته شده و با محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن آبیاری شد. پس از برداشت در مرحله گلدهی باکتری‌های ریزوبیوم از گرہک‌های ریشه جداسازی شد. به منظور غربالگری باکتری‌های همزیست، آزمایشات افتراقی بیوشیمیایی انجام شد. کارایی همزیستی (Symbiosis Efficiency) باکتری‌های جداسازی شده در چهار سطح نیتروژن (۰، ۲۰، ۳۵ و ۷۰ میلی گرم در لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. رقم بیلہ سوار به دلیل دارا بودن بیشترین سطح زیر کشت در کشور برای این آزمایش انتخاب شد. کارایی همزیستی (SE) به همراه تست آلوده‌سازی گیاه با باکتری ریزوبیوم صورت گرفت. پس از گذشت ۲ ماه از نظر وزن خشک اندام هوایی، طول ساقه، تعداد گرہک و خصوصیات ظاهری ریشه و اندام هوایی بررسی و کارایی همزیستی هر یک از سویه‌ها محاسبه شد. از این میان ۱۷ سویه برتر انتخاب و شناسایی مولکولی و جهت توصیه برای مصرف در سطح کشور معرفی شدند. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که تمامی سویه‌ها، از جنس و گونه ریزوبیوم لگومینوزارم بودند.

واژه‌های کلیدی: نیتروژن، عدس، تثبیت زیستی نیتروژن، ریزوبیوم لگومینوزاروم، همزیستی، کارایی همزیستی نیتروژن

بیان مسئله

نیتروژن یکی از عناصر پرمصرف در رشد گیاه است. هرساله مقدار زیادی از نیتروژن خاک در نتیجه برداشت محصول از دسترس خارج می‌شود. تثبیت این عنصر در فرآیند همزیستی باکتری با گیاهان تیره بقولات، در رفع نیاز غذایی گیاه و جایگزینی آن با کود شیمیایی نیتروژن از اهمیت خاصی برخوردار است. این جایگزینی از نظر اقتصادی و زیست محیطی در کشاورزی پایدار مورد توجه می‌باشد. تثبیت بیولوژیک نیتروژن یک رابطه همزیستی بین ریزوبیوم‌های مؤثر با ریشه‌های موئین گیاه میزبان است. بسته به نوع لگوم، بیش از ۶۰٪ از نیاز نیتروژنی گیاه از طریق تبدیل نیتروژن ملکولی به فرم قابل جذب گیاه تأمین می‌شود. این امر مستلزم آنست که جمعیت قابل قبولی از ریزوبیوم‌های با کارایی بالا در امر تثبیت نیتروژن در ناحیه ریشه‌های موئین گیاه میزبان وجود داشته باشد و یا اینکه به‌طور مصنوعی جمعیت مناسبی از آنها را در ناحیه ریشه‌های موئین عرضه نمود تا بتوان از نتایج حاصل از آن بهره‌مند شد. برای گسترش و اجرای روش‌های کشاورزی پایدار، استفاده از کودهای زیستی اهمیت زیادی در کاهش آلودگی محیط‌زیست و تخریب طبیعت دارد ضمن اینکه این کودها باعث افزایش رشد و افزایش تولید محصول در گیاه می‌شود و به همین دلیل در سطح بین‌المللی به عنوان منبع جایگزین کود شیمیایی پذیرفته شده است. همزیستی ریزوبیومی با گونه‌های لگوم اهمیت زیادی دارد و این همزیستی ۵۰ درصد از ۱۷۵ میلیون تن نیتروژن تثبیت شده سالیانه جهانی را تولید می‌کند. در کشاورزی مدرن از گیاهانی با پتانسیل تولید بالا و تقاضای زیاد برای نیتروژن استفاده می‌شود. در نتیجه مقدار زیادی نیتروژن نسبت به آنچه توسط خاک تأمین می‌شود، مورد نیاز است؛ بنابراین برای پرورش اکثر گیاهان، نیاز به استفاده از کودهای نیتروژنی می‌باشد که این امر علاوه بر هزینه‌بر بودن ممکن است برای محیط‌زیست مشکلاتی را ایجاد کند. افزایش و گسترش مصرف کودهای زیستی مانند کودهای ریزوبیومی، نیاز به کودهای شیمیایی و تأثیرات زیان‌بار محیطی را کاهش خواهد داد. عدس از خانواده لگومینوز و قادر به ایجاد همزیستی با باکتری ریزوبیوم لگومینوزارم است. به‌طوری‌که تحت شرایط مناسب می‌تواند بیش از ۵۰٪ از نیاز نیتروژنی خود را از طریق این فرایند تأمین نماید و مقدار نیتروژن تثبیت شده ۱۹۲-۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار برآورد شده است. در این تحقیق پس از جداسازی باکتری همزیست با عدس در سطح ملی، کارایی همزیستی این باکتری‌ها با عدس بررسی شد، سپس بهترین سویه‌ها شناسایی و به منظور مصرف در سطح کشور معرفی شدند.

معرفی راهکار

جهت جداسازی، شناسایی و بررسی کارایی باکتری‌های بومی همزیست عدس، تعداد ۸۲ نمونه خاک از مناطق مختلف کشور تهیه شد و مورد استفاده قرار گرفت.

۱- جداسازی باکتری از گرhek

ابتدا از مناطق مختلف ۶ استان کشور نمونه‌های ۳ کیلوگرمی از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری خاک تهیه و جهت انجام آزمایشات به موسسه تحقیقات خاک و آب منتقل شد (جدول ۱). نمونه‌های خاک تا زمان انجام آزمایشات گلخانه‌ای بدون انجام هیچ عملیاتی در کیسه‌های دربسته در داخل سردخانه نگهداری شدند. همچنین از مزارع عدس چهار استان زنجان، آذربایجان شرقی، گیلان و سمنان نیز پس از برداشت عدس نمونه‌های گرhek از ریشه جداسازی و به موسسه تحقیقات خاک و آب منتقل شد. ۳ رقم بذر

عدس (بیله‌سوار، کیمیا و گچساران) که بیشترین سطح زیر کشت عدس در کشور را دارا می‌باشند از موسسه تحقیقات دیم کشور دریافت شد. به منظور کاشت از گلدان‌های ۳۰۰ گرمی در سه تکرار استفاده گردید. بذور ضدعفونی سطحی شده و در داخل پلیت‌های حاوی واتر‌آگار به دستگاه ژرمیناتور منتقل شدند. بذرها پس از ۴۸ ساعت در دمای 22°C جوانه‌دار شدند. پس از کاشت، گلدان‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه چیده و به مدت ۶۰ روز نگهداری و به‌صورت روزانه بررسی شدند. جهت آبیاری گلدان‌ها از محلول غذایی فاقد منبع نیتروژن با pH حدود ۷ استفاده شد. پس از ۶۰ روز برای گرفتن نمونه‌های گرهک از ریشه، در مرحله شروع غلاف‌بندی با دقت کامل ریشه و خاک اطراف آن را از گلدان خارج نموده و سپس با استفاده از سطل آب خاک اطراف ریشه را به آرامی حذف نموده و ریشه از نظر وجود یا عدم وجود گرهک‌های حاصل از همزیستی گیاه و ریزوبیوم مورد بررسی قرار گرفت. پس از شستشوی ریشه اندام هوایی و ریشه گیاه از یکدیگر جدا شدند. ریشه‌های دارای گرهک فعال (درشت، سالم با مرکز صورتی و قرمز) انتخاب و در داخل ظروف حاوی سیلیکاژل به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از ضدعفونی سطحی گرهک‌ها در داخل پلیت‌های استریل یک‌بار مصرف توسط میله شیشه‌ای له شده و عصاره آن‌ها بدست آمد. ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون مربوطه توسط پیپت استریل روی حداقل سه پتری‌دیش حاوی محیط کشت مخصوص باکتری ریزوبیوم (Yeast Extract Mannitol Agar) ریخته شده و پس از پخش کردن روی سطح، پتری‌ها در انکوباتور در دمای 28°C قرار داده شده و هر روز از نظر ظهور کلنی باکتری مورد بررسی و خالص سازی قرار گرفتند.



شکل ۱ - کشت گلخانه‌ای ارقام عدس

جدول ۱- تعداد باکتری‌های جداسازی شده از گرهک‌های ریشه گیاه عدس در استان‌های مختلف

ردیف	استان	نوع نمونه	تعداد باکتری جداسازی شده
۱	خراسان جنوبی	خاک	۸۷
۲	فارس	خاک	۲۶
۳	اردبیل	خاک	۹۳
۴	کهگیلویه	خاک	۶۹
۵	لرستان	خاک	۵۴

۵۰	خاک	قزوین	۶
۱۸	گره	زنجان	۷
۲۴	گره	آذربایجان شرقی	۸
۴	گره	سمنان	۹
۳	گره	گیلان	۱۰

۲- شناسایی باکتری‌های همزیست به روش افتراقی

به منظور تفکیک باکتری‌های *Rhizobium leguminosarum* از باکتری‌های *Agrobacterium tumefaciens* (باکتری مولد بیماری گال)، از چهار آزمایش بیوشیمیایی زیر استفاده شد:

الف- کشت بر روی محیط (YMA) Congored Yeast Extract monitol agar: کلونی‌های ریزوبیوم در کنگورد سفید، نیمه‌شفاف، درخشان و در مقایسه با کلونی‌های آگروباکتریوم کوچک‌تر هستند. تفاوت دیگر کلنی‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم با آگروباکتریوم‌ها در سرعت رشد آن‌هاست. کلنی‌های ریزوبیوم پس از ۴۸ ساعت ظاهر می‌شوند ولی آگروباکتریوم‌ها تند رشدتر بوده و پس از ۲۴ ساعت کلنی‌های آن‌ها در محیط کشت YMA قابل رویت است. با بررسی کشت‌ها پس از ۲۴ ساعت می‌توان این دو را از هم تفکیک نمود.

ب- کشت بر روی محیط Hofer alkaline medium: آگروباکتریوم‌ها قابلیت رشد در pH بالاتر از ۱۱ را دارند که این خاصیت می‌تواند در جداسازی ریزوبیوم و آگروباکتریوم کارساز باشد.

ج- کشت بر روی محیط Glucose pepton agar: ریزوبیوم‌ها برخلاف آگروباکتریوم‌ها که خیلی سریع در این محیط رشد می‌کنند نمی‌توانند از پپتون به عنوان منبع انرژی استفاده کنند.

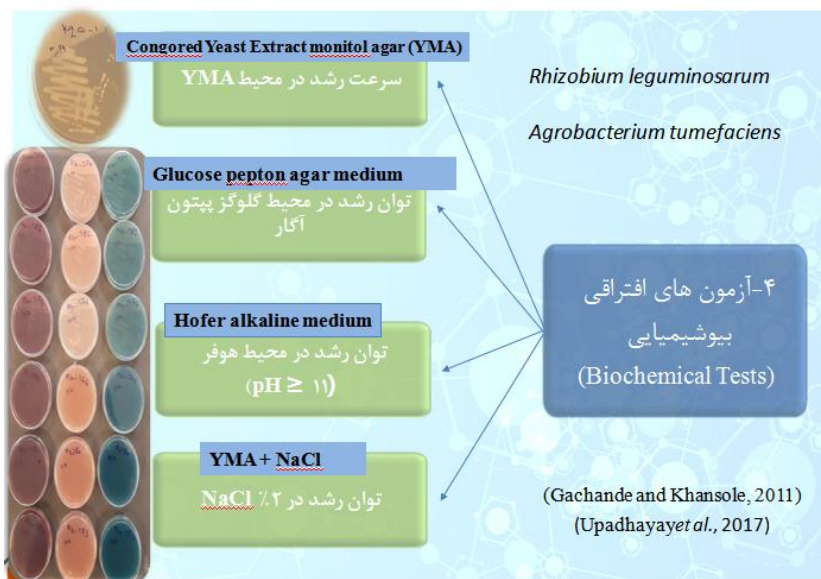
د- YMA حاوی دو درصد NaCl: ریزوبیوم‌ها برخلاف آگروباکتریوم‌ها در غلظت نمک ۲ درصد قادر به رشد نمی‌باشند (Bergey، ۲۰۱۰).

ابتدا این آزمایشات بر روی باکتری‌های شاهد مثبت *Rhizobium etli* سویه‌های RB-166، RB-175 و RB-180 و باکتری‌های شاهد منفی *Rhizobium Radiobacter* سویه‌های RB-176، RB-182 و RB-194 موجود در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب انجام شده و سپس بر روی کلیه جدایه‌ها صورت گرفت. پس از بررسی نتایج به دست آمده، آگروباکتریوم‌ها از ریزوبیوم‌ها تفکیک شدند.

جدول ۲- قابلیت رشد باکتری‌های شاهد در محیط‌های کشت ویژه آزمون‌های بیوشیمیایی

ردیف	شاهد	کد باکتری	حاوی رشد در محیط NaCl ۲٪	رشد در محیط Hofer	رشد در محیط Glucose Peptone Agar	رشد در محیط YMA پس از ۲۴ ساعت
۱	شاهد مثبت Rhizobium Etli	RB-166	×	×	×	×
۲		RB-180	×	×	×	×
۳		RB-175	×	×	×	×
۴	شاهد منفی Rhizobium Radiobacter	RB-176	✓	✓	✓	✓
۵		RB-182	✓	✓	✓	✓
۶		RB-194	✓	✓	✓	✓

با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون‌های افتراقی در نهایت تعداد ۱۶۰ جدایه از باکتری‌های فوق به‌عنوان ریزوبیوم همزیست با عدس انتخاب شدند.



شکل ۲- آزمون‌های افتراقی برای تفکیک باکتری‌های ریزوبیوم لگومینوزارم

۳ - بررسی کارایی همزیستی جدایه‌ها و شناسایی مولکولی

تعیین میزان کارایی همزیستی سویه‌های ریزوبیوم یا Symbiosis Efficiency (S.E.) با استفاده از آزمون آلوده‌سازی گیاه توسط باکتری به همراه ۴ سطح نیتروژن (۰، ۲۰، ۳۵ و ۷۰ میلی گرم در لیتر) از منبع نترات آمونیوم انجام شد. ابتدا محیط کشت مناسب برای رشد گیاه و فاقد نیتروژن تهیه گردید. پس از رویش، گیاهچه‌های عدس تحت شرایط استریل در داخل لوله‌های حاوی محلول غذایی و آگار کاشته شدند. پس از گذشت یک شبانه‌روز از جدایه‌های ریزوبیوم که قبلاً روی محیط کشت YMB تکثیر شده‌اند ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت بالای 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر به لوله‌ها اضافه شدند. برای هر

جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی نیز به عنوان شاهد بدون تلقیح در سطوح نیتروژن (۰، ۲۰، ۳۵ و ۷۰ میلی گرم در لیتر) در نظر گرفته شد. سپس گیاهان تلقیح شده به گلخانه که در آن شرایط مناسب رشد گیاه عدس (دمای ۲۶°C، رطوبت ۸۰ درصد و شدت نور ۱۲۰۰۰ لوکس) فراهم است انتقال یافت. این گیاهچه‌ها به صورت روزانه بررسی و در صورت نیاز به آبیاری با محلول غذایی استریل فاقد منبع نیتروژن آبیاری شدند. پس از گذشت دو ماه، زمانی که گیاهان در مرحله گلدهی یا غلاف‌دهی بودند از گلخانه خارج شدند. بدین منظور قسمت‌های هوایی گیاه را از ناحیه طوقه قطع نموده و در پاکت‌های کاغذی جداگانه قرار دادیم و قسمت‌های ریشه پس از شستشو و خشک کردن در پاکت‌های جداگانه قرار داده شدند. طول اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی، وزن تر ریشه و تعداد گره‌ها اندازه‌گیری شدند. همچنین خصوصیات ظاهری گیاه از نظر تشکیل یا عدم تشکیل گل و بذر نیز یادداشت شدند. برای محاسبه میزان کارایی همزیستی از وزن خشک اندام هوایی استفاده شد. میزان کارایی همزیستی باکتری‌ها از فرمول زیر محاسبه گردید. سپس با استفاده از نرم افزار Excel سویه‌هایی که بیشترین افزایش عملکرد را نسبت به تیمار شاهد برتر نشان داده بودند، انتخاب شدند.

$$SE = (I.C)/(N.C) \times 100$$

در این فرمول: I وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار تلقیح شده، C وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد بدون تلقیح و N وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار شاهد نیتروژنی است. در ارزیابی کارایی همزیستی $S.E. \leq 50$ نسبتاً موثر (ضعیف)، $S.E. = 50-75$ موثر (متوسط)، $S.E. = 75-100$ کارایی خوب و $S.E. \geq 100$ کارایی بسیار خوب و به عنوان سویه برتر انتخاب می‌شوند.



شکل ۳ - گرهک‌های ایجاد شده در همزیستی با ریزوبیوم

با توجه به نتایج به دست آمده ۷۰/۵ درصد از باکتری‌های مورد آزمایش کارایی همزیستی بالای ۱۰۰ درصد (کارایی بسیار خوب) داشتند. با توجه به اهمیت وزن خشک اندام هوایی در تعیین کارایی همزیستی، شاخص فوق به عنوان مؤلفه اصلی در مقایسه سویه‌ها در نظر گرفته شد. همچنین با در نظر گرفتن مقایسه میانگین سایر شاخص‌های اندازه‌گیری شده و همچنین پراکندگی استانی، انتخاب ۱۷ سویه برتر انجام شد. بر اساس مطالعات پیشین، هرچه میزان نیتروژن حاصل از تثبیت بالاتر باشد میزان عملکرد ماده خشک بیشتر است.

شناسایی مولکولی: با در نظر گرفتن پراکندگی استانی باکتری‌ها، بررسی شده و تعداد ۱۷ باکتری وارد فاز شناسایی مولکولی شدند. برای شناسایی مولکولی از کیت استخراج مخصوص باکتری‌های گرم منفی استفاده شد. تکثیر ناحیه ژنی 16SrRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی انجام شد. نمونه‌ها به منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. نتایج شناسایی مولکولی نشان داد که تمامی سویه‌ها، از جنس و گونه ریزوبیوم لگومینوزارم بودند.

توصیه ترویجی

در حال حاضر نتایج اثربخشی باکتری‌های همزیست با لگوم‌ها آنچنان محرز شده است که شرکت‌های زیادی در امریکا و کانادا به عرضه اشکال مختلف (جامد و مایع) مایه تلقیح‌های ریزوبیومی می‌پردازند. اما متأسفانه در ایران، پژوهش مدونی برای تولید مایه تلقیحی برای گیاه عدس صورت نگرفته است. خصوصاً که استفاده از این گونه مایه تلقیح‌ها به دلیل نبود ریزوبیوم اختصاصی گیاه بدلیل کشت گونه یا وارسته جدید (غیر بومی)، کمبود تعداد ریزوبیوم اختصاصی به دلیل تنش‌های محیطی و فراوانی نسبی ریزوبیوم‌های کم‌تأثیر یا بی‌تأثیر بسیار ضرورت دارد.

باکتری ریزوبیوم به‌طور مؤثری ریشه گیاه را آلوده کرده و رشد گیاه را افزایش می‌دهد. همچنین به دلیل خاصیت محرک رشدی، این باکتری‌ها با تولید هورمون‌های رشد گیاهان مختلف، افزایش فعالیت حل‌کنندگی فسفات، تثبیت N₂ و کنترل بیولوژیکی به رشد گیاه کمک می‌کنند.

با توجه به اینکه وزن خشک تمامی جدایه‌های برتر انتخاب شده از وزن خشک تیمار شاهد نیتروژنی ۷۰ ppm بالاتر بود که این امر می‌تواند علاوه بر تثبیت بالای نیتروژن، به دلیل خاصیت محرک رشدی باکتری‌های ریزوبیوم نیز باشد توصیه می‌شود در کشت عدس از باکتری‌های برتر همزیست مورد مطالعه در این تحقیق استفاده گردد.

فهرست منابع

- 1- Beck, D. P., Materon, L. A., and Afandi, F. 1993. practical Rhizobium-legume technology manual. ICARDA. Technical Manual, 19.
- 2- Bergey's, M. O. 2010. The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes.
- 3- Deshwal, V. K., Vig, K., Amisha, D. M., Yadav, P., Bhattacharya, D., and Verma, M. 2011. Synergistic effects of the inoculation with plant growth-promoting Rhizobium and Pseudomonas on the performance of Mucuna. Ann. Forestry, 19(1), 13-20.
- 4- Elkoca, E., Kantar, F., & Sahin, F. (2007). Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. Journal of Plant Nutrition, 31(1), 157-171.

- 5- Gachande, B. D., and Khansole, G. S. 2011. Morphological, cultural and biochemical characteristics of *Rhizobium japonicum* syn and *Bradyrhizobium japonicum* of soybean. *Bioscience discovery journal*, 2(1), 1-4.
- 6- Hafeez, F. Y., Shah, N. H., and Malik, K. A. 2000. Field evaluation of lentil cultivars inoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains for nitrogen fixation using nitrogen-15 isotope dilution. *Biology and fertility of soils*, 31(1), 65-69.
- 7- O'Hara, G., Yates, R., and Howieson, J. 2002. Selection of strains of root nodule bacteria to improve inoculant performance and increase legume productivity in stressful environments. *Inoculants and nitrogen fixation of legumes in Vietnam. ACIAR Proceedings*.
- 8- Peoples, M. B., Herridge, D. F., and Ladha, J. K. 1995. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and soil*, 174(1-2), 3-28.
- 9- Upadhyay, S. P., Pareek, N., and Mishra, G. 2017. Isolation and biochemical characterization of *Rhizobium* strains from nodules of lentil and pea in Tarai agro-ecosystem, Pantnagar, India. *Journal nasional*, 7(2), 73-76.
- 10- Urzúa, H. 2005. Benefits of symbiotic nitrogen fixation in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 32(2), 109-124.
- 11- Vessey, J. K., Pawlowski, K., Bergman, B. 2005. Root-based N₂-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. In *Root physiology: from gene to function* (pp. 51-78). Springer, Dordrecht.