

ارزیابی مقاومت به شوری و خشکی جدایه‌های بومی *Sinorhizobium meliloti* استان کرمان

محبوبه ابوالحسنی زراعتکار^۱، امیر لکزیان^۲، غلامحسین حق‌نیا^۳، علیرضا آستارایی^۴ و مهدی سرچشمه پور^۵

چکیده

تلقیح گیاهان لگومینه با جدایه‌های ریزوبیومی بومی مقاوم به شوری و خشکی تاثیر مثبتی در همزیستی لگوم - ریزوبیوم و در نتیجه افزایش رشد و عملکرد گیاه دارد. به منظور شناسایی جدایه‌های سینوریزوبیومی مقاوم به شوری و خشکی از ۳۴ منطقه در استان کرمان ۸۲ جدایه جداسازی و خالص‌سازی شدند و پس از آزمون گره‌زایی ۴۹ جدایه انتخاب شد. از ۴۹ جدایه ۲۴ جدایه متفاوت بر اساس رشد در محیط کشت جامد حاوی غلظت‌های متفاوت کلرید سدیم انتخاب شدند. به منظور مطالعه تحمل به شوری و خشکی ۲۴ جدایه از محیط کشت مایع TY با ۸ سطح شوری (کلرید سدیم) و ۸ سطح خشکی (پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰) استفاده شد. این آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. نتایج بدست آمده نشان داد که بین جدایه‌های سینوریزوبیوم از نظر مقاومت به شوری و خشکی تفاوت معنی‌داری وجود دارد و جدایه‌ها در سه گروه مقاوم، نیمه حساس و حساس به شوری و خشکی گروه‌بندی شدند. در آزمونی که به منظور بررسی تاثیر میزان پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای باکتریهای سینوریزوبیوم، بر مقاومت باکتری در برابر شرایط تنش آبی انجام گرفت مشاهده شد که جدایه مقاوم (S27K) ۶۳ برابر و جدایه مقاوم (S36K) ۵۷ برابر پلی‌ساکارید بیشتری نسبت به جدایه حساس (S56K) تولید کردند و جدایه نیمه حساس (S109K) تنها سه برابر جدایه حساس به شوری و خشکی پلی‌ساکارید تولید کرده است. با توجه به نتایج مقاومت به شوری و خشکی، میزان تولید پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای و با در نظر گرفتن توانایی جدایه‌ها در انجام فرایند تثبیت نیتروژن، دو جدایه سینوریزوبیوم S27K و S36K به عنوان جدایه‌های برتر و مقاوم به شوری و خشکی معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: سینوریزوبیوم ملیوتی، یونجه، خشکی، شوری، پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای

مقدمه

در اکثر نقاط کره زمین کمبود آب و شوری منابع آب و خاک از جمله مهمترین عوامل محدود کننده رشد گیاهان و تولید محصولات کشاورزی بشمار می‌روند. در اکثر خاکهای این مناطق، کمبود نیتروژن قابل استفاده برای گیاهان وجود دارد و این کمبود را در سطح جهانی، نمی‌توان تنها با مصرف کودهای شیمیایی جبران نمود. از طرفی استفاده از فرایند تثبیت زیستی نیتروژن بسیار کارآمدتر و مطلوبتر از کودهای شیمیایی است (۵، ۸، ۱۵ و ۱۷). اهمیت این فرایند صرفه‌جویی در مصرف کودهای شیمیایی، تامین نیتروژن متناسب با نیاز گیاه و در نتیجه

افزایش عملکرد گیاه است. همچنین مصرف بیش از حد کودهای زیستی برخلاف کودهای شیمیایی مشکلات زیست محیطی ایجاد نمی‌کنند. از سوی دیگر به دنبال کاشت گیاهان لگومینه خاک از نظر نیتروژن قابل جذب غنی شده و اثرات باقیمانده آن برای کاشت گیاهان بعدی نیز مفید خواهد بود (۵، ۸، ۱۵ و ۱۷). امروزه در برنامه‌ریزی برای سیستمهای کشاورزی پایدار استفاده از این نوع همزیستی یک ضرورت اساسی تلقی می‌شود.

تنشهای محیطی بر تعداد جدایه‌های ریزوبیوم و توان تثبیت زیستی نیتروژن تاثیر منفی دارند (۳). نژادهای مختلفی از باکتری ریزوبیوم در خاک وجود دارند که تاثیر آنها بر میزان

از نظر تثبیت زیستی نیتروژن و مقابله با تنش‌های محیطی یکسان نیست (۱۳). لازمه دستیابی به بهترین کودهای زیستی، شناسایی دقیق جدایه‌های هر منطقه و اکولوژی زیستی آنها، در نتیجه جداسازی جدایه‌های ریزوبیومی اختصاصی هر گونه گیاهی و سازگاری این جدایه‌های ریزوبیومی به شرایط اقلیمی متفاوت می‌باشد (۱۰).

شرایط محیطی از جمله تنش‌ها بر میزان تولید پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای جدایه‌های ریزوبیومی تاثیر دارد، به طوری که جدایه‌های ریزوبیومی برای مقاومت در برابر شرایط نامساعد محیطی، میزان پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای بیشتری تولید می‌کنند (۱ و ۲). جدایه‌های ریزوبیومی مقاوم به تنش شوری و خشکی میزان پلی‌ساکارید بیشتری تولید می‌کنند و با افزایش پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای شرایط نامساعد را تحمل نموده و به رشد خود ادامه می‌دهند (۱ و ۲). از طرفی ماندگاری جدایه‌های ریزوبیوم در خاک بستگی به توانایی این جدایه‌ها در اتصال به گیاه میزبان و ایجاد یک رابطه همزیستی سودمند دارد و در این میان پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای اهمیت ویژه‌ای در تخصصی شدن ریزوبیومها در شناسایی این جدایه‌ها توسط گیاه میزبان دارند (۱۹ و ۲۲). پلی‌ساکاریدهای برون یاخته‌ای جدایه‌ها در فرایند تشخیص لگوم - ریزوبیوم و همچنین به عنوان محافظ در برابر تنش‌های محیطی نقش مهمی را برای سلول باکتری ایفا می‌کنند (۲۲). بنابراین جدایه‌های مقاوم نه تنها شرایط تنش شوری و خشکی را بهتر می‌توانند تحمل کنند بلکه در ایجاد رابطه همزیستی مفید با گیاه میزبان نیز موفقتر از سایر جدایه‌ها عمل می‌کنند در آزمایشات متعددی که در مناطق گرم و خشک صورت گرفته است و از ماده تلقیحی که از جدایه‌های ریزوبیوم بومی مقاوم به شوری و خشکی منطقه استفاده شده بود مشاهده شد که این جدایه‌ها از کارآمدی قابل توجهی برخوردار بوده‌اند (۱۵، ۱۶ و ۱۷).

بین جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم ملیوتی از نظر میزان تولید پلی‌ساکارید برون یاخته‌ای تفاوت وجود دارد (۲۰). تا کنون مطالعه‌ای بر روی مقاومت به شوری و خشکی جدایه‌های بومی سینوریزوبیوم ملیوتی در خاکهای استان

کرمان که تحت تنش درجات مختلفی از شوری و خشکی قرار دارند، انجام نگرفته است. بنابراین تعیین مناسبترین جدایه‌های سینوریزوبیوم ملیوتی همزیست گیاه یونجه از نظر تحمل به خشکی و شوری حائز اهمیت است و می‌توان آنها را به عنوان جدایه‌های ریزوبیومی کارآمد و سازگار برای تولید محصول بیشتر معرفی نمود و شناسایی این جدایه‌ها بعنوان گامی نخست در مطالعات بعدی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

به منظور انتخاب جدایه‌های سینوریزوبیوم با تنوع ژنتیکی بالا، با توجه به سطح زیر کشت یونجه در استان کرمان از ۳۴ مزرعه مختلف این استان نمونه برداری از خاک و ریشه‌های گیاه یونجه صورت گرفت. گره‌ها به مدت ۱۰ ثانیه با الکل اتیلیک ۹۶ درصد و ۳ دقیقه با محلول هیپوکلریت ۵ درصد ضدعفونی شده و چندین مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند. سپس با له کردن گره‌ها داخل سوسپانسیون یکخواخت از باکتری تهیه شد. از سوسپانسیون حاصل از هر گره یک لوپ بر روی محیط کشت TY^۱ حاوی معرف کنگورد با روش خطی کشت داده شد (۱۷). بدین ترتیب ۱۱۵ جدایه جداسازی و خالص سازی شدند. پس از آزمون گره‌زایی (۱۵) ۸۲ جدایه سینوریزوبیوم تایید و پس از گذشت ۳۰ روز بر اساس وضعیت رشد گیاه میزبان (رقم بمی یونجه) که نشان دهنده توانایی جدایه‌ها در انجام فرایند تثبیت نیتروژن بود، ۴۹ جدایه برای مطالعه شوری و خشکی انتخاب شدند.

قبل از هر مرحله از آزمایش ابتدا عمل یکسان سازی تعداد سلول جدایه‌ها انجام شد. بدین ترتیب که جدایه‌های باکتری در لوله‌های درب دار ۵۰ میلی لیتری حاوی محیط کشت TY، در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد در اینکوباتور چرخان با ۱۲۰ دور در دقیقه (rpm) و به مدت ۷۲ ساعت رشد داده شدند. سوسپانسیون جدایه‌ها در شرایط سترون سانتریفوژ (۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه) شدند و سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته شدند. سپس همه نمونه‌ها با آب مقطر سترون به حجم اولیه برگردانده شدند و میزان چگالی نوری (OD^۲) نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر

شوری و خشکی انتخاب شدند (۱۸). این آزمایش‌ها به طور جداگانه به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ سطح شوری یا خشکی، ۲۴ جدایه و سه زمان و سه تکرار انجام شد.

به منظور بررسی تاثیر میزان پلی ساکارید برون یاخته‌ای باکتریهای سینوریزوبیوم، بر مقاومت باکتری در برابر شرایط شور چهار جدایه سینوریزوبیومی از مرحله قبل (دو جدایه مقاوم، یک جدایه نیمه حساس و یک جدایه حساس) انتخاب شد. این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. حجم مساوی از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها به ارلنهای حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع YEM با غلظت شوری ۵۰۰ میلی مولار کلرید سدیم انتقال داده شدند. ارلنها به اینکوباتور چرخان با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سانتیگراد منتقل شدند. پس از گذشت مدت زمان ۱۲۰ ساعت عمل سانتریفوژ (۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۱۵ درجه سانتیگراد) انجام شد. محلول رویی با نسبت ۴:۱ با الکل اتیلیک مخلوط شد و جدایه‌های ته‌نشین شده با نسبت ۱:۲ محلول کلرید کلسیم و سولفات پتاسیم شسته و به محلول رویی اضافه شدند. سپس ۴ قطره اسید کلریدریک دو مولار نیز به محلول رویی اضافه شد. عمل سرد کردن (به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۵- درجه سانتیگراد) صورت گرفت. نمونه‌ها دوباره سانتریفوژ (۲۸۰۰۰ دور در دقیقه، مدت ۳۰ دقیقه و دمای ۱۵ درجه سانتیگراد) شدند. محلول رویی دور ریخته شد و مواد ته‌نشین شده در ۵۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. محلول فوق با نسبت ۱/۵:۱ الکل اتیلیک و ۶ قطره اسید کلریدریک دو مولار به محلول اضافه شد و مرحله سرد کردن و سانتریفوژ کردن مجدداً تکرار شد و مواد ته‌نشین شده خشک و توزین شدند (۹).

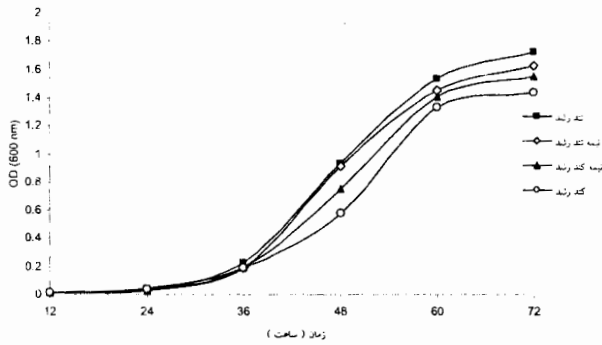
نتایج و بحث

نتایج تعیین منحنی رشد جدایه‌های سینوریزوبیومی نشان داد که این جدایه‌ها از نظر رشد با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند. منحنی رشد ۴۹ جدایه سینوریزوبیوم نشان داد که بیشترین تفاوت در میزان رشد جدایه‌ها پس از گذشت ۴۸ ساعت از آغاز رشد جدایه‌ها رخ داده یعنی زمانی که رشد جدایه‌ها در مرحله‌ی نمایی قرار داشت.

توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و در خاتمه با مینا قرار دادن کمترین OD سایر نمونه‌ها را رقیق کرده و OD آنها یکسان شدند و به منظور آزمایشات بعدی به مقدار یکسان از این جدایه‌ها برداشته شد.

میزان چگالی نوری جدایه‌ها پس از گذشت مدت زمان ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت از رشد جدایه‌ها اندازه‌گیری و منحنی رشد جدایه‌های متفاوت مطالعه شد (۶). این آزمایش‌ها به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

به منظور تعیین تحمل به شوری و خشکی جدایه‌ها از محیط کشت جامد و مایع TY با غلظتهای متفاوت شوری صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۶۵۰ میلی مولار کلرید سدیم و محیط کشت مایع TY با سطوح مختلف خشکی حاوی صفر، ۲۰۳/۳۶۲، ۲۹۸/۵۸۷، ۳۷۳/۸۰۴، ۴۳۸/۴۰، ۴۹۶/۱۰۱، ۵۴۸/۸۳۸ و ۵۷۳/۷۲۸ گرم در لیتر پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ استفاده شد. هر دو نمک پتانسیلهای یکسان برابر صفر، -۰/۵، -۱، -۱/۵، -۲، -۲/۵، -۳ و -۳/۲- مگاپاسکال ایجاد کردند. پتانسیلهای مختلف شوری از معادله وانت هوف (۲۱) و پتانسیلهای مختلف خشکی از معادله میچل و کنوفمن (۱۱) محاسبه شد. از آنجا که آزمایشهای کمی (کشت در محیط کشت مایع) زمان‌بر و هزینه‌بر هستند، بر اساس نتایج آزمون کیفی (کشت بر روی محیط کشت جامد) ۲۴ جدایه از گروههای مختلف برای مراحل بعدی آزمون انتخاب شدند. به این منظور هر پتری دیش حاوی محیط کشت دارای نمک کلرید سدیم با غلظتهای بالا به چهار بخش مساوی تقسیم و هر قسمت با ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها در چهار تکرار تلقیح گردید. ظروف پتری داخل اینکوباتور با دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و بعد از گذشت ۷۲ ساعت جدایه‌ها از نظر رشد پرگنه مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند و در پایان این قسمت جدایه‌ها به سه گروه حساس، نیمه حساس و مقاوم گروه‌بندی شدند. تعداد ۲۴ جدایه از بین جدایه‌های فوق انتخاب و در ۲۵ میلی لیتر محیط کشت مایع حاوی غلظتهای متفاوت کلرید سدیم و پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ رشد داده شدند. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان رشد، میزان چگالی نوری جدایه‌ها اندازه‌گیری و جدایه‌های حساس، نیمه حساس و مقاوم به



شکل ۱: منحنی رشد گروه‌های مختلف سینوریزوبیوم بر اساس تغییرات چگالی نوری (OD) پس از گذشت ۷۲ ساعت رشد در محیط کشت مایع (YEM)

آزمون نشان داد که تنش شوری اثر منفی بر رشد جدایه‌های سینوریزوبیوم دارد و مقاومت جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم در برابر تنش شوری متفاوت است. پژوهشگران دیگر گزارش کرده‌اند که اکثر ریزوبیوم‌ها در شوری ۸۰ میلی‌مولار رشدشان متوقف می‌شود اما برخی از جدایه‌های بردی ریزوبیوم ژاپونیکوم و سینوریزوبیوم ملیوتی قادرند مقادیر بیش از ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم را نیز تحمل کنند (۱۴).

مطالعه میزان رشد جدایه‌های سینوریزوبیوم در غلظت‌های متفاوت کلرید سدیم و پلی اتیلن گلیکول (به‌طور جداگانه) در محیط کشت مایع نشان داد که جدایه سینوریزوبیومی، زمان، تنش شوری و خشکی و برهم کنش بین آنها اثر معنی‌داری بر میزان چگالی نوری (رشد جدایه‌ها) داشته است (جدول ۱).

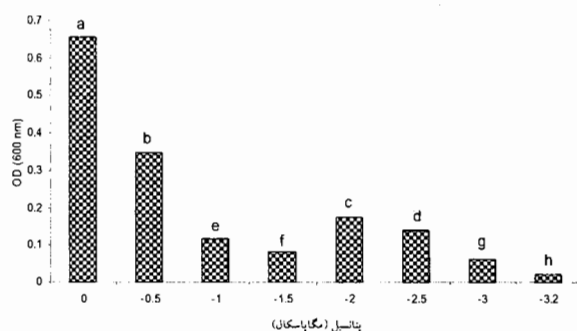
اختلاف بین جدایه‌ها در فاز نمایی بسیار گویاتر و واضح‌تر بود. بنابراین جدایه‌های سینوریزوبیوم بر اساس مقایسه میانگین میزان چگالی نوری در این زمان به چهار گروه کند رشد، نیمه کند رشد، نیمه تند رشد و تند رشد گروه‌بندی شدند و منحنی رشد هر گروه در مدت زمان ۷۲ ساعت ترسیم شد (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصل از مطالعه منحنی رشد (چگالی نوری) ۴۹ جدایه مشاهده شد، ۱۸/۴٪ از جدایه‌ها در گروه تند رشد، ۳۴/۷٪ جدایه‌ها در گروه نیمه تند رشد، ۳۲/۶٪ جدایه‌ها در گروه نیمه کند رشد و ۱۴/۳٪ آنها در گروه کند رشد قرار گرفتند.

مطالعه میزان رشد جدایه‌های سینوریزوبیوم در غلظت‌های متفاوت کلرید سدیم در محیط کشت جامد نشان داد که تمام جدایه‌های سینوریزوبیوم بر روی محیط کشت جامد تا غلظت ۳۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم قادر به رشد بودند. لیکن در غلظت‌های زیادتر کلرید سدیم بین جدایه‌های سینوریزوبیوم از نظر میزان رشد تفاوت وجود داشت. جدایه‌هایی که در غلظت ۴۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم رشدشان متوقف شد در گروه جدایه‌های حساس به شوری و جدایه‌هایی که توانسته بودند در غلظت ۶۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به خوبی رشد کنند در گروه جدایه‌های مقاوم قرار داده شدند و جدایه‌های نیمه حساس حد میانه این دو گروه قرار گرفتند. بر اساس این نتایج مشاهده شد که از جدایه‌های انتخاب شده ۲۲/۵٪ از جدایه‌ها در گروه مقاوم، ۴۹/۰٪ جدایه‌ها در گروه نیمه حساس و ۲۸/۵٪ آنها در گروه حساس قرار گرفتند. بنابراین نتایج بدست آمده از این

جدول ۱: تجزیه واریانس آزمون کمی رشد جدایه‌های سینوریزوبیوم در غلظت‌های متفاوت نمک NaCl و PEG در محیط کشت مایع (به‌طور جداگانه)

میانگین مربعات		درجه آزادی	منابع تغییر
چگالی نوری (NaCl)	چگالی نوری (PEG)		
۰/۵۳۰۳*	۱۱/۱۳۱۷*	۷	تنش
۰/۳۶۶۳*	۵/۲۲۰۳*	۲۳	جدایه
۱/۹۹۲۳*	۴۴/۰۴۱۶*	۲	زمان
۰/۱۴۸۹*	۰/۰۹۵۵*	۱۶۱	جدایه * تنش
۰/۰۱۰۳*	۰/۳۲۷*	۴۶	جدایه * زمان
۰/۳۰۴۹*	۱/۴۴۸۷*	۱۴	تنش * زمان
۰/۰۰۴۹*	۰/۰۵۰۳*	۳۲۲	جدایه * تنش * زمان
۰/۰۰۴۸	۰/۰۰۷۲	۱۱۵۲	خطای آزمایش

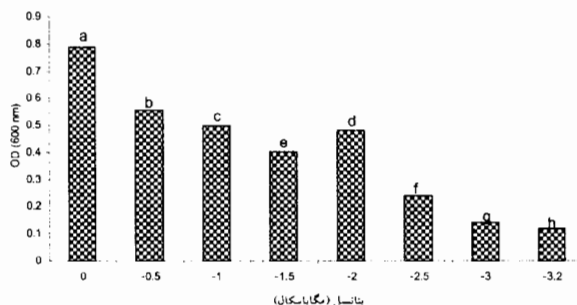
* در سطح ۰/۰۵ معنی‌دار است.



شکل ۲: مقایسه میزان رشد بر اساس میانگین چگالی نوری (OD) جدایه‌های سینوریزوبیوم در پتانسیل‌های متفاوت با استفاده از NaCl. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند

اتیلن گلیکول رشد جدایه‌ها بطور ناگهانی افزایش پیدا کرده است و در نتایج پژوهشگران دیگر نیز این روند مشاهده شده است (۵). از این رو بنظر می‌رسد که در غلظت‌های فوق مکانیسم‌های دفاعی سلول در برابر تنش قدری فعال شده و سلول برای ادامه حیات تمام مکانیزم‌های حفاظتی خود را بکار می‌گیرد. از جمله این مکانیزم‌ها تجمع سریعتر ترکیبات اسید آمینه در سلول‌های ریزوبیومی برای ایجاد تعادل در سلول و یا تولید پلی ساکارید بیشتر است که منجر به افزایش تحمل جدایه‌ها در برابر تنش می‌شود. لیکن از آنجا که این جدایه‌ها با غلظت‌های بسیار زیاد نمک روبرو می‌شوند که علاوه بر ایجاد یک پتانسیل اسمزی بسیار منفی سبب ایجاد سمیت در سلول شده و در نهایت سلول‌ها از بین می‌روند.

نتایج نشان داد که میزان رشد جدایه‌های مختلف در تنش شوری و خشکی متفاوت است و برخی از جدایه‌ها در شرایط تنش مقاومتر هستند و می‌توانند رشد بهتری نسبت به



شکل ۳: مقایسه میانگین چگالی نوری (OD) جدایه‌های سینوریزوبیوم در پتانسیل‌های متفاوت با استفاده از PEG. میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند

تأثیر تنش شوری با استفاده از غلظت‌های متفاوت کلرید سدیم و خشکی با استفاده از غلظت‌های متفاوت نمک پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ بر رشد جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. هر دو نمک با افزایش فشار اسمزی محیط باعث ایجاد تنش رطوبتی در جدایه‌ها می‌شوند که خود مستلزم تنظیم اسمزی توسط جدایه‌ها می‌باشد. پلی اتیلن گلیکول به دلیل وزن مولکولی زیاد (۶۰۰۰) نمی‌تواند وارد آپوپلاست گردد، بنابراین آب نه تنها از سلول فاصله می‌گیرد، بلکه از دیواره سلولی نیز دور نگه داشته می‌شود و این امر باعث می‌شود این نمک شرایط بسیار مشابهی با خاک نسبت به سایر مواد اسمزی که به تدریج وارد دیواره سلولی می‌شوند، ایجاد کند (۲۳). تیمارهای شوری و خشکی به نحوی انتخاب شدند که پتانسیل آبی یکسانی (تقریباً برابر ۰، -۵، -۱۰، -۱۵، -۲۰، -۲۵، -۳۰، -۳۲ بار) ایجاد کنند و بطور منطقی با یکدیگر قابل مقایسه باشند. میانگین رشد جدایه‌ها در تنش‌های آبی نشان داد که تنش‌های آبی اثر معنی‌داری بر رشد جدایه‌ها داشته است و با افزایش غلظت نمکها (کاهش پتانسیل اسمزی) رشد جدایه‌ها کاهش یافته است. بطوریکه رشد جدایه‌ها با افزایش غلظت نمک در تنش شوری ۹۶/۵٪ و در تنش خشکی ۸۴/۷٪ نسبت به شاهد کاهش یافت. به این ترتیب مشاهده می‌شود که تأثیر منفی کلرید سدیم به مراتب بیشتر از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ بود (شکل ۲ و ۳). احتمالاً دلیل آن نمک کلرید سدیم می‌باشد و مقادیر زیاد کلر و سدیم اثرات سمی بر سیستم‌های غشایی و آنزیمی ایجاد می‌کنند (۲۳). اما مولکول‌های پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی زیاد نمی‌توانند از منافذ دیواره سلولی عبور کنند و به راحتی توسط موجودات زنده تجزیه نمی‌شوند و در بیشتر موارد سمی نیستند (۲۳). اگر چه در برخی مطالعات گزارش شده که پلی اتیلن گلیکول در صورت ورود به سلول‌ها می‌تواند اثرات سمی شدیدی داشته باشد، به احتمال زیاد دلیل سمی بودن آن ناشی از غلظت زیاد یونهای آلومینیوم و منیزیم می‌باشد که در سنتز آن به کار رفته است (۲۳).

با توجه به شکل‌های ۲ و ۳ مشاهده شد که اگر چه رشد جدایه‌ها با افزایش غلظت نمک (کاهش پتانسیل آب) یک روند کاهشی داشته است اما در غلظت ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی مولار نمک کلرید سدیم و غلظت ۴۳۸ گرم در لیتر پلی

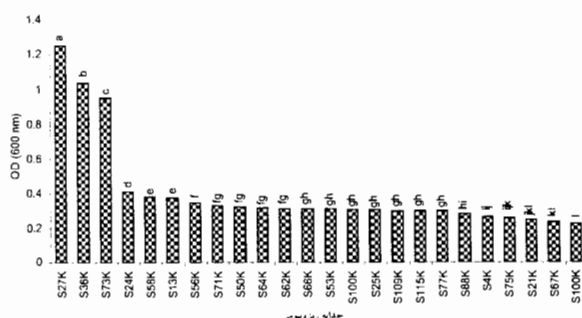
غلظتهای زیاد نمک نیز رشد بهتری نسبت به بقیه جدایه‌ها داشتند.

مقایسه نتایج مطالعه میزان رشد جدایه‌های سینوریزوبیوم و مقاومت جدایه‌ها به تنش شوری و خشکی نشان داد که رابطه‌ای بین میزان رشد جدایه‌ها و مقاومت جدایه‌ها به شوری و خشکی وجود ندارد بطوریکه برخی جدایه‌ها در محیط بدون تنش به خوبی رشد کردند اما وقتی در شرایط خشک و شور قرار گرفتند قادر نبودند به سرعت تغییرات آنزیمی و بیوشیمیایی در خود ایجاد کرده و با شرایط محیطی سازگاری پیدا کنند و در نتیجه از بین رفتند و بالعکس.

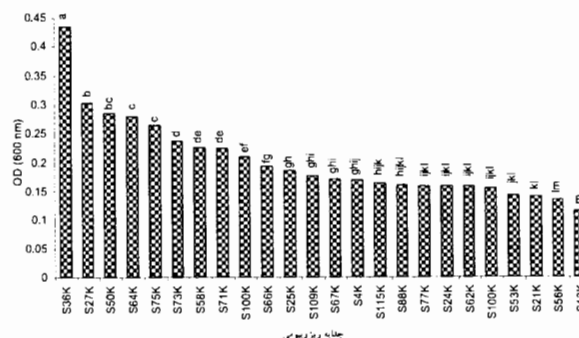
نتایج گروه‌بندی جدایه‌های سینوریزوبیوم بر اساس مقاومت به تنش شوری و خشکی نشان داد که برخی از جدایه‌های مقاوم به شوری در تنش خشکی نیز مقاوم بودند که به احتمال زیاد پتانسیل ژنتیکی این جدایه‌ها در مقاومت به شوری و خشکی یکسان می‌باشد (۱۲). از طرفی تنش شوری همانند تنش خشکی به نحوی تنش آبی ایجاد می‌کند لذا اکثر ریزوبیومهایی که تحمل تنشهای شوری را دارند، قادر خواهند بود در تنش رطوبتی نیز فعالیت مناسبی داشته باشند (۱۲). اما در مورد تمام جدایه‌ها این رابطه وجود ندارد. برای انجام آزمایش بعدی، جدایه‌هایی انتخاب شدند که در هر سه آزمون از نظر مقاومت در برابر تنش خشکی و شوری در یک گروه یکسان قرار گرفته باشند و میزان رشد جدایه‌ها نیز در گزینش در نظر قرار گرفت. بنابراین دو جدایه S27K و S36K به عنوان جدایه‌های مقاوم و جدایه S109K و S56K به ترتیب به عنوان جدایه نیمه حساس و حساس به شوری و

سایر جدایه‌ها داشته باشند (شکل ۴ و ۵). دو جدایه S27K و S36K بیشترین رشد را در غلظتهای متفاوت هر دو نمک نشان دادند. در تنش شوری جدایه S36K و در تنش خشکی جدایه S27K بیشترین رشد را داشتند. در تنش شوری دو جدایه S13K و S56K و در تنش خشکی جدایه S100K کمترین رشد را نشان دادند. بنابراین نتایج بدست آمده از آزمون بررسی مقاومت به شوری و خشکی جدایه‌های سینوریزوبیوم نشان داد که تنشهای محیطی از جمله شوری و خشکی اثر منفی بر رشد جدایه‌های سینوریزوبیوم دارند و مقاومت جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم در برابر تنش شوری و خشکی متفاوت است. نتایج حاصل از آزمایشات دیگر نیز این مطلب را نشان می‌دهد (۶ و ۱۳). جدایه‌های ریزوبیومی مقاوم به تنشهای آبی به احتمال زیاد با افزایش پلی ساکاریدهای برون یاخته‌ای (۱)، تجمع برخی از آنزیمها مانند آنزیم آمینوپپتیداز در سلولهای ریزوبیومی (۱۲) و تجمع ترکیبهای اسید آمینه گلوتامات و بتائین به منظور تعدیل فشار اسمزی در سلولهای ریزوبیومی (۷)، شرایط نامساعد را تحمل نموده و به رشد خود ادامه می‌دهند.

در نهایت با توجه به نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین چگالی نوری (رشد) جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم در غلظتهای متفاوت نمک کلرید سدیم و پلی اتیلن گلیکول در مدت زمان ۷۲ ساعت ۲۴ جدایه سینوریزوبیوم در سه گروه مقاوم، نیمه حساس و حساس گروه‌بندی شدند. با توجه به نتایج روند رشد هر جدایه در غلظتهای متفاوت هر نمک بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت جدایه‌هایی به عنوان مقاوم تشخیص داده شدند که در



شکل ۵: مقایسه میانگین چگالی نوری (OD) جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم در تنش خشکی، میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند



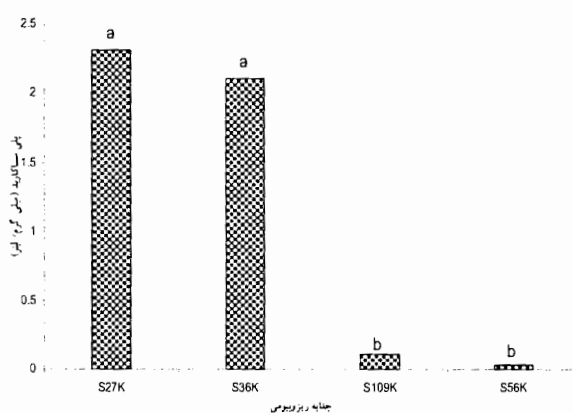
شکل ۴: مقایسه میانگین چگالی نوری (OD) جدایه‌های مختلف سینوریزوبیوم در تنش شوری، میانگین‌های دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری ندارند

در شرایط نامساعد محیطی پلی ساکارید بیشتری به سطح سلول ترشح می کنند و این جدایه ها به این طریق با شرایط نامساعد سازگاری بیشتری پیدا می کنند و می توانند مدت طولانی تری در این شرایط نسبت به سایر جدایه ها باقی بمانند.

با بررسی کلی نتایج این پژوهش مشاهده شد که تنشهای شوری و خشکی بر جدایه های سینوریزوبیوم تاثیر منفی دارند و بین جدایه های مختلف از نظر مقاومت در برابر تنشها تفاوت وجود دارد. همچنین مشخص شد که رابطه ای رابطه ای بین تحمل به تنش جدایه ها با سرعت رشد جدایه ها و شوری خاک محل زندگی جدایه ها وجود ندارد اما بین تحمل به تنش و میزان ترشح پلی ساکارید جدایه ها رابطه مستقیم وجود داشت. در مجموع با در نظر گرفتن توانایی جدایه ها در انجام فرایند تثبیت نیتروژن، مقاومت جدایه ها به شوری و خشکی و میزان تولید پلی ساکارید جدایه ها دو جدایه سینوریزوبیوم S27K و S36K از منطقه کرمان به عنوان جدایه های برتر مقاوم به شوری و خشکی انتخاب شدند که باید کارآیی تثبیت بیولوژیکی آنها در مزرعه و گلخانه مورد مطالعه قرار گیرد.

قدردانی

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، کلیه پرسنل گروه خاکشناسی و گلخانه دانشگاه فردوسی مشهد قدردانی می نمایم.



شکل ۶: مقایسه میانگین پلی ساکارید برون یاخته ای چهار جدایه های سینوریزوبیوم میلیوتی در غلظت ۵۰۰ میلی مولار NaCl

خشکی انتخاب شدند.

بین جدایه های جمع آوری شده از مناطق مختلف تفاوت معنی داری وجود دارد مشاهده شد که مقاومترین جدایه ها (S36K و S27K) از مناطق غیر شور که دارای هدایت الکتریکی حدود ۳ dS/m بودند جدا شدند و جدایه نیمه حساس (S109K) و حساس (S56K) از مناطق شور به ترتیب دارای هدایت الکتریکی ۷ و ۶ dS/m جدا شده اند. بنابراین به نظر می رسد که جدایه های مقاوم به شوری الزاما در مناطق شور وجود ندارند و یا به عبارتی تمام جدایه های منطقه شور مقاومت به شوری ندارند. پژوهشگران دیگر نیز گزارش کرده اند که منطقه جغرافیایی در پیدا کردن جدایه های مقاوم به شوری نقشی ندارد (۴).

مطالعه میزان تولید پلی ساکاریدهای برون یاخته ای جدایه های سینوریزوبیوم در شرایط شور نشان داد که بین جدایه های سینوریزوبیوم از نظر تولید پلی ساکاریدها تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین نشان داد که دو جدایه سینوریزوبیوم مقاوم به شوری و خشکی (S36K و S27K) بیشترین پلی ساکارید را تولید کردند و بین این دو جدایه از این نظر تفاوت معنی داری مشاهده نشد. اما بین این دو جدایه ریزوبیومی با جدایه های ریزوبیومی نیمه حساس (S109K) و حساس (S56K) تفاوت معنی داری وجود داشت (شکل ۶). گزارش شده است که شرایط محیطی از جمله تنشها بر میزان تولید پلی ساکاریدهای برون یاخته ای جدایه های ریزوبیومی موثر است، به طوری که جدایه های ریزوبیومی در شرایط نامساعد محیطی، برای مقاومت در برابر این شرایط میزان پلی ساکارید برون یاخته ای بیشتری تولید می کنند (۱). همچنین پژوهشگران دیگر گزارش کرده اند که بین جدایه های مختلف سینوریزوبیوم میلیوتی از نظر میزان تولید پلی ساکارید برون یاخته ای تفاوت وجود دارد (۲۰). نتایج بدست آمده از این آزمون کاملا بیانگر این مطلب است. همان گونه که مشاهده می شود جدایه مقاوم (S27K) ۶۳ برابر و جدایه مقاوم (S36K) ۵۷ برابر پلی ساکارید بیشتری نسبت به جدایه حساس (S56K) تولید کردند و جدایه نیمه حساس (S109K) تنها سه برابر جدایه حساس به شوری و خشکی پلی ساکارید تولید کرده است (شکل ۶). بنابراین می توان نتیجه گرفت که برخی از جدایه ها برای زنده ماندن

منابع

- 1-Ashraf, M., S. Hasnain, O. Berge, and T. Mahmood. 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol Fertil Soil.* 40(3): 157-162.
- 2-Delavechia, C., E. Hampp, A. Fabra, and S. Castro. 2003. Influence of pH and calcium on the growth, polysaccharide production and symbiotic association of *Sinorhizobium melliloti* SEMIA 116 with alfalfa roots. *Biol Fertil Soil.* 38: 110-114.
- 3-Duzan, H.M., X. Zhou, A. Souleimanov, and D.L. Smith. 2004. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *J. Exp Bot.* 55(408): 2641-2646.
- 4-Elshiekh, A. 1998. Effect of salt on rhizobia and bradyrhizobia. *Ann Rev Appl Biol.* 132: 507-524.
- 5-Hashem, F.M., D.M. Swelim, L.D. Kuykendall, A.I. Mohammad, S.M. Abdel-Wahab, and N.I. Hegazi. 1998. Identification and characterization of salt- and thermo- tolerant Leucarna-nodulating *Rhizobium* strain. *Biol Fertil Soil.* 27: 335-341.
- 6-Jebara, M., M. Elarbi, A. Ridha Mhamdi, R. Ghirir, and M. Mars. 2000. Effect of salt on *Sinorhizobium sp.* isolates from Tunisia either in vitro or in association with *Medicago sp.* *Agric.* 9(2): 99-102.
- 7-Leena, A.R., S. Saijets, K. Jokinen, and K. Lindstrom. 2004. Evaluation of the roles of two compatible solutes, glycine betaine and trehalose, for the acacia senegal-sinorhizobium symbiosis exposed to drought stress. *Plant Soil.* 260(1/2): 237-251.
- 8-Linblad, P. and M.G. Guerreo. 1993. Nitrogen fixation and nitrate reduction. In: *Photosynthesis and production in a changing environment.* Hall, D.D. (Ed.). Chapman and Hall. pp: 299-312.
- 9-Louch, H.A. and K.J. Miller. 2001. Synthesis of a low-molecular-weight from of exopolysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *Applied and Environmental Microbiol.* pp: 1011-1014.
- 10-Mc Dermott, T. and P.H. Graham. 1990. Competitive ability and efficiency in nodule formation of strain of *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol.* 56: 3035-3039.
- 11-Michel, D.E. and R. Khafmann. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiol.* 51: 914-916.
- 12-Mohammad, D.R., M. Akhavan Kharazian, W.F. Campbell and M.D. Rumbaugh. 1991. Identification of salt and drought tolerant *Rhizobium melliloti* strains. *Plant Soil.* 134: 271-276.
- 13-Rehman, A. and C.S. Nautiyal. 2002. Effect of drought on the growth and survival of the stress-tolerant bacterium *Rhizobium sp.* NBRI2505 sesbania and its drought-sensitive transposon Tn5 mutant. *Springer-Verlag.* New York. LLC. 45(5): 368-377.
- 14-Rigand, J. 1987. Salt tolerance of *Medicago* nodules and bacteroids, in plant genes involved in nitrogen fixation and productivity of alfalfa. *USDA-IRAN workshop.* Auzevil.
- 15-Shamseldin, A. 2005. Improvement of common bean (*Phaseolus vulgaris*) nodulation by selected rhizobial strains from Egyptian soils through genotypic characterization, symbiotic effectiveness and competitiveness under salt stress conditions. Thesis for degree of ph.D.
- 16-Shamseldin, A. and Werner, D. 2004. Selection of competitive strains of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris* and adapted to environmental conditions in Egypt, using the gus-reporter gene technique. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 377-382.
- 17-Shamseldin, A., and D. Werner, 2005. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium elli* strains from Egyptian soils. *Curr Microbiol.* 50: 11-6.
- 18-Somasegaran, P. and H.j. Hoben. 1994. *Handbook for rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology.* Springer-Verlay. New York. p: 450.
- 19-Sylria, D.M., J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, and D.A. Zuberer. 1999. *Principle application soil microbiol.*
- 20-Tavernnier, P., J.C. Portais, J.E.N. Saucedo, J. Courtois, B. Courtois, and J.N. Barbotin. 1997. Exopolysaccharide and poly-b-hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains. *Appl Environ Microbiol.* 63(1): 21-26.
- 21-Van't Hoff, J.H. 1887. The role of osmotic pressure in the analogy between solution and gases. *Zeitschrift Physicalische Chemie.* 1: 481-508.
- 22-Werner, D. 1992. *Symbiosis of plant and microbes.* Chapman and Hall. pp. 49-167.
- 23-Whalley, W.A., A.G. Bengough, and A.R. Dexter. 1998. Water stress induced by PEG decreases the maximum growth pressure of the roots of pea seedling. *J. Exp Botan.* 49(327):1689-1694.

The study of salt and drought tolerance of *Sinorhizobium meliloti* isolated from Kerman province

M. Abolhassani-Zeraatkar, A. Lakzian, G. Haghnia, A. Astarayi, M. Sarcheshmepour

Abstract

Salinity and drought stress can significantly affect plant growth in arid and semi-arid regions. Legume - rhizobium symbiotic relationships can also be influenced by these limiting factors. It is well known that the host plant inoculation by native strains with high efficiency has a positive effect on plant yield and biological nitrogen fixation process. The main aim of this investigation was to evaluate the salinity and drought tolerance of 49 isolates of *Sinorhizobium meliloti* collected from Kerman province in southern Iran. Salinity and drought tolerance of all isolates were examined in liquid TY media containing 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600 and 650 mM NaCl and 0, 203, 298, 373, 438, 496, 548 and 573 g/L of Polyethylene glycol (PEG-6000), respectively. This experiment was carried out using a factorial arrangement in completely randomized design with three replicants. The results showed that salinity and drought tolerance among isolates was significantly different. All isolates were grouped in three clusters: sensitive, semi-sensitive and tolerant based on their growth rate in TY media containing different concentrations of NaCl and PEG-6000. The results also showed that all tolerant isolates excreted more exopolysaccharides compared to the sensitive and semi-sensitive ones. Based on salinity and drought experiments, two isolates of *Sinorhizobium meliloti* i.e. S27K and S36K were selected as superior in this experiment.

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*, alfalfa, salinity, drought, exopolysaccharid