مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره نهم ، شماره سی و سوم-زمستان ۱۳۹۷

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تأثیر سه سویه *ریزوبیوم* بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) تحت تنش نیکل

نازنین موذن‌پور، سیما یحیی‌آبادی*، منیر دودی

دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی ، اصفهان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: گونه‌های باکتریایی خاک که در ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند قادرند رشد گیاهان را بهبود بخشند. در هم‌زیستی گیاهان خانوادهٔ لگوم با باکتری‌های جنس *ریزوبیوم* علاوه‌بر این که بخش اصلی نیتروژن تثبیت شده به مصرف گیاه می‌رسد، خاک نیز از لحاظ نیتروژن تقویت می‌شود. در این پژوهش هدف تأثیر سه سویه *ریزوبیوم* بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*) تحت تنش نیکل بود.

مواد و روش: در این مطالعه دو نمونه استاندارد *ریزوبیوم* با کدهای (PTCC 1654) و (PTCC 1684) و سویه جداسازی و شناسایی مولکولی شده از محیط همراه نیکل به گیاه لوبیا چشم بلبلی تلقیح شد. سپس از باکتری‌ها سه غلظت 10^{8} CFU/ml و 10^{7}، 10^{6}× ۱/۵ تهیه و نیکل در سه غلظت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار تلقیح شد. نمونه‌ها بعد از گذشت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب یک طرح به‌طور کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. در پایان دوره، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه اندازه‌گیری شد و با استفاده از نرم افزار SPSS/۱۹ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان داد که مایه تلقیح سویه جداسازی شده از گره با غلظت 10^{7} CFU/ml × ۱/۵ و با حضور ۲۰۰ میکرومولار نیکل باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل) در گیاه گردید.

نتیجه‌گیری: یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌تواند ناشی از ریشه دوانی گیاه در نتیجه تولید اکسین و بالا رفتن میزان جذب آب و عناصر غذایی مورد نیاز گیاه باشد.
هم‌چنین یافته‌ها نشان داد که باکتری محرک رشد جداسازی شده از گره بر میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه لوبیا چشم بلبلی(*Vigna unguiculata*) تحت تنش نیکل مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: *ریزوبیوم*، نیکل، لوبیا چشم بلبلی، PCR

مقدمه

تثبیت نیتروژن به‌روش هم‌زیستی دارای انواع مختلفی است که از آن جمله می‌توان به هم‌زیستی باکتری‌های *ریزوبیوم* با گیاهان خانوادهٔ لگوم اشاره کرد. در هم‌زیستی گیاهان خانوادهٔ لگوم با باکتری‌های جنس *ریزوبیوم* علاوه‌بر این که بخش اصلی نیتروژن تثبیت شده به مصرف گیاه می‌رسد، خاک نیز از لحاظ نیتروژن تقویت می‌شود (۱). میکروب‌های محرک رشد گیاه دارای تنوع‌های سودمندی به‌منظور تحمل استرس‌های محیطی مانند دما، pH، شوری و خشکسالی غیرعادی با آلودگی فلزات سنگین و آفت کش ها هستند(۲).

باکتری‌های (PGPR) از طریق مکانیسم‌هایی مانند تولید هورمون‌های محرک رشد که نتیجه آن بهبود جذب آب و

نویسنده مسئول:
دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی ، اصفهان، ایران.
پست الکترونیکی:simayahyaabadi99@gmail.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۴/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۱۷

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

عناصر غذایی توسط گیاه است، تأثیر مفیدی روی بهبود جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه، تولید برخی از ترکیب‌های آنتی-بیوتیک، حذف عوامل بیماری‌زا و القای ژن‌های دفاعی گیاه، می‌توانند داشته باشند. به‌علاوه قادرند عوامل بیماری‌زای ریشه را از طریق حذف رقابتی نیز کاهش دهند. اکثر مطالعه‌های نشان داده است که باکتری‌های محرک رشد می‌توانند تحت شرایط عاری از میکروارگانیسم باعث افزایش رشد گیاه شوند. از جمله این موجودات میکروسکوپی می-توان به ریزوبیوم‌ها که با خانواده لگومینوز هم‌زیستی دارند اشاره کرد (۳). لگوم‌ها و ریزوبیوم‌ها می‌توانند به‌طور مستقل رشد کرده و تولیدمثل کنند ولی هیچ‌کدام نمی‌توانند نیتروژن جو را به تنهایی تثبیت کنند (۴). لگوم‌ها دارای ظرفیت‌های قابل توجهی برای ایجاد ارتباط هم‌زیستی با گونه‌های مختلف باکتری‌های خاک هستند(۵).

نیکل برای گیاهان به‌عنوان یک عنصر ضروری است اما غلظت آن در بیش‌تر گیاهان پایین است و از جمله عناصر کم مصرف ضروری برای رشد گیاهان است (۶).

Yasari and Patwadhan بیان کردند که میزان افزایش سطح برگ، ظرفیت فتوسنتزی گیاه را تعیین می‌کند. این محققین بر افزایش معنی‌دار شاخص سطح برگ گیاه کلزا زمانی که کودهای نیتروژنه توأم با کودهای زیستی به‌کار برده شده بود، تأکید داشتند (۷). با کاربرد کودهای زیستی، جذب عناصر غذایی توسط ریشه‌ها بیش‌تر شده و این امر منجر به افزایش رشد رویشی در گیاه و تولید برگ-های بیش‌تر می‌شود. در نتیجه، افزایش تعداد برگ‌ها به منزله افزایش سطح جذب نوری و سطح فتوسنتز در گیاه است (۸).

با توجه به پتانسیل بالای ریزوبیوم‌ها در بهبود و افزایش رشد گیاهان خانواده لگومیناسه و نیز عدم وجود اطلاعات کافی از تأثیر تنش نیکل بر ترکیب جمعیت این باکتری‌ها در منطقه ریزوسفر گیاه لوبیا چشم بلبلی و اثر آن‌ها بر رشد گیاه مورد نظر، ضرورت انجام این مطالعه لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. لذا تحقیق حاضر به‌منظور بررسی اثر تلقیح *ریزوبیوم* تحت تنش نیکل بر پاره‌ای از پارامترهای نامبرده طراحی شد و به‌صورت آزمایشگاهی و مشاهده صورت گرفت. متغیرهای مورد بررسی در این تحقیق شامل غلظت‌های مختلف از مایه تلقیح باکتری *ریزوبیوم* گونه‌های استاندارد کلکسیون میکروبی ایران و گونه جدا شده از گره گیاه لوبیا چشم بلبلی بود و غلظت‌های نیکل به‌عنوان متغیر مستقل و متغیرهای وابسته شامل رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه مورد مطالعه در نظر گرفته شد.

روش کار

تهیه کشت زنده از باکتری‌های استاندارد و نمونه جداسازی شده از گره:

ابتدا ریزوبیوم‌های استاندارد (*Rhizobium meliloti PTCC 1684*)، (*Rhizobium radiobacter PTCC 1654*) از مرکز کلکسیون میکروبی پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران واقع در شهرستان کرج به‌صورت کشت زنده خریداری شد. *ریزوبیوم* (*Rhizobium sp. (1C1* | 55229)) از ریشه گیاه لوبیا چشم بلبلی در محل گره‌ها جداسازی و شناسایی مولکولی شد. مشخصه‌های مرفولوژیک این باکتری‌ها بر روی محیط YMA (مرک، آلمان) عبارت بود از کلنی‌های برجسته با حالت لزج و به شکل گرد و صاف.

مراحل آزمایش کلنی – PCR جهت شناسایی سویه جداسازی شده از محیط

مقداری از کلنی خالص‌سازی شده باکتری با استفاده از لوپ استریل در ۱۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و به عنوان الگو برای واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر و شرایط لازم جهت انجام روش کلنی – PCR به‌ترتیب در جدول ۱ و ۳ ارائه است.

سپس مخلوط PCR، که شامل ترکیب‌های موجود در جدول ۱ است و فاقد DNA الگو است به‌صورت یک‌جا آماده گردید. پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. مخلوط PCR سپس در ویال‌های حاوی کلنی انتقال یافت و در نهایت ویال‌ها در دستگاه ترموسایکلر Corbet قرار داده شد تا طبق برنامه موردنظر قطعه ژنی 16S rDNA تکثیر شود. سیکل حرارتی این برنامه در جدول ۳ ارائه شده است. دمای LID (درپوش دستگاه) همواره ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. پس از اتمام PCR ویال‌ها از دستگاه خارج و برای مرحله‌های بعدی در فریزری با دمای ۲۰ – درجه سلسیوس نگه‌داری شد (۹).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

جدول ۱: مواد و غلظت مورد نیاز برای انجام واکنش کلنی – PCR (۹).

نام ماده	غلظت محلول اصلی	غلظت نهایی در واکنش	حجم مورد استفاده (µL)
آب مقطر تزریقی Injection Water	-----	-----	۱۹/۵ (۱۰ + ۹/۵)
بافر PCR	۱۰X	۱X	۲/۵
کلرید منزیم ($MgCl_2$)	۵۰ میلی مولار	۱/۵ میلی‌مول بر لیتر	۰/۷۵
dNTP	۱۰ میلی مولار	۲۰۰ میلی‌مول بر لیتر	۰/۵
پرایمرپیشروی یونیورسال	۱۰ میلی مولار	۰/۴میلی‌مول بر لیتر	۱
پرایمر معکوس یونیورسال	۱۰ میلی مولار	۰/۴ میلی‌مول بر لیتر	۱
Taq پلی‌مراز	۵ واحد بر میکرولیتر	۱ واحد در مخلوط نهایی	۰/۲
مجموع			۲۵

جدول ۲: توالی پرایمرهای عمومی انتخاب شده در این مطالعه (۹).

نام پرایمر	توالی پرایمر
OF BUN	L5′ - CGCATTTCACCGCTACAC-3′
OR BUN	L5′ - TATGTACACACCGCCCGT-3′
IF BUN	L5′ - TAAACCACATGCTCCACC-3′
IR BUN	L5′ - ACACACGTGCTACAATGG-3′

جدول ۳- سیکل حرارتی استفاده شده جهت انجام روش کلنی - PCR (۹).

فاز	دما (سیلسیوس)	زمان (ثانیه)
دناتوراسیون اولیه[1]	۹۴	۳۰۰
دناتوراسیون[2]	۹۴	۴۵
اتصال[3]	۵۸	۴۵
تکثیر[4]	۷۲	۴۵
تکثیر نهایی[5]	۷۲	۳۰۰
نگهداری	۴	-

[1] Initial Denaturation
[2] Denaturation
[3] Annealing
[4] Extention
[5] Final Extention

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

تعیین توالی قطعه تکثیر یافته: پس از بررسی کیفیت محصول PCR، ۳۰ میکرولیتر از این محصول جهت تعیین توالی به شرکت تالی ژن پارس ارسال شد. نتایج توسط نرم‌افزار Chromas نسخه ۲/۱ بررسی و سپس در NCBI به کمک سرور BLAST مورد ارزیابی و شناسایی گونه مربوطه قرار گرفت. در نهایت بر اساس همولوژی به‌دست آمده گونه موردنظر شناسایی شد.

رسم درخت فیلوژنتیکی (Taxonomic)

در تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک مولکولی، به‌منظور نمایش تنوع ژنتیکی و مطالعه‌های تکاملی، نتیجه تحلیل به شکل یک درخت فیلوژنتیک نمایش داده می‌شود. این روابط تکاملی به‌وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و ... که در معرض انتخاب طبیعی قرار گرفته‌اند تعیین می‌شود. درخت تکامل نژادی یا درخت تکاملی شاخه‌هایی که به هم در درخت متصل هستند، نشان دهنده داشتن یک جد مشترک است. در یک درخت تکامل نژادی ریشه‌دار، هر گره نشان دهنده جد مشترکی برای فرزندان آن گره است و طول یال‌ها در برخی از درختان ممکن است به‌عنوان تخمین زمان تفسیر شود. هر گره یک واحد طبقه‌بندی نامیده می‌شود. در این مطالعه جهت ترسیم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار CLC نسخه ۵/۵ استفاده شد.

تهیه، ضدعفونی نمودن، کاشت، آلوده سازی بذرها و تیمار با فلز سنگین نیکل

ابتدا بذرهای گیاه لوبیا چشم بلبلی(*Vigna unguiculata*) از مرکز تحقیقات کشاورزی دزفول *تهیه* گردید و در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و با آب مقطر استریل ۳ بار شستشو داده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲ ساعت در آب مقطر استریل خیسانده شد و سپس بذرهای ضدعفونی شده در پتری‌دیش‌های یک اندازه حاوی کاغذ صافی واتمن ۴۰ قرار داده شد، به این صورت که در هر پتری‌دیش ۳ عدد بذر گیاه به‌طور جداگانه در فاصله‌های مساوی قرار داده شد. در ادامه به هر پتری‌دیش ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی مایه تلقیح باکتری در غلظت‌های موردنظر به‌طور جداگانه اضافه شد و در مرحله بعدی به‌همراه پتری‌دیش‌های حاوی بذور تلقیح نشده به‌عنوان شاهد، در اطاقک کشت (مدل JTGL200) با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با فتوپریود (دوره نوری) ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شد و در پایان میزان رنگیزه فتوسنتزی (کلروفیل) محاسبه گردید.

جهت تیمار ابتدا از ریزوبیوم‌های استاندارد ن سه غلظت ($1/5 \times 10^6$، 10^7و 10^8 CFU/ ml) و به محیط کشت‌های تیمار شده با غلظت‌های (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) فلز نیکل تلقیح شدند. آزمایش‌ها به‌طورکامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

اندازه‌گیری مقدار کلروفیل برگ گیاه لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata*)

محاسبه غلظت کلروفیل در برگ‌های گیاه با استفاده از روش لیچتن تالر (Lichtenthaler) انجام شد. مطابق با این روش ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تر برگ وزن شده به لوله فالکون ۱۵میلی‌لیتری منتقل شد، سپس به آن استون ۸۰٪ اضافه شد. پس از صاف کردن نمونه‌ها با کاغذ صافی واتمن شماره ۴۰، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۶۴۷ ، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (مدل یونیکو Vis-2100) خوانش شد و مقدار کلروفیل a، b و کل با استفاده از فرمول‌های زیر بر حسب میلی‌گرم بر لیتر محاسبه گردید.

$$C_a = 12/25 \times A_{663} - 2/79 \times A_{647}$$
$$C_b = 21/50 \times A_{647} - 5/1 \times A_{663}$$
$$C_t = C_a + C_b$$

در معادله فوق، A میزان جذب قرائت شده در طول موج مورد نظر و C_a و C_b بر حسب میلی‌گرم در لیتر به‌ترتیب غلظت کلروفیل a وb است (۱۰).

آنالیزآماری

در این مطالعه تیمارهای موردنظر به‌طور تصادفی و به‌صورت فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن انجام شد.

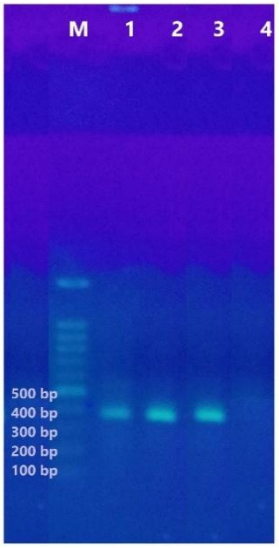
یافته‌ها

نتایج شناسائی مولکولی باکتری جداسازی شده

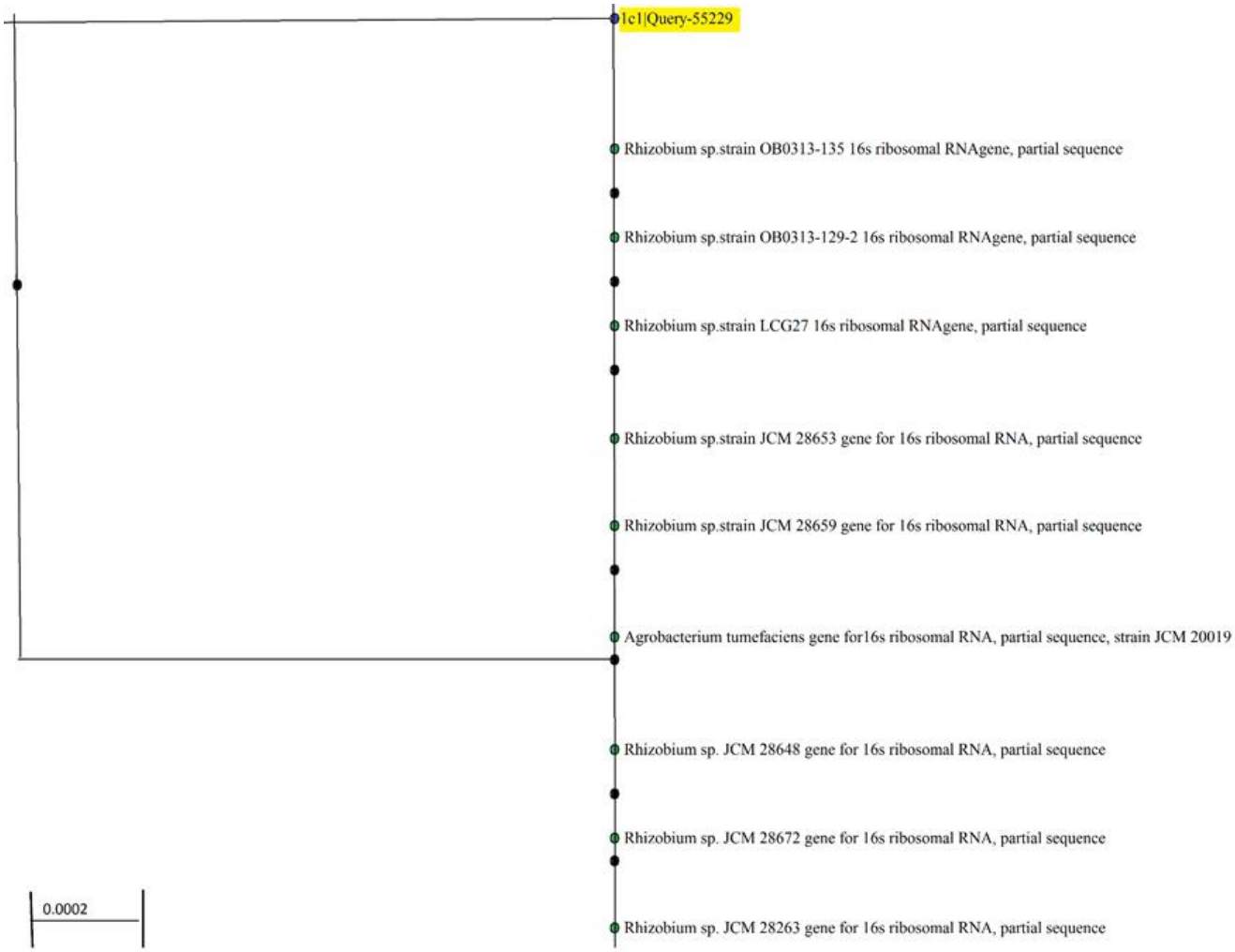
جهت بررسی نتایج PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rDNA باکتری موردنظر، محصول PCR با استفاده از ژل آگارز ۱٪ مورد ارزیابی قرار گرفتند که در شکل ۱ ارائه شده است. هم‌چنین چارت فیلوژنی *ریزوبیوم* جداسازی در شکل ۲ ارائه شده است.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]



شکل ۱- نتایج حاصل از الکتروفورز محصول PCR، سویه‌های *ریزوبیوم* جداسازی شده با پرایمر یونیورسال بر روی ژل آگارز ۱٪ ، در این بررسی از سایز ماکر bp ۱۰۰ استفاده شد. خط M: نشان دهنده مارکر، خط ۱: سویه *ریزوبیوم* جداسازی شده با کد (*1c1 | 55229*) ، خط ۲: سویه *سینوریزوبیوم* استاندارد (PTCC 1684) ، خط ۳: کنترل مثبت (*ریزوبیوم رادیوباکتر PTCC 1654*) ، خط ۴: کنترل منفی (آب مقطر)



شکل ۲- چارت فیلوژنی *ریزوبیوم* جداسازی شده از گره گیاه لوبیا چشم بلبلی (*1c1 | 55229*)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

جدول ۴- میانگین مربعات صفات مورد ارزیابی در گیاه لوبیا چشم بلبلی تحت اثر تعداد مختلف باکتری جداسازی شده از گره (*1c1 | 55229*) و ریزوبیوم‌های استاندارد *PTCC 1684* و *PTCC 1654* (10^8 CFU/ml و 10^7، 10^6) و غلظت‌های متفاوت (۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) نیکل در مقایسه با نمونه شاهد (محاسبات با سه تکرار انجام شده است).

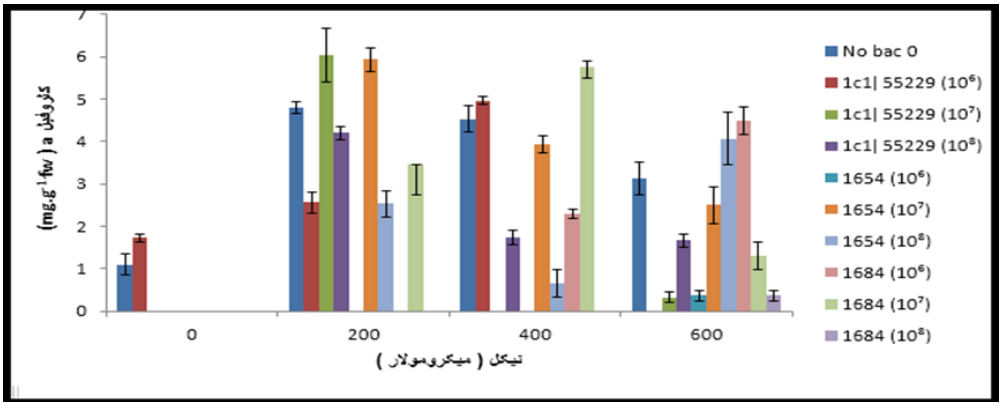
منابع تغییرات	Df	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل
Bac_s	۲	۱/۹۳۲ *	۵/۷۶۹ *	۱۴/۷۱۰ *
گروه غلظت	۲	۱۵/۱۲۸ *	۴۹/۲۰۳ *	۱۱۸/۶۲۳ *
تیمار نیکل	۳	۳۹/۱۴۶ *	۱۱۹/۱۶۶ *	۲۹۶/۳۱۸ *
Bac_s × گروه	۴	۱۶/۷۵۰ *	۵۰/۸۸۷ *	۱۲۶/۰۰۶ *
Bac_s ×تیمار	۶	۱۰/۳۲۷ *	۳۳/۴۶۹ *	۸۳/۴۰۴ *
گروه ×تیمار	۶	۱۴/۵۹۳ *	۴۲/۴۳۳ *	۱۰۹/۶۳۲ *
Bac_s ×تیمار ×گروه	۱۲	۷/۱۰۸ *	۲۱/۰۸۸ *	۵۳/۵۹۵ *
خطا		۰/۱۹۷	۰/۵۷۰	۱/۵۰۴

Bac_s: باکتری جداسازی شده از گره (1c1 | 55229) و ریزوبیوم های استاندارد PTCC 1684 و PTCC 1654، تیمار: غلظت‌های نیکل، گروه: تعداد مختلف باکتری‌های استفاده شده، Df: درجه آزادی، *: معنی دار در سطح ۰/۰۵

آنالیز رنگیزه‌های کلروفیل a، b و کل

کلروفیل a

براساس نتایج آماری جدول ۴ نمودار (شکل ۳) رسم شده است که اثر غلظت‌های مختلف نیکل شامل ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار بر تولید کلروفیل a با تیمارهای استاندارد *ریزوبیوم(PTCC 1684)*، *(PTCC 1654)* و *ریزوبیوم* جداشده از گره *(1c1 | 55229)* همراه با شاهد (آب) در برگ گیاه لوبیا چشم بلبلی *(Vigna unguiculata)* ارائه شده است. کلروفیل a میزان تولید بالایی همراه با *ریزوبیوم* جداسازی شده از گره *(1C1 | 55229)* با تعداد CFU/ml 10^7 و نیز غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیکل نسبت به نمونه‌های استاندارد شامل *ریزوبیوم ملی لوتی PTCC 1684* و *ریزوبیوم رادیوباکتر PTCC 1654* با تعدادهای مختلف باکتری و نیز غلظت‌های متفاوت نیکل نشان داده است، که از لحاظ آماری در سطح معناداری بود.

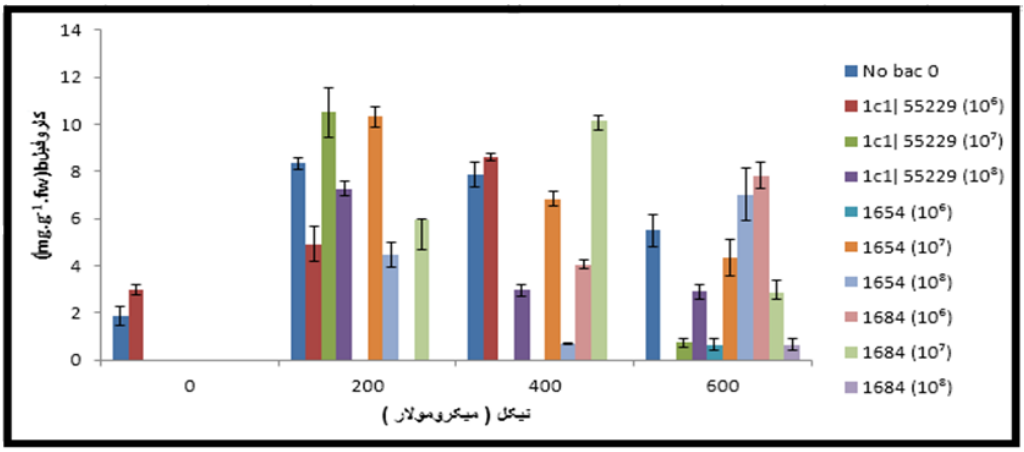


شکل ۳- میزان تولید کلروفیل a گیاه لوبیا چشم بلبلی تحت تأثیر تعداد مختلف باکتری جداسازی شده از گره (1c1 | 55229) و ریزوبیوم‌های استاندارد PTCC 1684 و PTCC 1654 (10^8 CFU/ml و 10^7، 10^6) و غلظت‌های متفاوت (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) نیکل در مقایسه با نمونه شاهد (بدون باکتری و نیکل)

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

کلروفیل b

بر اساس نتایج آماری جدول ۴ نمودار (شکل ۴) رسم شده است که اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر تولید کلروفیل b همراه با تیمار توسط سویه‌های استاندارد باکتری *ریزوبیوم (PTCC 1684)*، *(PTCC 1654)* و *ریزوبیوم* جدا شده از گره *(1c1|55229)* برگ گیاه لوبیا چشم بلبلی *(Vigna unguiculata)* نشان داده شده است. کلروفیل b در حضور *ریزوبیوم* جداسازی شده از گره *(1C1|55229)* با تعداد 10^{7} CFU/ml و غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیکل در مقایسه با دیگر نمونه‌ها سطح تولید بیش‌تری را نشان داد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود.



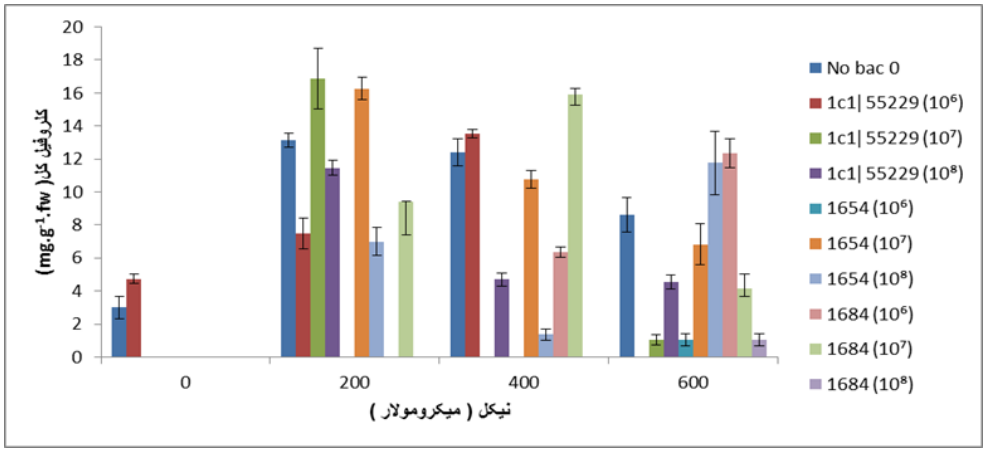
شکل ۴- میزان تولید کلروفیل b گیاه لوبیا چشم بلبلی تحت تأثیر تعداد مختلف باکتری جداسازی شده از گره (1c1 | 55229) و ریزوبیوم‌های استاندارد PTCC 1684 و PTCC 1654 (CFU/ml 10^{8} و 10^{7}، 10^{6}) و غلظت‌های متفاوت (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) نیکل در مقایسه با نمونه شاهد (بدون باکتری و نیکل)

کلروفیل کل

بر اساس نتایج آماری جدول ۴ نمودار (شکل ۵) رسم شده است که اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر تولید کلروفیل کل همراه با تیمار توسط سویه‌های استاندارد باکتری *ریزوبیوم (PTCC 1684)*، *(PTCC 1654)* و *ریزوبیوم* جدا شده از گره *(1c1|55229)* برگ گیاه لوبیا چشم بلبلی *(Vigna unguiculata)* نشان داده شده است. کلروفیل کل در حضور *ریزوبیوم* جداسازی شده از گره *(1c1|55229)* با تعداد 10^{7} CFU/ml و غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیکل در مقایسه با دیگر نمونه‌ها سطح تولید بیش‌تری را نشان داد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]



شکل ۵- میزان کلروفیل کل گیاه لوبیا چشم بلبلی تحت تأثیر تعداد مختلف باکتری جداسازی شده از گره (1c1 | 55229) و ریزوبیوم های استاندارد PTCC 1684 و PTCC 1654 (CFU/ml ۱۰^۸ و ۱۰^۷، ۱۰^۶) و غلظت‌های متفاوت (۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار) نیکل در مقایسه با نمونه شاهد (بدون باکتری و نیکل)

بحث

براساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان تولید رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاه لوبیا چشم بلبلی برای تیمارهای مختلف ریزوبیوم‌ها (تعداد باکتری‌ها) و غلظت‌های مختلف نیکل بسیار متفاوت بوده است. فتوسنتز از نظر لغوی به معنای تولید هیدرات‌های کربن با استفاده از نور خورشید است که شامل دو دسته واکنش است ،که هر دو در کلروپلاست صورت می‌گیرد. طی فتوسنتز انرژی، آب و اکسیژن تولید می‌شود. برجسته‌ترین خصوصیت ساختمانی کلروپلاست، سیستم فشرده غشاهای درونی است که به تیلاکوئید معروف است، کل کلروفیل در این سیستم غشایی که محل واکنش نوری فتوسنتز است، قرار می‌گیرد. اولین نشانه پیری برگ‌ها تغییر ساختار و عملکرد کلروپلاست‌ها است (۱۱). در این پژوهش بالاترین میزان کلروفیل b و a و کل با استفاده از سویه جداسازی شده از گره برگ (*1c1 | 55229*) با تعداد CFU/ml ۱۰^۷ و همراه با غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیکل به‌دست آمد.

گونه‌های مختلف *ریزوبیوم* در بسیاری از نقاط دنیا از روی گونه‌های متفاوت یونجه یک ساله و چند ساله در شرایط دیم و آبی جداسازی می‌شوند. این باکتری در حد تجاری جهت تثبیت ازت تولید و مصرف می‌شود (۱۲).

مشابه این مطالعه .Sarvari et al در سال ۲۰۰۲ نشان داد که افزایش محتوای کلروفیل در مرکز فتوسیستم II و هم-چنین کمپلکس پروتئین – کلروفیل a/b جمع کننده نور فتوسیستم II در تیمار گیاه با غلظت پایین سرب قابل مشاهده است (۱۳). این شباهت‌ها نشان دهنده احتیاج گیاهان به فلزات سنگین در مقدارير کم است.

.Nyitrai et al در سال ۲۰۰۳ دریافتند که استفاده از غلظت‌های پایین کادمیوم، سرب و نیکل با یکدیگر در محلول غذایی و یا به‌صورت اسپری روی برگ‌های لوبیا سنتز کلروفیل را تسهیل می‌کند که هماهنگ با یافته‌های این پژوهش است. این مطالعه‌های نشان می‌دهد که حضور فلزات سنگین در غلظت‌های پایین در تولید کلروفیل مؤثر است (۱۴).

.Alipour et al در سال ۲۰۰۹ گزارش کردند که غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیترات نیکل موجب افزایش کلروفیل‌های برگ گیاه زعفران می‌گردد. این فلز در غلظت-های بالا میزان کلروفیل تربچه را کاهش می‌دهد که مطابق با نتایج حاصل از این پژوهش است اما در مطالعه حاضر گرچه بالاترین میزان تولید کلروفیل مرتبط با غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیکل بوده است، اما غلظت‌های ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرومولار نیکل نیز در مقایسه با کنترل میزان کلروفیل کل را افزایش دادند. هم‌چنین طبق گزارش ارائه شده رشد گیاه تربچه در خاک‌هایی که دارای غلظت بالایی از فلزات کادمیم و روی هستند باعث کاهش محتوای کلروفیل برگ می‌شود که بر خلاف نتایج حاصل از این مطالعه است. این تفاوت می‌تواند ناشی از متفاوت بودن نوع گیاه و نوع فلز سنگین مورد ارزیابی باشد. طبق مطالعه‌های صورت گرفته نیکل آخرین عنصری است که به‌عنوان عنصر

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

ضروری برای رشد گیاه طبقه‌بندی می‌شود. این عنصر به‌طور واضح تأثیر مهمی بر تولیدات مزرعه‌ایی، گیاهان تثبیت کننده نیتروژن، تولید کننده آمونیاک و اوره دارد. اوره فرم قابل جذب نیتروژن بوده و از این ماده به‌عنوان منبع اولیه نیتروژن یاد می‌کنند (۱۵).

Najafi and Jamei در سال ۲۰۱۴ طی آزمایشی نشان دادندکه نـانوذرات نقره با غلظت ۵۰ppm میزان کلروفیل a و b را در بـرگ‌های گیاه ماش سبز به‌طور معنی‌داری نسـبت بـه شاهد افزایش می‌دهد که مطابق با نتایج این مطالعه است. این تشابه نشان می‌دهد که فلزات سنگین در غلظت‌های پایین بر روی گیاهان خانواده لگومیناسه مؤثر هستند (۱۶).

Brahim and Mohamed در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که فلز مس در تعدادی از واکنش‌های زنجیره انتقال الکترون فتوسنتزی و تنفس مورد نیاز گیاه اسفناج باغی[1] دخالت کرده و سبب کاهش مقـدار کلروفیـل a و b در این گیاه می‌شود که برخلاف نتایج حاصل از این پژوهش بوده است (۱۷). البته علت متفاوت بودن نتایج می‌تواند مربوط به نوع گیاه و نوع فلز سنگین مورد ارزیابی باشد.

برخلاف نتایج این تحقیق، Han and Lee در سال ۲۰۰۵ تغییرهای رنگیزه‌های فتوسنتزی را در گیاه کاهو با تلقیح باکتری‌های محرک رشد مشاهده کردند به‌طوری‌که این باکتری‌ها باعث افزایش غلظت کلروفیل نسبت به تیمار شده بودند. این موضوع می‌توانست مربوط به تولید و ترشح ترکیب‌های تحریک کننده رشد و نمو و فعالیت‌های بیوشیمیایی گیاه باشد (۱۸). البته برخی از محققین اذعان داشته‌اند که این باکتری‌های محرک رشد از طریق مکانیسم‌های مختلف نظیر تولید انواع آنتی‌بیوتیک و هم‌چنین از طریق تولید فیتوهورمون‌ها مانند اکسین‌ها و جیبرلین‌ها باعث ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان می‌گردند (۱۹). این نتایج غیر مشابه می‌تواند مربوط به تفاوت عملکرد دو گیاه کاهو و لوبیا چشم بلبلی باشد زیرا از دو خانواده متفاوت هستند.

در تحقیقی که Pour Akbar and Ebrahim Zadeh در مطالعه خود در سال ۲۰۱۴ نشان دادند که محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئیدها در ذرت تحت تأثیر غلظت‌های سمی مس و نیکل کاهش می‌یافت. البته، نتایج آن‌ها برخلاف یافته‌های این پژوهش بود که با غلظت‌های پایین‌تر نیکل پاسخ مناسب‌تری از گیاه دریافت شد. این تفاوت می‌تواند به‌علت تفاوت در نوع گیاه و غلظت‌های متفاوت فلز به‌کار رفته به‌عنوان عامل تنش‌زا باشد (۲۰).

Amini and Amirjani در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که تیمار با نیکل در روزهای دوم و پانزدهم محتوای کلروفیل در یونجه را کاهش می‌دهد. نتایج حاصل از این مطالعه نیز بر خلاف یافته‌های این پژوهش است (۲۱).

بررسی‌های تعدادی از محققین نشان داده است که مراحل اولیه بیوسنتز کلروفیل که شامل سنتز ۵ آمینولووینیک اسید (ALA) و فعالیت آنزیم ۵ آمینولووینیک اسید دهیدراتاز (ALAD) که تبدیل (ALA) به پرفوبیلینوژن را انجام می‌دهد، از حساس‌ترین مراحل نسبت به‌حضور فلزات سنگین محسوب می‌شود (۲۳ ، ۲۲). در این مطالعه نیز حضور فلز نیکل و تنش ناشی از آن میزان تولید کلروفیل را در گیاه بالا برده بود. برخلاف نتایج این مطالعه، ایجاد اختلال در مراحل مختلف سنتز کلروفیل به‌وسیله فلزات سنگین از دلایل اصلی کاهش محتوای کلروفیل در گیاهان تحت تیمار عناصر سنگین بوده است (۲۴) که این اختلاف نتایج را می‌توان به میزان تلقیح فلزات سنگین و نوع آن‌ها نسبت داد. مطابق با نتایج این پژوهش، Sheikhi-Ghahfarokhi در سال ۲۰۱۴ نشان داد که تیمار گیاه همیشه بهار با باکتری‌های محرک رشد *باسیلوس sp*، *سودوموناس پوتیدا*، *سودوموناس فلورسنس*، *ازتوباکتر sp* و *کورینه باکتریوم sp* منجر می‌شود که به‌طور معنی‌داری میزان کلروفیل a در این گیاه نسبت به شاهد افزایش یابد. این شباهت نشان می‌دهد که دو گیاه همیشه بهار و لوبیا چشم بلبلی که هر دو دارای گره در ریشه هستند و جزء گیاهان علفی محسوب می‌شوند، باکتری‌های محرک رشد گوناگون روی آن‌ها اثرهای یکسانی دارد (۲۵).

مطابق این پژوهش.Farias et al سال ۲۰۱۶ در برزیل با آزمایشی بیان کردند هم‌زیستی ریشه لوبیا چشم بلبلی با *ریزوبیوم sp* باعث می‌شود ریشه گیاه به اسیدیته خاک مقاوم‌تر شود و به‌طور معناداری میانگین وزنی گیاه بالا رفته و میزان سبزی برگ‌ها بیش‌تر گردد (۲۶).

همانند این آزمایش Nyoki and Ndakidemi در سال ۲۰۱۶ طی آزمایشی در تانزانیا بیان کردند که تلقیح *ریزوبیم sp* به

[1] *Atriplex*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

همراه غلظت‌هایی از فسفر و پتاسیم به‌طور معناداری ($P< ۰/۰۵$) باعث افزایش کلروفیل کل برگ گیاه سویا می‌گردد (۲۷).

هم‌چنین Rajeswari et al. در سال ۲۰۱۷ طی آزمایشی در هند به این نیجه رسیدند که تیمار و تلقیح لوبیا چشم بلبلی با *ریزوبیوم sp* همراه با نیکل نسبت به سایر تیمارها منجر به رشد بهتر و افزایش میزان کلروفیل a و b بیش‌تری داشته است که این شباهت به‌احتمال زیاد به‌دلیل اثر یکسان *ریزوبیوم sp* بر لوبیا چشم بلبلی بوده است (۲۹). البته تحقیقات نشان داده است که نیکل اضافی می‌تواند از رشد و نمو گیاه جلوگیری کند، کلروزیس و پژمردگی برگ را القا نماید و کلروفیل کل محصول نهایی گیاه را کاهش دهد. سمیت نیکل می‌تواند از شدت فتوسنتز بکاهد و فعالیت آنزیم‌های مربوط به آن را تغییر دهد (۲۸).

Woldekiros سال ۲۰۱۸ در اتیوپی طی آزمایشی نشان داد که تلقیح سویه *ریزوبیوم sp* در ترکیب با پتاسیم به‌طور معنادار باعث افزایش ارتفاع و بالابردن سطح کلروفیل‌های موجود در برگ گیاه باقلا[1] می‌شود که این شباهت‌ها به احتمال زیاد به دلیل اثر یکسان ریزوبیوم‌ها بر لگوم‌ها بوده است (۲۹).

با وجود این، در سطح مولکولی، سازوکارهای دست اندرکار در سمیت نیکل بسیار ناشناخته‌اند و به مطالعه‌های بیش-تری نیاز دارد. از جمع‌بندی مطالعه‌های انجام شده، چنین بر می‌آید که کاهش رشد و فتوسنتز ناشی از سمیت نیکل نمی‌تواند فقط به یک عامل مربوط باشد و به‌نظر می‌رسد در نتیجهٔ تأثیر ترکیبی از عوامل متعدد بر ساختار کلروپلاست، میزان کلروفیل و کمپلکس‌های پروتئینی فتوسنتزی ایجاد می‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد که، مایه تلقیح سویه جداسازی شده از گره با تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۷}$ CFU/ml باکتری و میزان غلظت ۲۰۰ میکرومولار نیکل باعث افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل) در گیاه لوبیا چشم بلبلی می‌شود. به‌نظر می‌رسد افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در این پژوهش به‌دلیل تأمین مواد غذایی برای این گیاه توسط باکتری محرک رشد بوده است و هم‌چنین با توجه به یافته‌های حاصل از این مطالعه ضرورت استفاده از عنصر نیکل در غلظت‌های کم برای رشد این گیاه لازم و ضروری است. به‌احتمال زیاد افزایش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی با باکتری‌های محرک رشد جداسازی شده از گره می‌تواند به‌دلیل ریشه دوانی گیاه در نتیجه تولید اکسین و در نتیجه افزایش میزان جذب آب و عناصر غذایی مورد نیاز فتوسنتز در گیاه باشد و کاهش آن با غلظت‌های بالاتر نیکل می‌تواند به‌علت مهار مراحل مختلف بیوسنتز کلروفیل هم‌چنین جایگزین شدن یون منیزیم مرکزی به‌وسیله فلز سنگین نیکل باشد.

[1] *Vicia faba L.*

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

منابع

1. Bordeleau I M, Prevost D. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environment. Int J Plant Soil Sci. 1994; 161 (1): 115-25.
2. Gopalakrishnan S, Sathya A, Vijayabha Athi R, Varshney RM, Gowda CLL, Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia:challenges and opportunities. Adv Biotechnol. 2015; 5 (1): 355–377.
3.Valverde A, Burgos A, Fiscella T, Rivas R, Velaz quez E. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii PS06(*a phosphate-solubilizing bacteria) and Mesorhizobium ciceri C-2/2 strains on the growt and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. Int J Plant Soil Sci. 2006; 287 (2): 43-5.
4. Ford Denison R. Legume Sanctions and the Evolution of Symbiotic Cooperation by Rhizobia . Am Nat. 2000; 156 (6): 567–76.
5. Requena N, Perez-Solis E, Azcon-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM. Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of decertified ecosystems. Appl Environ Microbiol. 2001; 67 (2): 495-498.
6. Hasanpour Esfahani SH. 2013, The effect of nickel toxicity on some physiological and biochemical indices of sunflower plant (*Helianthus annuus l.*), Master thesis. Islamic Azad University of Falavarjan Branch.
7.Yasari E, Patwadhan AM. Effects of *aztobacter* and *azospirillum* inoculations and chemical fertilizers on growth and productivity of canola. Asi Jplant sci. 2007; 6 (1): 77-82.
8. Sedghi Moghadam M, Mirzaee M. Effect of m unicipal solid wastes compost on the yield and some quantitative and qualitative indices of pumpkin (Cucurbita moschata Duch. Expoir.), In: Proceeding of National Congress of Recycling and Reuse of Renewable Organic Re sources in Agriculture, Isfahan, Iran, 3: pp 121. 2008.
9. Chennappa G, Adkar Purushothama CR, Suraj U, Tamilvendan K, Sreenivasa MY. Pesticide tolerant azotobacter isolates from paddy growing areas of northern karanataka, india Word J Microbiol Biotechnol. 2013; 10 (4): 1412-23.
10. Lichtenthaler KH. Chlorophyll and carotenoids pigments of photosynthetic biomembrances. Methods Enzymol. 1994; 148 (1): 350–82.
11. Resh HM. Hydroponics food production.woodbridge press publishing ,P.O.Box209, Valence Fluctuations Solids, Santa Barbara Inst. Theor Phys Conf. 2001; 1 (4): 220-9.
12. Beck DP, Materon LA, Afandi F. Practical Rhizobium- legume technology manual. Int Center Agri Res Dry Areas Tech Man. 1993; 19 (1): 1-12.
13. Sarvari E, Gaspar L, Fodor L, Cseh E, Kropfl K, Varga A, Baron M. Comparison of the effects of Pb treatment on thylakoide development in poplar and cucumber plants. Acta Biologil Szeged. 2002; 46 (3): 163-5.
14. Nyitrai P, Bóka K, Gáspár L, Sárvári E, Lenti K, Karesztes A. Characterization of the stimulating effect of low-dose stressors in maize and bean seedlings. J Plant Physiol. 2003; 160 (2): 1175-83.
15. Alipour Darvari H, zare Mayvan H, Sharifi M. Peroxidase activity in Raphanus sativus and its relationship to the amount of heavy metals in soil J Sci Univ Teh. 2009; 35 (1): 37-43.
16. Najafi S, Jamei R. Effect of silver nanoparticles and $Pb(NO3)_2$ on the yield and chemical composition of mung bean *(Vigna radiata)*. J. Stress Physiol Biochem. 2014; 10 (1): 316-25.
17. Brahim L, Mohamed M. Effects of copper stress on antioxidative enzymes, chlorophyll and protein content in *Atriplex halimus*. Afr J Biotechnol. 2011; 10 (50): 10143-8.
18. Han HS, Lee KD. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity Res J Agric Biol Sci. 2005; 1 (13) : 210-5.
19. Barea JM, Pozo MJ, Azcon R, Azcon-Aguilar C. Microbial co-operation in the rhizosphere. J. Exp Bot. 2005; 56 (1): 1761-78.
20. Pour Akbar L, Ebrahim Zadeh N. Growth and physiological responses of corn *(Zea mays L.*) to copper and nickel. Open Agric J. 2014; 103 (27): 147-159.
21. Amini F, Amirjani MR. The effect of nickel and lead treatment on chlorophyll content and accumulation of these metals in alfalfa (*Medicago sativa*). Mag Prod Proc crops gar. 2012; 2 (6): 11-20.
22. Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL, de la Rosa G, Gonzales JH, Herrera I. Effect of heavy metals on alfalfa plants at different growth stages. Adv Environ Res. 2004; 8 (1): 679-85.
23. Prasad S, Dwivedi R, Zeeshan M, Singh R. UV-B and cadmium induced changes in pigments, photosynthetic electron transport activity, antioxidant levels and antioxidative enzyme activities of *Riccia sp*. Acta Physiol Plant. 2004; 26 (4): 423-30.
24. Malkowski E, Kita A, Galas W, Karcz W, Kuperberg M. Lead distribution in corn seedling (*Zea mays L.*) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. Int J Plant Soil Sci. 2002; 37 (1): 69-76.
25. Sheikhi-Ghahfarokhi F. Effect of seed biopriming by PGPR bacteria on germination indices, growth and yield of Calendula of ficinalis L. M.Sc. Thesis in Seed Science and Technology, Shahrekord University, 2014; 93 pp.
26. Farias PT, Trochmann A, Lima Soares B, Souza Moreira FM. Rhizobia inoculation and liming increase cowpea productivity in Maranhão State. Acta Sci Agronomy. 2016; 38 (3): 387-95.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]

27. Nyoki D, Ndakidemi PA. Effects of Rhizobia Inoculation, Phosphorus and Potassium on Chlorophyll Concentration of Soybean Grown under Maize Intercropping System. Int J Plant Soil Sci. 2016; 13 (6): 1-10.
28. Chen C, Huang D, Liu J. Functions and t oxicity of Nickel in plants: advances and future prospects. Laundry Dry Clean J Can. 2009; 37 (4): 304-13.
29. Woldekiros B. Response of Faba Bean (*Vicia faba L.*) to Rhizobium Inoculation and Potassium Fertilizer Rates at Alicho Wuriro Highland, Southern Ethiopia. Int J Res Agri For. 2018; 5 (5): 43-47.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-20]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.8.2]