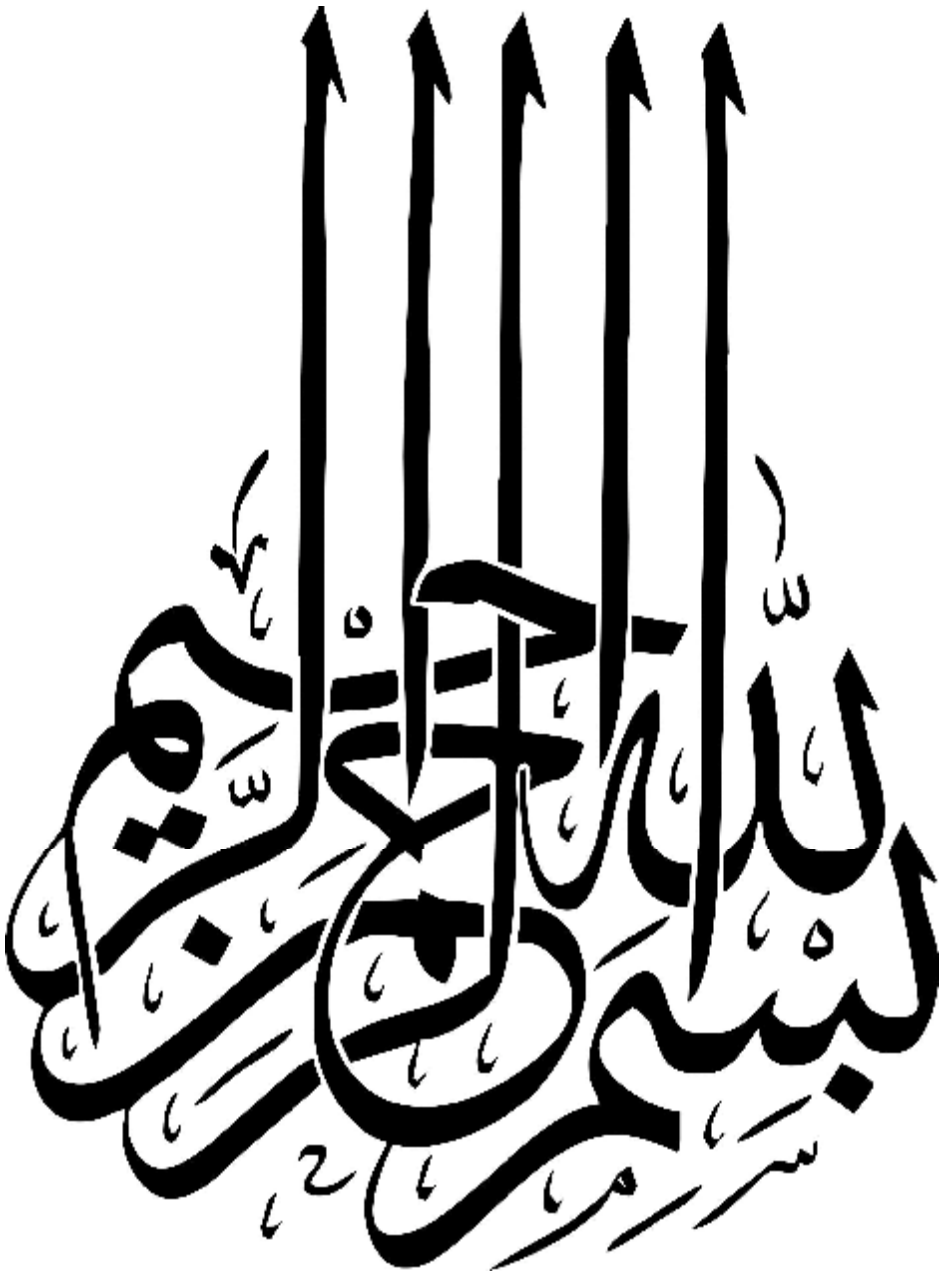
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تبریز

دانشکده کشاورزی

گروه علوم خاک

رساله

برای دریافت درجه دکتری تخصصی (Ph.D) رشته علوم خاک

گرایش بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

عنوان

بررسی اثرات متقابل و الگوی استقرار قارچهای میکوریز آربوسکولار در ریشه نخود با حضور جدایه‌های مختلف باکتری مزوریزوبیوم سیسری با استفاده از روشهای مولکولی

استادان راهنما:

دکتر ناصر علی اصغر زاد **دکتر غلامرضا صالحی جوزانی**

استادان مشاور:

دکتر محسن مردی **دکتر احمد اصغر زاده**

پژوهشگر

علیرضا توسلی

تیر ماه ۱۳۹۰ **شماره: ۱۳**

تقدیم به:

همسرم مهربانم

و دختر عزیزم غزل

از همکاری صمیمانه پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج به خاطر حمایت مالی کارهای مولکولی اجرای این رساله و همچنین همکاران بخش بیوتکنولوژی میکروبی و ایمنی زیستی، و ژنومیکس که کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزنده‌ای در انجام کارهای مولکولی به اینجانب نموده‌اند کمال تشکر و سپاسگذاری را می‌نمایم.

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس بی‌کران به درگاه ایزدمنان که نعمت آموختن و تحصیل را بر ما ارزانی داشت. خدای را شاکرم که به لطف او و دعای خیر پدر و مادر و تلاش‌ها و حمایت‌های ارزنده اساتید گرامی توانستم کار کوچکی را با عشقی بزرگ به انجام برسانم.

بدین وسیله بر خود لازم می‌دانم از استاد محترم علم و اخلاق جناب آقای دکتر ناصرعلی‌اصغرزاد که در طول دوران تحصیل و در تمام مراحل انجام و تهیه رساله صادقانه مرا راهنمایی و کمک نمودند، کمال تشکر و سپاسگذاری را بنمایم. از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر غلامرضا صالحی که به حق در اجرای این رساله از هیچ کمک و تلاشی فروگذار نبوده‌اند صمیمانه‌ترین سپاسگذاری قلبی خود را تقدیم می‌دارم.

از جناب آقایان دکتر محسن مردی و دکتر احمد اصغرزاده اساتید مشاور رساله که کمک‌ها و راهنمایی‌های ارزنده‌ای به اینجانب نمودند، تشکر و سپاسگذاری می‌نمایم. از جناب آقایان دکتر صفری، دکتر باغبان و دکتر بلندنظر که زحمت داوری رساله را بر عهده داشته‌اند و همچنین از آقای دکتر ذهتاب نماینده محترم تحصیلات تکمیلی کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم. از اساتید محترم گروه علوم خاک آقایان دکتر نیشابوری، دکتر جعفرزاده، دکتر اوستان، دکتر نجفی، دکتر شهبازی، دکتر ساریخانی و دکتر ریحانی‌تبا و سایر اعضاء و کارکنان گروه تشکر و سپاسگذاری می‌نمایم.

از همکاران محترم بخش تحقیقات خاک و آب مرکز تحقیقات کشاورزی، بخصوص جناب آقای مهندس بایبوردی که در طول دوران تحصیل مرا یاری نمودند کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم.

از پدر و مادر عزیزم که همواره در طول دوران زندگی مشوق و راهنمای من بوده و دعای خیر آنها بدرقه راه و پشتیبان من بوده است، تشکر و سپاسگذاری می‌نمایم اگرچه هرگز نتوانیم که ادای دین نماییم.

از همسر مهربانم، دختر عزیزم غزل و پدر و مادر همسرم که همه سختی‌ها را با صبوری تحمل نموده و در تمام مراحل تحصیل در دوره دکتری یار و یاور من بوده‌اند و با حضورشان به من دلگرمی بخشیدند از صمیم قلب تشکر و قدردانی می‌کنم و از درگاه خداوند متعال برای آنان سعادت و سلامتی روز افزون خواستارم.

از همکاران و دوستان گرامی جناب آقای دکتر ناصری، دکتر فرج‌زاده، و آقایان مهندس فرج‌نیا، مهندس میلانی، مهندس احمدی، مهندس ثروتی، مهندس وحیدی، مهندس حق‌دار و خانم مهندس امانیفر و خانم مهندس محمدی و سایر عزیزان دیگر کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم.

علیرضا توسلی تیر ۱۳۹۰

نام خانوادگی دانشجو : توسلی **نام :** علیرضا

عنوان رساله :

بررسی اثرات متقابل و الگوی استقرار قارچهای میکوریز آربوسکولار در ریشه نخود با حضور جدایه های مختلف باکتری *مزوریزوبیوم سیسری* با استفاده از روشهای مولکولی

استادان راهنما :

دکتر ناصر علی اصغر زاد دکتر غلامرضا صالحی جوزانی

استادان مشاور:

دکتر محسن مردی دکتر احمد اصغر زاده

مقطع تحصیلی : دکتری **رشته :** خاکشناسی **گرایش :** بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

دانشگاه : تبریز

دانشکده : کشاورزی **تاریخ فارغ‌التحصیلی** : تیر ۱۳۹۰ **تعداد صفحه :** ۱۳۴

کلید واژه‌ها: قارچهای میکوریز آربوسکولار، *مزوریزوبیوم سیسری*، PCR کمی، نخود، گره، عناصر غذایی، کلنیزاسیون ریشه

چکیده :

گیاهان لگوم همزیستی سه جانبه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF) و باکتریهای *Rhizobium* دارند. قارچ‌های میکوریز همزیست اجباری ریشه گیاهان هستند که نقش مهمی در واکنشهای اکولوژیکی دارند. لگومها از جمله گیاهانی هستند که با باکتریهای *Rhizobium* همزیستی برقرار کرده و اندامی به نام گره تشکیل می‌دهند که محل تثبیت نیتروژن می‌باشد. تثبیت کننده‌های همزیست نیتروژن و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شباهتهایی در برقراری همزیستی و تغییرات مورفولوژیکی در ریشه دارند. یکسری از ژنها مشخص شده‌اند که برای تشکیل گره‌های *Rhizobium* و همزیستی AM عمومی می‌باشند. در این تحقیق گیاهان نخود (*Cicer arietinum* L. cv. ILC482) با گونه‌های قارچ میکوریز و جدایه‌های باکتری *مزوریزوبیوم سیسری* بصورت فاکتوریل و در یک طرح بلوک تصادفی در سه تکرار مایه‌زنی شدند. تیمار قارچی شامل سه گونه از قارچ‌های میکوریز آربوسکولار شامل (GI) *Glomus intraradices* ، (GM) *G. mosseae* و (GE) *G. etunicatum* بود، یک تیمار بدون قارچ، و یک تیمار مخلوط سه گونه قارچی در مجموع ۵ تیمار قارچی را تشکیل دادند. برای تیمارهای GI، GM و GE به ترتیب مقادیر ۱۰۰، ۱۵۰ و ۵۰ گرم از زادمایه قارچی بر

اساس پتانسیل MPN محاسبه شده (به ترتیب۲۴۰، ۱۶۰ و ۴۸۰ پروپاگول به ازاء هر سانتیمتر مکعب از زادمایه) برای هر کیلوگرم ماسه به گلدان‌های مربوطه (هر گلدان ۲ کیلوگرم) اضافه و با بستر شنی مخلوط گردیدند. برای تیمار کشت مخلوط قارچ‌ها نیز به ترتیب مقادیر ۳۳، ۵۰ و ۱۷ گرم از زادمایه قارچی با همدیگر مخلوط و به ازاء هر کیلوگرم ماسه به گلدان‌های مربوطه اضافه و با بستر شنی مخلوط شدند. ۶ جدایه باکتری همزیست نخود، ۱ تیمار مخلوط ۶ جدایه و ۱ تیمار بدون باکتری در نظر گرفته شد، که در مجموع ۸ تیمار باکتری را شامل شدند. از سوسپانسیون باکتری به میزان ۱۰ میلی‌لیتر با جمعیت $۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی‌لیتر به هر گلدان اضافه گردید. گیاهان بعد از ۸ هفته برداشت گردیدند. گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ و باکتری بطور کلی در مقایسه با شاهد ماده خشک بیشتری تولید کردند. قارچ گونه GE گونه موثرتری در تولید ماده خشک گیاهی نسبت به سایر گونه‌ها بود. زادمایه‌های مجزا قارچی موثرتر از مخلوط زاد مایه‌ها بودند. تیمارهای باکتری تاثیر افزایشی بر کلنیزاسیون قارچی توسط گونه‌های GI، GM و مخلوط قارچها داشتند. نتایج نشان داد مایه‌زنی همزمان قارچ میکوریز و باکتری *Rhizobium* موجب افزایش مقدار نیتروژن، فسفر، آهن، روی، مس و منگنز در گیاه می‌شود ولی این اثرات افزایشی بین تیمارهای قارچ و باکتری متفاوت هستند.

روشهای میکروسکپی بطور معمول برای تعیین حضور اندامهای قارچی در گیاهان مورد استفاده قرار می‌گیرند ولی این روشها قادر نیستند چند گونه قارچ میکوریز را در یک قطعه ریشه و گره لگوم مشخص کرده و همچنین کمی نیز نمی-باشند. این دو فاکتور در مطالعات لگومها جایی که این اثرات مورد بررسی قرار می‌گیرند مهم می‌باشند. این تحقیق روش Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) را به عنوان یک سیستم تعیین کمی در این خصوص مورد بررسی قرار می‌دهد. استفاده از این روش qRT-PCR توانست نشان دهد که قارچهای میکوریز توانایی کلنیزه کردن گره‌های نخود را در کشت مخلوط GM + GI دارند. نسبت مولکولی و تراکم GI بیشتر از GM در ریشه و گره نخود بود. این نسبت و تراکم در گره سه برابر ریشه بود. همچنین ما دریافتیم جدایه‌های مختلف باکتری *مزوریزوبیوم سیسری* تاثیر متفاوتی بر گره‌زایی باکتری و کلنیزاسیون قارچی در ریشه دارند.

فهرست مطالب | صفحه

چکیده

مقدمه ۱

فصل ۱ : بررسی منابع

۱-۱- همزیستی *Rhizobium* ۴

۱-۲- تاثیر عناصر غذایی بر همزیستی لگوم *Rhizobium* ۶

۱-۳- مکانیسم مولکولی برقراری همزیستی *Rhizobium* ۱۱

۱-۴- میکوریز آربوسکولار ۱۲

۱-۵- تاریخچه تشکیل همزیستی میکوریز آربوسکولار ۱۴

۱-۶- اهمیت و ضرورت ایجاد همزیستی میکوریزی ۱۵

۱-۷- چرخه زندگی و مکانیسم مولکولی برقراری همزیستی میکوریزی ۱۷

۱-۸- بر همکنش *Rhizobium* و قارچ میکوریز ۲۱

۱-۹- خودتنظیمی گره زایی و برقراری همزیستی میکوریزی ۲۶

۱-۱۰- شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با روش‌های مورفولوژیک ۲۸

۱-۱۱- شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با روش‌های مولکولی ۳۱

۱-۱۲- تعیین کمی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در ریشه با استفاده از روش مولکولی ۳۴

فصل ۲ : مواد و روشها

۲ – ۱- تهیه زادمایه قارچ‌های میکوریزآربوسکولار ۳۷

۲ – ۲- تعیین پتانسیل زادمایه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (تست MPN) ۳۸

۲ – ۳- تست تشکیل گره توسط جدایه‌های *M. ciceri* ۴۲

۲ – ۴- تهیه زادمایه باکتری‌های *M. ciceri* ۴۳

۲ – ۵- تهیه بستر کاشت گیاه ۴۳

۲ – ۶- اعمال تیمارها و کاشت نخود ۴۴

۲-۷- طرح آزمایشی و تجزیه‌های آماری ۴۶

۲ – ۸- برداشت گیاه و اندازه گیری صفات مورد نظر ۴۶

۲ – ۹- تعیین غلظت عناصر در گیاه ۴۸

۲ – ۱۰- رنگ آمیزی ریشه‌ها جهت تعیین درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه ۴۸

فهرست مطالب | صفحه

۲-۱۱ - تعیین فراوانی آربوسکول، وزیکول، هیف و درصد کلنیزاسیون طول ریشه به روش تقاطع خطوط شبکه (Gridline intersect method) ۴۹
۲-۱۲- تعیین قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در ریشه به روش مولکولی ۴۹
۲- ۱۲- ۱- طراحی آغازگرهای قارچی و گیاهی ۵۰
۲- ۱۲- ۲- استخراج DNA از ریشه‌ها و گره‌های نخود ۵۱
۲- ۱۲- ۳- اندازه‌گیری کیفیت وکمیت DNA ۵۵
۲- ۱۲- ۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای ۵۵
۲- ۱۲- ۴- ۱- مرحله اول واکنش PCR ۵۶
۲- ۱۲- ۴- ۲- واکنش هضم با آنزیم برشی *AluI* ۵۷
۲- ۱۲- ۴- ۳- مرحله دوم واکنش PCR ۵۷
۲- ۱۲- ۵- واکنش همسانه سازی ۵۸
۲- ۱۲- ۶- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (Quantitative Real Time PCR) ۵۸
۲- ۱۲- ۷- تعیین نسبت مولکولی و تراکم گونه‌های قارچی ۶۰

فصل ۳ : نتایج و بحث

۳-۱- رشد گیاه ۶۱
۳-۱-۱- وزن خشک گیاهی ۶۱
۳-۱-۲- وزن خشک ریشه ۶۲
۳-۲- جذب عناصر ۶۸
۳-۲-۱- جذب نیتروژن ۶۸
۳-۲-۲- جذب فسفر ۷۰
۳-۲-۳- جذب روی ۷۱
۳-۲-۴- جذب آهن ۷۳
۳-۲-۵- جذب مس ۷۵
۳-۲-۶- جذب منگنز ۷۶
۳-۳- نتیجه‌گیری کلی رشد گیاه و جذب عناصر ۸۳
۳-۴- کلنیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز ۸۵
۳-۴- ۱- کلنیزاسیون طول ریشه ۸۶
۳-۴- ۲-کلنیزاسیون ریشه به روش تقاطع خطوط ۸۶

فهرست مطالب | صفحه

۳-۴- ۳- درصد آربوسکول ۸۷
۳-۴- ۴- درصد هیف ۸۷
۳-۴- ۵- درصد وزیکول ۸۷
۳-۴- ۶- درصد وزیکول + هیف ۸۸
۳-۴- ۷- گره‌زایی ریشه توسط باکتری *M. ciceri* ۸۹
۳-۴- ۷-۱- وزن تر گره ۸۹
۳-۴- ۷-۲-کلاس گره‌بندی ۸۹
۳- ۵- بحث کلنیزاسیون قارچی و گره‌زایی *Rhizobium* ۸۹
۳- ۶- بررسی ضرایب همبستگی پارامترهای مورد اندازه‌گیری ۹۲
۳- ۷- تعیین مولکولی قارچ‌های میکوریزآربوسکولار در ریشه ۹۵
۳-۷-۱- استخراج DNA از ریشه ۹۵
۳-۷-۲- تعیین صحت آغازگرهای مورد استفاده ۹۶
۳-۷-۳- نتایج واکنش همسانه‌سازی قطعه ITS و توالی‌یابی آن
جهت تعیین گونه*Glomus etunicatum* ۹۷
۳-۷-۴- تهیهٔ نمودارهای کالیبراسیون برای آغازگرهای گیاه و قارچ در کشت
مخلوط قارچ‌ها ۹۸
۳-۷-۵- نتایج تعیین نسبت مولکولی دو گونه قارچ میکوریز در ریشه و گره ۹۹
۳-۷-۶- نتایج تعیین تراکم نسبی قارچ‌های میکوریز در ریشه و گره ۱۰۱
۳-۷-۸- بحث ۱۰۷
۳- ۸- نتیجه‌گیری کلی ۱۱۲
۳-۹- پیشنهادها ۱۱۳

منابع ۱۱۵

فهرست جداول | صفحه

جدول ۲-۱- جدول مربوط به محتمل ترین تعداد ۴۰

جدول ۲-۲- درجه‌بندی گره‌های *Rhizobium* در ریشه لگوم‌ها ۴۲

جدول ۲-۳- ترکیب محلول غذایی کامل راریسون ۴۵

جدول ۲-۴- اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش ۵۳

جدول ۲-۵- آغازگرها مورد استفاده جهت تکثیر ناحیه DNA ریبوزومی قارچ‌های میکوریز و توالی‌های آنها ۵۶

جدول ۳-۱- تجزیه واریانس اثر سطوح قارچ و باکتری بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود ۶۴

جدول ۳-۲- مقایسه میانگین اثرات اصلی گونه‌های قارچی بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود در تیمارهای قارچ میکوریز ۶۵

جدول ۳-۳- مقایسه میانگین اثرات اصلی جدایه‌های باکتری بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود ۶۶

جدول ۳- ۴- تجزیه واریانس اثر سطوح باکتری در هر سطح قارچ بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود ۶۷

جدول۳- ۵- اثر جدایه‌های باکتری در تیمارهای بدون قارچ بر جذب عناصر در شاخساره نخود ۷۸

جدول ۳- ۶- اثر جدایه‌های باکتری در تیمارهای *G. intraradices* بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود ۷۹

جدول ۳- ۷- اثر جدایه‌های باکتری در تیمارهای *G. mosseae* بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود ۸۰

جدول۳- ۸- اثر جدایه‌های باکتری در تیمارهای *G. etunicatum* بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود ۸۱

جدول ۳- ۹- اثر جدایه‌های باکتری در تیمارهای مخلوط سه گونه قارچی بر پارامترهای مورد اندازه‌گیری در نخود ۸۲

جدول ۳- ۱۰- ضرایب همبستگی (r) بین پارامترهای مورد اندازه‌گیری در آزمایش ۹۴

جدول ۳- ۱ ۱- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های باکتری *M. ciceri* بر نسبت مولکولی و تراکم دو گونه قارچ *G. intraradices* و *G. mosseae* در ریشه و گره نخود ۱۰۶

فهرست اشکال | صفحه

شکل ۲-۱- کشت تکثیر و تهیه زادمایه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار ۳۸
شکل ۲-۲- گلدان‌های مربوط به تست MPN ۴۱
شکل ۲-۳- کشت گلخانه‌ای برای تست گره‌بندی نخود توسط جدایه‌های *M. ciceri* ۴۳
شکل ۲-۴ - کشت اصلی گیاه نخود با تیمارهای قارچ و باکتری ۴۷
شکل ۲-۵ - منطقه DNA ریبوزومی و محل اتصال آغازگرها به ژنهای آن ۵۰
شکل ۳- ۱- باندهای DNA استخراج شده از ریشه و گره گیاه نخود در تیمارهای مختلف بر روی ژل آگاروز ۱٪ ۹۵
شکل ۳-۲- باندهای مربوط به محصول PCR با استفاده از آغازگرهای تهیه شده برای قارچ میکوریز و گیاه نخود ۹۷
شکل۳ -۳- نتایج تعیین توالی و تعیین شباهت با استفاده از پایگاه اطلاعات NCBI ۹۸
شکل ۳-۴ - منحنی‌های کالیبراسیون برای آغازگرهای گیاه و قارچ در کشت مخلوط قارچ‌ها ۹۹
شکل۳- ۵- میانگین نسبت مولکولی *G. intraradices* و *G. mosseae* در ریشه‌ها ۱۰۰
شکل۳- ۶- اثر جدایه‌های باکتری بر نسبت مولکولی دو گونه قارچ میکوریز در ریشه (a) و گره (b) نخود ۱۰۱
شکل ۳-۷- تراکم مولکولی *G. intraradices* و *G. mosseae* در ریشه‌ها ۱۰۳
شکل ۳-۸- تراکم نسبی بافت قارچی در ریشه نخود در کشت مخلوط قارچ‌ها و باکتری ۱۰۴
شکل ۳-۹- تراکم نسبی بافت قارچی در گره نخود در کشت مخلوط قارچ‌ها و باکتری ۱۰۵

مقدمه

در بسیاری از کشورهای دنیا خاک‌ها تحت کشاورزی فشرده بوده و با کاهش قابل ملاحظه مقدار مواد آلی در خاک‌ها روند مصرف کودهای شیمیایی افزایش یافته است. مصرف جهانی کودهای نیتروژنه در سال ۲۰۰۵ میلادی حدود ۹۰/۷ میلیون تن بوده و کاربرد جهانی این ترکیبات معدنی در سال ۲۰۱۰، در حدود ۹۵/۵ میلیون تن برآورد شده است. در مورد کودهای فسفره (P_2O_5) و پتاسه (K_2O) کاربرد جهانی آنها در سال ۲۰۰۵ به ترتیب ۲۷/۵ و ۲۶/۹ میلیون تن بوده است و نیاز به آنها در سال ۲۰۱۰ به ترتیب ۳۰/۴ و ۲۹/۴ تخمین زده شده است (وانگ وهمکاران، ۲۰۱۰). اگرچه کاربرد کودهای شیمیایی در ابتدا تأثیر بسزایی در افزایش عملکرد داشت، لیکن استفادهٔ بیش از حد این نهاده‌ها منجر به کاهش حاصلخیزی خاک شده و تخریب محیط زیست را در پی داشته است. علاوه بر این، کارآیی مصرف کودهای شیمیایی هم اکنون از لحاظ تئوری به بالاترین سطح خود رسیده است، بدین معنی که استفاده بیش از این از کودهای شیمیایی به سختی می‌تواند عملکرد را افزایش دهد (احمد، ۱۹۹۵). از بین عناصر معدنی کمبود دو عنصر نیتروژن و فسفر بیشترین محدودیت را برای رشد و عملکرد گیاهان ایجاد می‌نمایند.

یکی از راه‌های مهم در کاهش کاربرد کودهای شیمیایی توجه به همزیستی‌های گیاهان با میکروارگانیسم‌های سودمند خاکزی و بکارگیری کودهای بیولوژیک می‌باشد. این نهاده‌های بیولوژیک در واقع دارای میکروارگانیسم‌هایی هستند که از راه فرآیندهای ویژه‌ای می‌توانند حلالیت ترکیبات فسفره رسوب کرده در خاک را افزایش داده و بخشی از فسفر مورد نیاز گیاه را تأمین نمایند. از سوی دیگر این میکروارگانیسم‌ها با داشتن توانایی‌های منحصر به فردی از جمله افزایش توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی، افزایش قابلیت دسترسی سایر عناصر مثل آهن، روی و منگنز و همچنین ترشح هورمون‌های تحریک کننده رشد، افزون بر تأمین فسفر مورد نیاز گیاه، رشد و عملکرد آن را هرچه بیشتر افزایش می‌دهند. از جمله مهمترین میکروارگانیسم‌های تأمین کنندهٔ فسفر مورد نیاز گیاه قارچ‌های میکوریزی می‌باشند. این جانداران میکروسکوپی به وجود آورندهٔ گسترده‌ترین نوع رابطهٔ همزیستی در طبیعت می‌باشند و به چندین گروه تقسیم می‌شوند (علی‌اصغر زاده، ۱۳۸۹).

همزیستی یک پدیده بیولوژیک در ارتباط با تغییرات دینامیک در ژنوم، متابولیسم و شبکه سیگنالی بوده و وقتی که میکروارگانیسم همزیست را مطالعه می‌کنیم، درک جامع چند جهتی از این اثرات متقابل

لازم می‌باشد. در اثرات متقابل میکروب – گیاه، دو سیستم همزیستی برای سالیان متوالی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. یکی از این‌ها، همزیستی میکوریزی آربوسکولار (AM[1]) و دیگری همزیستی گره‌های ریشه‌ای (RN[2]) می‌باشد. همزیستی AM احتمالاً گسترده‌ترین اثر متقابل بین گیاهان و میکروبها در زمینه فیلوژنی و اکولوژی می‌باشد. به نظر می‌رسد بیشتر از ۸۰ درصد از همه گیاهان کره زمین دارای همزیستی با قارچ‌های میکوریز باشند که متعلق به گلومرومایکوتاها[3] می‌باشند. منشاء همزیستی AM به دورهٔ دوونین تقریباً ۴۰۰ میلیون سال قبل بر می‌گردد. بنابراین همزیستی AM به عنوان مادر همزیستی درونی ریشه گیاه خوانده می‌شود (پارینسیک، ۲۰۰۸). از سوی دیگر همزیستی RN در ارتباط با تغییرات مورفولوژی در ریشه بوده و به وسیلهٔ ارتباط بین گیاهان و باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن شکل می‌گیرد (کاواگوجی و مینامیساوا، ۲۰۱۰).

بیشتر گیاهان لگوم از همزیستی سه جانبه[4] با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF[5]) و باکتریهای *Rhizobium* بهره‌مند می‌شوند. حضور یکی از این همزیست‌ها می‌تواند برفعالیت دیگری تأثیرگذار باشد واثرات متقابل هر دو همزیست میکروبی و قارچی بر گیاه میزبان قابل مشاهده می باشد (لیست و همکاران، ۲۰۰۳؛ آنتونز و همکاران، ۲۰۰۶). در همزیستی‌های سه‌جانبه گیاه، باکتری و قارچ میزان برقراری هر یک از همزیستی‌ها و توسعه میکروبیونت‌ها[6] در ریشه گیاه می‌تواند تحت تأثیر متقابل باکتری و قارچ باشد (آنتونز و همکاران، ۲۰۰۶؛ زای و همکاران، ۱۹۹۵). عوامل مختلفی شامل وضعیت حاصلخیزی خاک، غلظت عناصر (بخصوص فسفر)، نوع خاک، نوع پوشش گیاهی، نوع اقلیم، عملیات کشت و کار و... می‌توانند بر میزان استقرار قارچ‌های میکوریزی و همچنین تنوع گونه‌ای کلنیزه کننده ریشه گیاه تاثیر گذار باشند (ترک و همکاران، ۲۰۰۶). قارچ‌های میکوریز نقش مهمی در جذب عناصر کم تحرک، بویژه فسفر داشته، و همچنین نشان داده شده که مقادیر قابل توجهی از نیتروژن را به گیاهان منتقل می‌کنند (جاوت و همکاران، ۲۰۰۷). *Rhizobium* باکتریهای همزیست تثبیت کننده نیتروژن بوده و اختصاصی عمل کرده و هرگونه باکتری با گیاه لگوم خاصی همزیستی برقرار می‌کند. باکتری

[1] - Arbuscular Mycorrhizal
[2] - Root Nodule
[3] - Glomeromycota
[4] - Tripartite Symbiosis
[5] - Arbuscular Mycorrhizal Fungi
[6] - Microbiont

Mesorhizobium ciceri از این دسته از باکتریها بوده وبا گیاه نخود همزیستی برقرار می‌کند. تحقیقات نشان داده جدایه‌های مختلف این باکتری توانایی مختلفی در برقراری همزیستی و تثبیت نیتروژن دارند (اصغر زاده، ۱۳۷۵). لذا با انتخاب جدایه‌های مناسب از لحاظ توان بالای تثبیت نیتروژن، می‌توان زادمایه‌های باکتریایی تهیه کرده و به عنوان کود بیولوژیک برای کاشت نخود در مزارعی که نیاز به مایه-زنی داشته باشند، استفاده نمود.

مطالعات مولکولی و ژنتیکی نشان داده، فرآیند برقراری همزیستی *Rhizobium* و قارچ AM در ریشه گیاهان لگوم به طور چشمگیری بخصوص در جنبه‌های عمومی از تبادل سیگنالی اولیه مشابه می‌باشد (اولدروید و همکاران، ۲۰۰۵). لذا این امکان وجود دارد جدایه‌های مختلف باکتری بر الگوی استقرار گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز در ریشه تأثیرگذار باشند و بتوان جدایه‌هایی یافت، که ضمن توان بالای تثبیت نیتروژن، میزان بهره‌گیری گیاه از همزیستی میکوریزی را افزایش دهند. تعیین کمی گونه‌های قارچی در ریشه گیاهان در کشت مخلوط این قارچ‌ها فقط از طریق روشهای مولکولی قابل انجام می‌باشد. جهت شناسایی این قارچ‌ها به روش مولکولی از تکثیر اختصاصی توالیهای بین مناطق نسخه‌برداری شونده (ITS[7]) و قطعات ژنی ۱۸ S و ۲۸ S Ribosome RNA استفاده می‌گردد (رِدِکر، ۲۰۰۰). در این تحقیق پس از طراحی آغازگر براساس نواحی ذکر شده برای سه گونه قارچ میکوریز، میزان استقرار آنها در ریشه گیاه با استفاده از روش qRT-PCR[8] تعیین شدند. در این تحقیق اهداف زیر دنبال می‌گردد:

۱- بررسی تاثیر متقابل همزیستی *Rhizobium* و قارچ میکوریز بر رشد گیاه و جذب عناصر نیتروژن، فسفر، آهن، روی، مس و منگنز توسط گیاه نخود

۲- بررسی تاثیر کاربرد جدایه‌های مختلف باکتری *M. ciceri* بر فراوانی و الگوی استقرار گونه-های مختلف قارچ میکوریز در ریشه و گره نخود

۳- بررسی امکان تعیین کمی گونه‌های قارچی در ریشه و گره ریشه نخود در تیمار مخلوط قارچ‌ها به روش qRT- PCR

[7] - Internal Transcribed Spacer

[8] - Quantitative Real Time PCR

فصل اول

بررسی منابع

۱-۱- همزیستی *Rhizobium*

به دلیل تثبیت نیتروژن مولکولی توسط لگوم‌ها در سیستم‌های زراعی، مطالعات زیادی بر روی این گیاهان در جهان متمرکز شده است، که اکثر آنها به همزیستی *Rhizobium* با ریشهٔ این گیاهان توجه خاصی داشته‌اند. نیتروژن تثبیت شده توسط این نوع همزیستی، حدود ۷۰ تا ۸۵ میلیون تن در سال برآورد شده است (زهران، ۱۹۹۹؛ دیکسون و ولِر، ۱۹۸۶). در حالت همزیستی مقدار تثبیت نیتروژن بر حسب گونه و واریته گیاه، جدایه باکتری و شرایط خاک و اقلیم متغیر بوده و به‌طور متوسط برای لگوم‌های دانه‌ای حدود ۱۰۰ و برای انواع علوفه‌ای حدود ۲۵۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در هر سال برآورد شده است (سوماسگاران و هوبن، ۱۹۹۴). علاوه بر اثرات اقتصادی، تثبیت نیتروژن به طریق همزیستی می‌تواند اثرات سوء زیست‌محیطی کاربرد کودهای شیمیایی نیتروژنه را به حداقل برساند (پریوست و برومفیلد، ۲۰۰۳).

نخود به عنوان سومین لگوم دانه‌ای جهان با مقدار پروتئین بالا و از طرف دیگر توانایی رشد در خاکهای فقیر، خشک و نیمه خشک، بخصوص در غرب آسیا و شمال آفریقا از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. عوامل مهمی در پاسخ به مایه‌زنی نخود با باکتری نقش دارند. نوع خاک، تعداد جمعیت باکتری *Mesorhizobium* بومی در خاک، مقدار نیتروژن معدنی قابل دسترس در خاک، نیاز نیتروژنی نخود، رقم و پتانسیل ژنتیکی آن در پاسخ گیاه به مایه‌زنی تاثیر بسیار زیادی دارند (به نقل از اصغرزاده و همکاران، ۱۳۸۰).

مهم‌ترین شرط ایجاد همزیستی مؤثر، وجود جدایه باکتری کاملاً کارآمد و اختصاصی برای گیاه میزبان است و بایستی از مراحل ابتدایی رویش به تعداد کافی در اختیار آن قرار گیرد. در اکثر موارد چنین شرطی به‌طور طبیعی موجود نیست، زیرا از یک‌سو در خاک‌هایی که گونه‌هایی از لگوم جدیداً و یا پس از مدت طولانی در آنها کشت می‌شوند، باکتری اختصاصی به تعداد کافی وجود ندارد و از سوی دیگر خاک‌هایی که چندین سال زیر کشت گیاهان لگوم بوده‌اند و دارای تعداد وافر *Rhizobium* می‌باشند، این باکتری‌ها از نظر قدرت تثبیت نیتروژن ضعیف بوده و به‌طور معمول جدایه کاملاً مؤثر کمتر از ۲۵ درصد کل باکتریهای *Rhizobium* بومی خاک را تشکیل می‌دهند. به همین دلیل دخالت انسان از طریق انتخاب فعال‌ترین و مؤثرترین جدایه‌های باکتری و قرار دادن آنها به تعداد کافی در اختیار گیاه

ضرورت پیدا می‌کند. همین‌طور برای کشت لگوم‌ها در خاک‌هایی که *Rhizobium* به دلیل تنش‌های محیطی نمی‌تواند در آنها به رشد و فعالیت خود ادامه دهد، مانند خاک‌های اسیدی و یا کاملاً فقیر از لحاظ کلسیم، خاک‌های غرقاب و یا اراضی شنی و نیمه خشک مناطق گرم، انجام مایه‌زنی کاملاً ضرورت می‌یابد. امروزه در برنامه‌ریزی برای سیستم‌های کشاورزی پایدار استفاده از همزیستی لگوم-*Rhizobium* ضرورتی اساسی تلقی می‌شود. برنامه‌های دقیق تناوب زراعی با منظور کردن لگوم‌های مناسب در تناوب کشت، پس از سال‌ها دوباره جایگزین سیستم‌های تک کشتی متکی به مصرف کودهای شیمیایی می‌شوند (سوماسگاران و هوبن، ۱۹۹۴).

تحقیقات وانی و همکاران (۱۹۹۵) نشان می‌دهد، نخود در همزیستی با باکتری *Rhizobium* می‌تواند ۹۷-۲۳ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در هر فصل رشد تثبیت نماید و مقدار تثبیت به شدت به رقم نخود و جدایه *M. ciceri* بستگی دارد. به دلیل وجود ۲۳-۲۰ درصد پروتئین در بذر نخود (بنائی، ۱۳۷۳)، این گیاه برای تولید محصول مناسب مقدار زیادی نیتروژن از خاک جذب می‌نماید، ولی با این وجود اگر بقایای شاخساره و برگ آن در خاک باقی گذاشته شود می‌تواند ۷۰-۴۰ کیلوگرم نیتروژن مولکولی در هکتار برای محصول غیر لگوم بعد از خود در تناوب را افزایش دهد و با توجه به اینکه مقدار تثبیت نیتروژن توسط لگوم‌ها به پتانسیل *Rhizobium* همزیست با آنها وابسته می‌باشد، تلاشهای بسیاری در زمینهٔ انتخاب طبیعی و یا جهش دادن *Rhizobium* همزیست انجام می‌گیرد که نتیجهٔ این تلاش‌ها افزایش کارایی سیستم است.

اولین تحقیق در ایران، در زمینهٔ همزیستی نخود – *M. ciceri* بومی توسط اصغرزاده (۱۳۷۵) با استفاده از هفت جدایه بومی و چهار جدایه خارجی انجام گرفت و نشان داده شد که در بین هفت جدایه بومی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی از بین جدایه های خارجی دوجدایه Cp–36 و CC–1192 به مقدار جزیی بر جدایه‌های داخلی برتری دارند، ولی این اختلاف در حد معنی‌دار نبود. تحقیقات بعدی اصغرزاده و همکاران (۱۳۸۶) نشان داد جدایه‌های مختلف باکتری *M. ciceri* جداسازی و خالص سازی شده از مناطق مختلف کشور، توانایی های مختلفی در تثبیت نیتروژن داشته و مایه‌زنی نخود با جدایه های برتر، موجب افزایش عملکرد گیاه در مناطق مختلف کشور گردیده است.

تایز و همکاران (۱۹۹۱) نشان دادند که اگر تعداد سلولهای *Rhizobium* در خاک کمتر از ۱۰ سلول در هر گرم خاک باشد، استفاده از مایه‌زنی باکتریایی حدود ۱۰۰ درصد افزایش محصول درپی

خواهد داشت، در صورتی که تعداد سلول *Rhizobium* بومی خاک بیش از ۱۰ سلول در هر گرم خاک باشد، واکنش به مایه‌زنی کاهش می یابد. در این راستا تحقیقی که روپلا (۱۹۸۷) در هند داشته، نشان داده است در ۳۹٪ از خاکهای هند تعداد سلولهای *Mesorhizobium* آلوده کننده نخود کمتر از ۱۰۰ سلول در هر گرم خاک می‌باشد و در چنین خاکهایی استفاده از مایه‌زنی باکتریایی مناسب می‌تواند سبب افزایش محصول گردد. نمدئو و گوپتا (۱۹۹۲) هم نشان داده‌اند، مایه‌زنی نخود با *Rhizobium* مناسب در هند ۲۶ درصد افزایش محصول بهمراه داشته است. نیتروژن و فسفر به طور مساوی عناصر غذایی خیلی مهمی برای رشد گیاه هستند (مارشنر، ۱۹۹۵)، به هر حال فراهمی فسفر و نیتروژن عموماً در خاکهای قابل کشاورزی محدود بوده، بنابراین آنها را به عنوان عوامل محدود کننده مهم برای رشد گیاه و عملکرد محصول به خصوص در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری تبدیل کرده است. در طول ۵ سال گذشته، استفاده گسترده از کودهای شیمیایی جهت فراهمی نیتروژن و فسفر آن را به عنوان یک فاکتور مهم در تولید غذا و یک نهاده مهم در تولید محصول در سرتاسر دنیا تبدیل کرده است. در حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد کود نیتروژنه اضافه شده و ۱۰ تا ۴۵ درصد کود فسفره اضافه شده به وسیلهٔ گیاه قابل برداشت می‌باشد. به علاوه استفاده از کودهای شیمیایی در کشاورزی عامل پیامدهای محیطی زیانبار زیادی گردیده و به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است (گرنت و همکاران، ۲۰۰۹).

۱-۲- تاثیر عناصر غذایی بر همزیستی لگوم- *Rhizobium*

علاوه بر عناصر لازم برای تغذیه گیاه و باکتری، تعدادی از عناصر معدنی از نظر تشکیل گره و تثبیت نیتروژن اهمیت ویژه‌ای را دارا هستند.

نیتروژن: کودهای نیتروژنه را فقط می‌توان در موارد خاصی برای بالا بردن بازده لگوم‌ها مورد استفاده قرار داد. در مراحل ابتدایی رویش گیاه، یعنی قبل از شروع تثبیت به طریق همزیستی، درصورتی‌که گیاه شدیداً نیازمند به نیتروژن باشد و خاک فاقد آن باشد، افزودن مقدار کمی نیتروژن (حدود ۲۰ تا ۳۰ کیلوگرم در هکتار) مفید واقع خواهد شد. مورد دوم زمانی است که مشخصات محیطی خاک برای همزیستی مؤثر نباشد، مثلاً خاک اسیدی باشد و باکتریهای *Rhizobium* نتوانند به‌خوبی فعالیت کنند. در مورد یونجه مشاهده شده است که افزودن آمونیاک یا نیترات به مقدار کم (۰/۱ میلی‌مول)، تولید تارهای کشنده و خمیده شدن آنها را به نحو قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد. اثر نیترات

نسبتاً شدیدتر است و اگر سه روز قبل از افزودن باکتری در اختیار گیاه قرار گیرد، خمیدگی تارها تا حدود ۹۰ درصد کاهش می‌یابد، ولی درصورتی‌که هم‌زمان با باکتری به محیط رشد گیاه افزوده شود، این کاهش به حدود ۳۰ درصد می‌رسد (اسمیت، ۱۹۸۲).

کلسیم: تأثیر کلسیم در تشکیل گره‌ها بر حسب گونه گیاه و اسیدیته خاک تغییر می‌کند. برای لگوم‌های مناطق معتدل، معمولاً وجود مقدار زیادی کلسیم به‌ویژه در مرحله شروع آلودگی برای تشکیل گره‌ها ضرورت دارد و این مقدار بیش از حد مورد نیاز برای تأمین رشد باکتری و گیاه است. کلیسم در جلوگیری از اثر نامطلوب یون هیدروژن در pH اسیدی، روی بافت سطحی ریشه مؤثر شناخته شده است (اسمیت، ۱۹۸۲).

فسفر: کمبود فسفر یکی از مهمترین عوامل محدود کننده تعداد گره‌ها و شدت تثبیت نیتروژن مولکولی محسوب می‌شود. اصولاً نیاز لگوم‌ها به فسفر نسبتاً زیاد است و این عنصر علاوه بر تأثیر بر روی رشد عمومی گیاه میزبان، به‌علت نقش سازنده‌ای که در ساختمان ATP دارد، از نظر مؤثر بودن همزیستی اهمیت فوق‌العاده‌ای پیدا می‌کند. معمولاً افزودن کودهای فسفردار به خاک‌های فقیر از نظر این عنصر، تشکیل گره‌ها و تثبیت نیتروژن را به‌نحو قابل‌توجهی افزایش می‌دهد (سوماسگاران و هوبن، ۱۹۹۴). معمولاً گره‌ها نسبت به ریشه‌ها غلظت فسفر بیشتری را در خود تجمع می‌دهند (بوردله آ و پریوست، ۱۹۹۴ ؛ بارآ و همکاران، ۱۹۹۲) و این نشان می‌دهد که باکتروئید و گره نیاز شدیدتری به فسفر دارند و همزیستی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از این نظر می‌تواند به تثبیت نیتروژن و رشد گیاه میزبان کمک کند (بارآ و همکاران، ۱۹۹۲).

آهن: هنگامی که گیاه، نیتروژن مورد نیاز خود را از طریق همزیستی تأمین می‌کند، به مقدار بیشتری آهن نیاز دارد، زیرا این عنصر در ساختمان آنزیم نیتروژناز[9] به‌عنوان گروه پروستتیک و همین‌طور برای تولید لگ‌هموگلوبین[10] ضرورت پیدا می‌کند (اسمیت، ۱۹۸۲).

مولیبدن: مولیبدن نیز در ساختمان شیمیایی نیتروژناز مورد استفاده قرار می‌گیرد. درصورت کمبود ذاتی این عنصر در خاک، و یا در خاک‌های کاملاً اسیدی که این عنصر به‌حالت غیر محلول درمی‌آید، گره‌های ریشه‌ای علیرغم تعداد فراوان، بسیار کوچک و دارای بخش زردرنگ یعنی به‌حالت

[9] - Nitrogenase
[10] - Leghemoglobin