شناسایی سیانوباکتری‌ها و جذب فسفات در برنج

صاحب سودایی مشایی[۱]*، ناصر علی‌اصغرزاد[۲]، قربانعلی نعمت‌زاده[۳] و ندا سلطانی[۴]

۱- دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- استاد گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، ساری.

۴- استاد پژوهشکده علوم پایه کاربردی جهاد دانشگاهی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

*Email: ssoodaie78@gmail.com

چکیده

یکی از روش‌های تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان بهره‌گیری از توان زیستی خاک و استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد. پس از نمونه‌برداری از اراضی شالیزاری گیلان، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مورفولوژیک و مولکولی (ژن 16S rDNA) سیانوباکتری‌ها، میزان توانایی حل کنندگی فسفات جدایه‌ها ارزیابی شده و سپس جدایه‌های برتر برای کشت گلدانی گیاه برنج (رقم طارم هاشمی) انتخاب شدند. نتایج شناسایی، سویه‌های جداسازی شده را در چهار راسته Chroococcales، Oscillatoriales، Nostocales و Stigonematales طبقه‌بندی نمود. این بررسی نشان داد که در میان جدایه‌های سیانوباکتری، سویه *Anabaena* sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه سویه‌ها از لحاظ اندازه حل‌کنندگی فسفات (۶۴۱ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد و بعد از آن سویه *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 (۱۳۰/۴ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) قرار گرفت. بیشترین عملکرد دانه (۱۵/۶۱ گرم در گلدان)، بیشترین میزان جذب نیتروژن (۱۴/۳ گرم بر کیلوگرم در گلدان) و فسفر (۲/۰۸ گرم بر کیلوگرم در گلدان) در تیمار تلقیح شده با سویه *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 حاصل گردید. از این سویه می‌توان در بهبود رشد و عملکرد برنج به عنوان کود زیستی سیانوباکتریایی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: جذب فسفر، ژن 16S rDNA، سیانوباکتری‌های حل‌کننده فسفات و عملکرد دانه

مقدمه

سیانوباکتری‌ها یک گروه بسیار متنوع از پروکاریوت‌ها هستند که باکتری‌های اکسیژنیک و فتوتروفیک را شامل می‌شوند (Madingan et al., 2012). نقش سیانوباکتری‌ها در حفظ اقتصاد نیتروژن خاک از طریق تثبیت نیتروژن (Singh, 1961) و افزایش فعالیت فسفاتازی که فسفر نامحلول را به فرم محلول متحرک کرده (Mishra et al., 2005)، بخوبی اثبات شده است. ری و همکاران (۲۰۱۳) به اهمیت مصرف زیست‌توده سیانوباکتری در کشاورزی به‌عنوان کود زیستی حاوی پلی‌فسفات آلی (وولوتین) برای اجتناب از سمیت شیمیایی فسفر خاک نیز اشاره دارند (Ray et al., 2013). اگر چه شناسایی در رده‌بندی سیانوباکتریی هنوز با تکیه بر خصوصیات ساده مورفولوژیک امکانپذیر است باید در نظر داشت که در دهه اخیر اطلاعات جدیدی حاصل از مطالعات فراساختاری و به خصوص بیولوژی مولکولی نقش بسیار مهمی در تحول رده‌بندی این گروه از باکتری‌ها ایفا نموده است (Komarek et al., 2014). به همین منظور بخشی از روند شناسایی در این تحقیق بر پایه شناسایی مولکولی قرار داده شد.

با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیط و اقلیمی زیستگاه اصلی آنها، تولید کود زیستی از باکتری‌های غیربومی

که از مناطقی با ویژگی‌های اقلیمی متفاوت نسبت به شرایط داخلی کشور به دست آمده‌اند کارایی مطلوبی نخواهد داشت (Yu et al., 2011). ضرورت یافتن جایگزین مناسب برای انحلال و رهاسازی فسفات‌های تجمع یافته در خاک زمانی بیش‌تر احساس می‌شود که بدانیم منابع فسفاته موجود در خاک قابلیت تأمین فسفات مورد نیاز گیاهان برای تولید بهینه آنها را تا ۱۰۰ سال دارا می‌باشد (Goldstein et al., 1993; Khan et al., 2007) و کافی است که این منبع عظیم فسفر را به صورتی برای گیاه قابل جذب و استفاده نمود. بنابراین، پس از جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی سویه‌های سیانوباکتری از اراضی شالیزاری استان گیلان، آزمون حل‌کنندگی فسفات انجام شد و برخی سویه‌ها برای آزمایش گلدانی انتخاب شده و عملکرد، اجزای عملکرد و میزان جذب فسفر گیاه برنج اندازه‌گیری شده است.

مواد و روش‌ها

کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت سیانوباکتریی‌های خاکزی انجام گرفت (Kaushik, 1987). شناسایی جدایه‌ها به روش مورفولوژیک، با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی سیانوباکتری‌ها (Desikhachary, 1959؛ John et al., 2003) و به روش مولکولی، با استفاده از استخراج DNA به روش Saghai-Maroof et al. (1984) و استفاده از کیت استخراج DNA ژنومی، محصول شرکت فرمنتاز به نام Genomic DNA Purification Kit (K0512) و دو گروه پرایمر اختصاصی 106F (5′ CGG ACG GGT GAG TAA CGC GTGA 3′) و 781Rb (5′ GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTTT 3′) تعیین گردید (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۷؛ Lyra et al., 1997). پس از تعیین توالی ژنی ناحیه مورد نظر، توالی ژنی حاصل با انجام عملیات BLASTn با توالی ژن‌های ثبت شده در بانک‌های جهانی ژن مقایسه گردید. درصد تشابه ژنی نمونه مورد نظر با نمونه‌های موجود در بانک ژن تعیین و صحت شناسایی نمونه‌های مورد نظر در سطح جنس تأئید شدند. بررسی میزان حل‌کنندگی فسفات هر جدایه، در محیط کشت مایع حاوی تری‌کلسیم فسفات (۰/۳ درصد) تعیین گردید (Aliasgharzad etal., 2009).

آزمایش گلدانی برای ارزیابی پیامد کاربرد سویه‌های *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25، *Anabaena* sp. GGuCy-42، *Calothrix* sp. GGuCy-43، *Anabaena* sp. GGuCy-23، *Anabaena* sp. GGuCy-17، *Chroococcus* sp. GGuCy-34 و *Hapalosiphon* sp. GGuCy-32 انجام گردید. برای این کار تیمار نیتروژن صفر، ۰/۲۳، ۰/۳۵و ۰/۴۶ گرم اوره در گلدان (معادل صفر، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ کیلوگرم اوره در هکتار) با دو تقسیط و تیمار مایه‌زنی سیانوباکتریی با ۷ سویه و تیمار شاهد بدون مایه‌زنی با سه تکرار آزمایش شد. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی در پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان انجام شد. محاسبات آماری به کمک نرم افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

نتایج

با انجام کشت‌های اولیه نمونه در محیط کشت BG11 و $BG11_0$ و بررسی‌های مورفولوژیک ۳۰ جدایه بصورت خالص جداسازی شدند که مربوط به راسته Chroococcales، Oscillatoriales، Nostocales و Stigonematales بودند. بررسی مولکولی ناحیه ژنی 16S rDNA تعدادی ار نمونه‌های خالص شده و مقایسه توالی‌های ژنی با توالی‌های ژنی ثبت شده در بانک جهانی ژن NCBI به‌واسطه انجام عملیات BLASTn، نشاندهنده وجود بالاترین سطح تشابه میان نمونه‌های مورد مطالعه با نمونه‌های ثبت شده با جنس مشابه در بانک ژن NCBI بود (جدول ۱). قابل ذکر است که عدم تطابق برخی شواهد مورفولوژیک نمونه‌های بررسی شده با نتایج حاصل از مطالعه فیلوژنتیک انجام گرفته در این تحقیق امری غیرمعمول نبوده و باید در نظر داشت که در سایر

مطالعات فیلوژنتیک صورت گرفته در سیانوباکتری‌ها نیز گاه روابط ژنتیکی موجود با نتایج حاصل از رده‌بندی مبتنی بر مورفولوژیک و خصوصیات فنوتیپی در تضاد بوده‌اند (Iteman et al., 2002 ؛Gugger and Hoffmann, 2004).

جدول ۱: نتایج حاصل از شناسایی مولکولی نمونه‌ها با استفاده از توالی ژن 16S rDNA

ردیف	کد جدایه سیانوباکتری	سویه احتمالی	نزدیکترین همسایه تعیین شده براساس BLAST		شماره ژنی NCBI
			درصد تشابه	جنس موردنظر	
۱	GGuCy-23	*Anabaena* sp.	۹۲	*Anabaena* sp.	NZ CP011456.1
۲	GGuCy-25	*Cylindrospermum* sp.	۹۷	*Cylindrospermum stagnale*	NC 019757.1
۳	GGuCy-32	*Hapalosiphon* sp.	؟؟-	؟Uncultured	؟؟-
۴	GGuCy-34	*Chroococcus* sp.	۹۵	*Cyanobium gracile*	NC 019675.1
۵	GGuCy-35	*Chroococcus* sp.	۹۹	*Cyanobacterium aponinum*	NC 019776.1
۶	GGuCy-47	*Nostoc* sp.	۹۷	*Nostoc punctiforme*	NC 010628.1

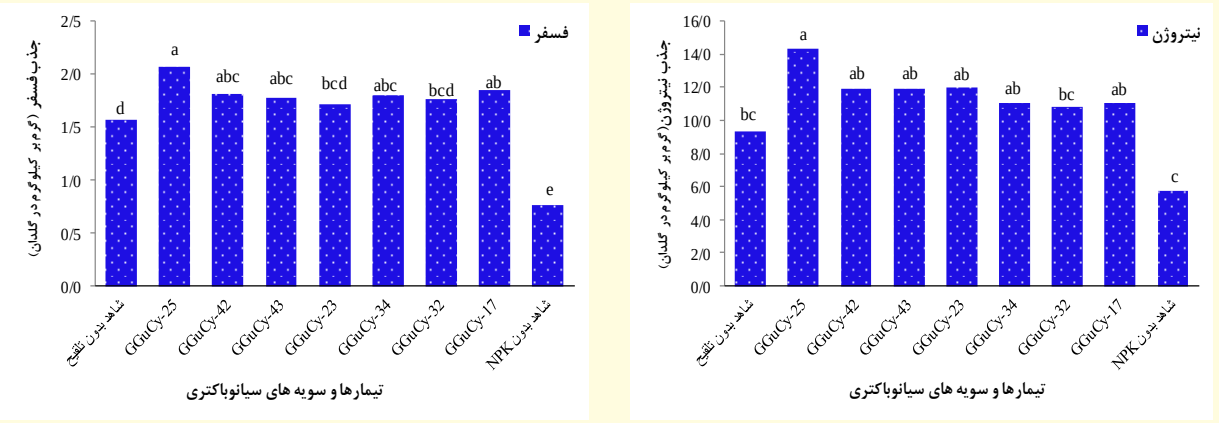
مقایسه میانگین فسفر معدنی محلول شفاف‌رویی و فسفر کل محلول شفاف‌رویی در روزهای ۱۵ و ۳۰ بعد از تلقیح در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۲). غلظت فسفر محلول در روز ۱۵ بعد از تلقیح بین ۵۳/۱ تا ۶۴۱ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر متغیر بود. سویه *Anabaena* sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه سویه‌ها از لحاظ اندازه حل کنندگی فسفات (۶۴۱ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) برتری قابل ملاحظه‌ای را نشان داد، و بعد از آن بیشترین غلظت فسفر محلول (۱۳۰/۴ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) را سویه *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 نشان داد (جدول ۲). در اغلب سویه‌ها میزان فسفر معدنی محلول شفاف رویی محیط کشت با گذشت زمان در روز ۳۰ ام کاهش یافت که می‌تواند به دلیل تغییر مرحله رشدی سویه-ها و تبدیل شدن به شکل آلی فسفر باشد چون سیانوباکتری‌ها به‌عنوان یک مخزن کارآمد برای فسفر در نظر گرفته می‌شوند (Mandal, 1992). با توجه به اندازه‌گیری pH محیط کشت (جدول ۲)، عموماً سویه‌هایی که توانایی حل‌کنندگی فسفر بیشتری داشتند pH محیط کشت آنها کمتر بوده است چرا که اسیدی کردن محیط با تولید اسیدهای آلی، یکی از فرآیندهای میکروبی حل شدن فسفات معدنی می‌باشد (Yandigeri et al, 2011 ؛Mandal, 1992). تولید اسید فتالیک به‌عنوان یک شیوه ممکن برای حل-کنندگی فسفر توسط سیانوباکتری‌ها توسط یاندیجری و همکاران (۲۰۱۱) پیشنهاد شده است.

مقایسه میانگین میان تیمارها برای صفت عملکرد دانه، جدایه *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 بیشترین عملکرد (۱۵/۶۱ گرم در گلدان) را داشته که از لحاظ آماری با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشته است (۲۳/۶ درصد افزایش در برابر شاهد)، بعد از آن، جدایه‌های *Anabaena* sp. GGuCy-42، *Calothrix* sp. GGuCy-43 و *Chroococcus* sp. GGuCy-34 به ترتیب بیشترین عملکرد دانه را نشان دادند. میزان جذب عناصر غذایی نیتروژن و فسفر در اندام هوایی گیاه برنج در پایان دوره رشد در شکل ۱ نشان داده شد. حداکثر جذب نیتروژن (۱۴/۳ گرم بر کیلوگرم در گلدان) توسط سویه *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 مشاهده شد که با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت. از نظر جذب فسفر گیاه برنج تلقیح شده با سویه *Cylindrospermum* sp. GGuCy-25 و *Anabaena* sp. GGuCy-17 بهترین وضعیت را داشتند. این نتایج با یافته‌های محققان مطابقت دارد (Roger and Ladha, 1992؛ Prasanna et al., 2013؛ Mishra et al., 2012).

جدول ۲: اندازه حل کنندگی فسفات سویه‌های سیانوباکتریی جداسازی شده از خاک شالیزاری گیلان

سویه‌های سیانوباکتریی	فسفر معدنی (۱۵ روز) (µgP/ml)	فسفر معدنی (۳۰ روز) (µgP/ml)	فسفر کل (۱۵ روز) (µgP/ml)	فسفر کل (۳۰ روز) (µgP/ml)	pH محیط کشت
Chrococcous sp. GGuCy-34	۵۳/۱$^{h-l}$	۴۶/۱^{cde}	۷۴/۹$^{l-n}$	۵۳/۲^{cde}	۷/۲۴
Anabaena sp. GGuCy-17	۶۴۱/۰^{a}	۲۸۱/۳^{a}	۸۲۱/۸^{a}	۳۰۹/۲^{a}	۶/۰۵
Anabaena sp. GGuCy-23	۱۰۲/۳^{bcd}	۲۳/۴$^{e-i}$	۱۵۵/۳^{bcd}	۵۷/۹^{cde}	۶/۴۲
Cylendrospermum sp. GGuCy-25	۱۳۰/۴^{b}	۳۸/۲^{def}	۱۸۴/۱^{b}	۸۴/۳^{c}	۶/۰۹
Hapalosiphon sp. GGuCy-32	۸۱/۸$^{d-h}$	۲۰/۱$^{f-i}$	۱۱۱/۳$^{g-k}$	۵۸/۲^{cde}	۷/۰۱
Westillopsis sp. GGuCy-39	۷۳/۵$^{d-i}$	۱۶/۷$^{f-i}$	۱۳۷/۲$^{e-h}$	۳۹/۰$^{d-g}$	۷/۰۵
Anabaena sp. GGuCy-42	۷۹/۶$^{d-i}$	۱۶/۲$^{g-i}$	۱۱۷/۷$^{f-i}$	۴۲/۰$^{c-g}$	۶/۲۱
Calothrix sp. GGuCy-43	۶۱/۱$^{h-k}$	۶/۳^{hi}	۱۰۴/۹$^{i-k}$	۴۱/۰$^{c-g}$	۶/۸۵

حروف یکسان نشان دهنده نداشتن تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد بر پایه آزمون دانکن است.



شکل۳: مقایسه میانگین جذب نیتروژن و فسفر گیاه برنج تلقیح شده با سویه‌های سیانوباکتری

سیانوباکتری‌ها کودهای زیستی ایده‌ال برای بهبود حاصلخیزی خاک و پایداری بلندمدت تولید تحت شرایط اکوسیستم شالیزار می‌باشد. کاربرد عملی آنها به‌عنوان منبع کود آلی نیتروژن برای برنج به‌خوبی معرض شده است. همچنین سیانوباکتری‌ها نشان دادند که دارای خاصیت حل‌کنندگی ترکیبات فسفات معدنی را دارند که اهمیت اقتصادی زیادی در تغذیه گیاه برنج دارد. غلظت فسفر در محلول شفاف رویی در روز ۱۵ بعد از تلقیح بین ۲۴/۳ تا ۶۴۱ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر متغیر بود و سویه *Anabaena* sp. GGuCy-17 نسبت به بقیه سویه‌ها از لحاظ اندازه حل‌کنندگی فسفات (۶۴۱ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) برتری قابل ملاحظه‌ای را نشان داد، و بعد از آن بیشترین غلظت فسفر محلول (۱۳۰/۴ میکروگرم فسفر بر میلی‌لیتر) به سویه *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 تعلق داشت. کاربرد عملی این سویه‌های برتر در جهت توسعه زاد مایه مختص آن منطقه نیاز است تا سیانوباکتری‌ها بتوانند بهتر در آشیان اکولوژیکی خود مستقر شوند و حداکثر مزایا را برای محصول برنج فراهم کنند.

منابع مورد استفاده

1. Aliasgharzad N, Shirmohamadi E, and Oustan S, 2009. Siderophore production by mycorrhizal sorghum roots under micronutrient deficient condition. Soil Environ. 28: 2. 119-123.
2. Desikhachary TV, 1959. Cyanophyta. Indian Council of Agricultural Research Publishers pp. 565.
3. Goldstein AH, Rogers RD and Mead G, 1993. Mining by microbe. Biol. Technol. 11: 1250-1254.
4. Gugger MF and Hoffmann L, 2004. Polyphyly of true branching cyanobacteria (Stigonematales), International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 349-357.
5. Iteman I, Rippka R, TandeandeMarsac N and Herdman M, 2002. rDNA analyses of planktonic heterocystous cyanobacteria, including members of the genera Anabaenopsis and Cyanospira. Microbiology, 148; 481-496.
6. John DM, Whitton BA and Brook AJ, 2003. The freshwater algal flora of the British Isles, an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press.
7. Kaushik BD, 1987. Laboratory Methods for Blue-green Algae. Associated Publishing Company. Pp. 171.
8. Khan MS, Zaidi A, Wani PA, 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. Agro. Sustain. Develop. 27: 29-43.
9. Komarek J, Kastovsky J, Mares J and Johansen LR, 2014. Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. Preslia 86: 295–335.
10. Lyra C, Hantula J, Vainio E, Rapala J, Rouhiainen L and Sivonen K, 1997. Characterization of Cyanobacteria by SDS-PAGE of whole-cell proteins and PCR/RFLP of the 16S rRNA gene. Archives of Microbiology 168, 176-184.
11. Madingan MT, Martinko JM, Stahl DA and Clark DP, 2012. Brock Biology of Microorganisms (13th ed).pp. 532-536. Publishing as Benjamin Cummings, San Francisco. Manufactured in the U.S.A.
12. Mandal B, Das SC and Mandal LN, 1992. Effect of growth and subsequent decomposition of cyanobacteria on the transformation of phosphorus in submerged soils. Plant and Soil 143: 289-29.
13. Mishra U, Choudhary KK, Pabbi S, Dhar DW, Singh PK, 2005. Influence of blue green algae and Azolla inoculation on specific soil enzymes under paddy cultivation. Asian Jr. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci. 7: 9-12.
14. Prasanna R, Jaiswal P, Shrikrishna J, Joshi M, Nain L, Rana A and Shivay YS, 2012. Evaluating the potential of rhizo-cyanobacteria as inoculants for rice and wheat. Journal of Agricultural Technology 8(1): 157-171.
15. Ray K, Mukherjee C and Ghosh AN, 2013. A Way to Curb Phosphorus Toxicity in the Environment: Use of Polyphosphate Reservoir of Cyanobacteria and Microalga as a Safe Alternative Phosphorus Biofertilizer for Indian Agriculture. Environ. Sci. Technol. 47: 11378−11379.
16. Roger PA and Ladha JK, 1992. Biological N2-fixation in wetland ricefields, estimation and contribution to nitrogen balance. Plant and Soil, 141, 41–55.
17. Singh RN, 1961. The role of blue-green algae in nitrogen economy of Indian Agriculture. ICAR Publication, New Delhi, pp. 1-175.
18. Yandigeri MS, Yadav AK, Srinivasan R, Kashyap S, Pabbi S, 2011. Studies on mineral phosphate solubilization by cyanobacteria Westiellopsis and Anabaena. Microbiology. 80(4): 558-565.
19. Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C, 2011. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. Biol Fertil Soils; 47 (4): 437–46.