Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
Phycological Society of Iran

The effect of drought stress on the efficiency of rhizobial bacteria (*Rhizobium leguminosarum*) symbiotic with faba bean (*Phaseoulus vulgaris*) Barkat variety

Mohammad Hossein Arzanesh[1*]

[1] Soil Biology and Biotechnology (Ph.D.), Department of Soil and Water Research, Golestan Research Center of Agriculture and Natural Resources Gorgan, Iran, Email: mharzanesh@gmail.com

Article type:
Research article

Article history
Received: 18.03.2023
Revised: 14.06.2023
Accepted: 18.06.2023
Published:22.12.2023

Keywords
Bean
Rhizobium leminosarum
Nitrogen fixation efficiency
Drought stress

Abstract

In order to investigate the effect of drought stress on some growth parameters and nodulation index, the symbiotic efficiency of rhizobial isolates an experiment in controlled greenhouse conditions in the form of a completely randomized design with 21 rhizobial isolates, a negative control treatment (without rhizobial bacteria) and a control treatment Positive (no bacteria with nitrogen fertilizer at the rate of 70 mg/kg from urea source) and 3 repetitions were done in 2013. Different levels of drought stress including drought in two levels S0 (100% of field capacity (control or no drought stress)), S3 (55% of field capacity (severe stress)), which by adding different concentrations of zero and 310 grams per liter of polyethylene glycol 6000 (PEG) was applied to the nutrient solution after one week of seedling germination. The results of statistical analyzes showed that drought stress had a significant reduction effect on shoot dry weight, shoot water content, nitrogen content, symbiotic efficiency of rhizobial isolates and nodulation index.

Cite this article as: Arzanesh, M.H. (2023). The effect of drought stress on the efficiency of rhizobial bacteria (*Rhizobium leguminosarum*) symbiotic with faba bean (*Phaseoulus vulgaris*) Barkat variety. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 18(4): 77-96.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

اثرتنش خشکی روی کارایی باکتری‌های ریزوبیومی (*Rhizobium leguminosarum*) همزیست باقلا (*Phaseoulus vulgaris*) رقم برکت

محمدحسین ارزانش[1*]

[1] بخش تحقیقات خاک وآب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران، رایانامه: mharzanesh@gmail.com

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۷
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۷
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

واژه‌های کلیدی:
باقلا
ریزوبیوم لگمینوزارم
کارآیی تثبیت نیتروژن
تنش خشکی

چکیده

به منظور بررسی اثر تنش خشکی روی برخی از پارامترهای رشدی و شاخص گره‌زایی، کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی آزمایشی در شرایط کنترل شده گلخانه در قالب طرح کامل تصادفی با ۲۱ جدایه ریزوبیومی، یک تیمار شاهد منفی (بدون باکتری ریزوبیومی) و یک تیمار شاهد مثبت (بدون باکتری همراه با کود نیتروژنی به میزان ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از منبع اوره) و ۳ تکرار در سال ۱۳۹۳ انجام شد. سطوح مختلف تنش خشکی شامل خشکی در دو سطح S0 (۱۰۰ ٪ ظرفیت مزرعه‌ای (شاهد یا بدون تنش))، S3 (۵۵٪ ظرفیت مزرعه‌ای (تنش شدید)) که با افزودن غلظت‌های مختلف صفر و ۳۱۰ گرم در لیتر پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG) به محلول غذایی بعد از یک هفته از سبز شدن گیاهچه‌ها اعمال شد. نتایج تجزیه‌های آماری نشان داد که تنش خشکی اثرکاهشی معنی‌داری روی وزن خشک اندام هوایی، محتوای آب اندام هوایی، مقدار نیتروژن، کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی و شاخص گره‌زایی داشت. گیاهان در شرایط تنش خشکی توانایی تشکیل گره‌های جدید را از دست می‌دهند. گره‌ها نقش مهمی در رشد و توسعه گیاهان دارند و کاهش شاخص گره‌زایی نشانگر کاهش توانایی گیاه در تولید گره‌های جدید و رشد فعال است. به‌طور کلی، نتایج نشان می‌دهد که تنش خشکی تأثیر منفی و قابل توجهی بر رشد و توسعه گیاهان، آب‌رسانی، تغذیه، همزیستی با باکتری‌های ریزوبیومی و تشکیل گره‌های جدید دارد. این نتایج می‌توانند در درک بهتر اثرات تنش خشکی بر عملکرد گیاهان و ارائه راهکارهای مناسب برای مدیریت آب در کشاورزی مفید باشند.

استناد: ارزانش، محمدحسین. (۱۴۰۲). اثرتنش خشکی روی کارایی باکتری‌های ریزوبیومی (*Rhizobium leguminosarum*) همزیست باقلا (*Phaseoulus vulgaris*) رقم برکت. *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۱۸ (۴)، ۹۶-۷۷.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

گیاه باقلا نیز در همزیستی با گونه خاصی از ریزوبیوم *R. leguminosarum* bv Viciae (2002; Weir, 2006) می‌تواند ۷۸ – ۳۹ درصد از نیاز نیتروژنی (۱۹۲ –۱۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار) خود را از این طریق تامین نماید (Alam and Najam, 2022). باقلا علاوه بر تامین مقدار زیادی از نیاز نیتروژنی خود باعث حاصل‌خیزی خاک می‌شود (Beauchamp et al., 2001). همچنین باقلا به علت داشتن دوره نمو طولانی و دارا بودن شاخ و برگ زیاد احتیاج زیادی به آب دارد. زیرا در موقع خشکی خاک رشد ریشه‌های فرعی کم شده و گیاه خیلی زود پژمرده می‌شود و بنابراین رطوبت کافی زمین از شرایط اولیه کشت موفقیت آمیز این گیاه است. استان گلستان یکی از استان‌های مهم در زمینه کشت و تولید باقلا در سطح کشور است و اغلب باقلای کشت شده در استان به صورت دیم است، کمبود بارندگی و پراکنش نامناسب آن در برخی از سال‌ها باعث می‌شود که گیاهان کشت شده تحت تنش خشکی قرار گرفته و عملکرد آنها کاهش یابد. یکی از مهمترین دلایل کاهش عملکرد اثر تنش خشکی روی سیستم همزیستی است (Zahran, 1999; Benmoussa et al., 2022). در واقع در اغلب موارد به دلیل تنش‌های محیطی مانند خشکی، شوری و غرقاب فرایند تثبیت نیتروژن کارایی خوبی ندارد.

برخی تحقیقات نشان داده است که باکتری‌های ریزوبیوم قادر به فعال‌سازی عناصر غذایی در خاک و تحریک جذب آنها توسط گیاهان می‌باشند. این اثر می‌تواند منجر به بهبود تغذیه گیاه و افزایش عملکرد آنها شود (Gontia-Mishra et al., 2015). برخی از باکتری‌های ریزوبیوم قادر به تثبیت نیتروژن جو در ریزوسفر گیاهان می‌باشند. این فرایند به گیاهان اجازه می‌دهد تا از نیتروژن موجود در هوا استفاده کنند و این عنصر مورد نیاز را برای رشد و توسعه خود به دست آورند (Tahir et al., 2017). برخی از باکتری‌های ریزوبیوم قادر به تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین‌ها و سیتوکینین‌ها هستند. این هورمون‌ها می‌توانند فرایندهای رشد و توسعه گیاهان را تنظیم کنند و بهبود عملکرد آنها را ایجاد کنند (Nadeem et al., 2014). ریزوبیوم می‌تواند به گیاهان در مقابل تنش‌های محیطی مختلف مانند تنش خشکی، شوری و بیماری‌ها کمک کند. این باکتری‌ها می‌توانند بهبود وضعیت آبی گیاهان را تسهیل کنند و به آنها کمک کنند تا با شرایط تنش مقابله کنند (Bhattacharyya and Jha, 2012).

به‌طورمثال سطوح مختلف تنش خشکی (۵۰، ۱۰۰و ۱۵۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک کلاس A)، شوری خاک (۲۵ تا ۷۵ میلی‌مول)، و نیترات خاک (۵ تا ۱۰ میلی مول نیتروژن) باعث کاهش تعداد گره‌ها و تثبیت نیتروژن توسط ریزوبیوم‌ها روی گیاهانی مانند نخود و باقلا گردید (Guo et al., 1992; Borucki & Sujkowska, 2008; Ammar et al., 2014) همچنین تنش خشکی باعث ۲۶ درصد کاهش احیای استیلن گردید. راموس (۱۹۹۹) گزارش کرد که با کاهش آب خاک تعداد و وزن گره‌ها، فعالیت آنزیم نیتروژناز ، پتانسیل آب برگ، مقدار پروتئین ، نشاسته و مقدار لگ هموگلوبین و فعالیت سایر آنزیم‌های مهم در ساخت کربن در گیاه لوبیا کاهش یافت. اما، وزن خشک گیاه تغییر نکرد. همچنین Alikhani و Mohammadi (۲۰۱۰) نشان دادند که کارایی جدایه‌ها ریزوبیومی همزیست و نیز عملکرد گیاه عدس تحت تاثیر تنش شوری و خشکی کاهش می یابد.

تلقیح گیاهان به ویژه گیاهان خانواده حبوبات با جدایه‌های ریزوبیوم مقاوم به تنش خشکی می تواند راه‌حل مناسبی برای کاهش اثرات تنش خشکی روی گیاهان باشند (Hafeez et al., 2004). در اکثر

مطالعات انجام شده غربالگری جدایه‌های ریزوبیومی برای مقایسه کارایی به ویژه آزمون گره‌زایی در شرایط غیر تنشی بررسی می‌شود. هدف این مطالعه بررسی راهکاری کارامد جهت غربالگری بهتر جدایه و بررسی اثرات تنش خشکی روی شاخص‌های کارایی جدایه‌های ریزوبیومی مانند توان گره‌زایی و تثبیت نیتروژن روی یکی از ارقام‌های معروف باقلا یعنی رقم برکت می باشد. برای این منظور ابتدا جدایه‌های ریزوبیومی از گره‌ها جداسازی ، خالص سازی و شناسایی مقدماتی شده و در ادامه توان گره‌زایی و کارایی همزیستی آنها در شرایط تنشی با شرایط غیر تنشی مقایسه شده و از بین آنها جدایه‌هایی که دارای شاخص‌های بالاتری هستند انتخاب شدند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری گره از باقلا: در سال ۱۳۹۳ تعداد ۵۸ نمونه گره از ریشه باقلا از سه استان گلستان، مازندران. خراسان رضوی در مرحله اواسط گلدهی (اسفند تا اوایل فروردین) از گیاهان شاداب برداشته شد. نمونه‌ها بعد از برداشت و ثبت مختصات جغرافیایی (جدول ۱) محل برداشت آنها در ظرف‌های مخصوص قرار داده‌شده و بلافاصله به آزمایشگاه بیولوژی خاک بخش تحقیقات خاک و آب مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان منتقل شدند.

جدول ۱: محل‌های جمع‌آوری گره‌های باقلا

شماره نمونه	استان	آدرس محلهای نمونه بردای	مختصات جغرافیایی	
۱		امیر آباد- جنب زمین زندان – روبروی تابلوی ایستگاه گرگان – نام زارع احمد بزی	N3653334	E5425130
۲		ایستگاه عراقی محله – نوار مرکزی – روبروی سوله ایستگاه	N3653203	E5434518
۳		سرخنکلاته- روستای کوماسی	N3652473	E5426434
٤		سرخنکلاته – نرسیده به روستای الوکلاته	N3653054	E5428546
٥		سرخنکلاته – سلطان آباد	N3653148	E5430229
٦		سرخنکلاته – نرسیده به روستای معصوم آباد	N3653186	E5432216
۷		جاده سرخنکلاته به جاده اصلی گرگان	N3652222	E5434252
۸	گلستان	جاده گرگان به علی آباد- سر خط مرزن کلاته	N3651464	E5435296
۹		والش آباد- چاه حاج خلیل – نام زارع امید الوستانی	N3650599	E5437044
۱۰		والش آباد- اول روستا	N3652023	E5437318
۱۱		گرگان- نوده ملک، بعد از روستا	N3653261	E5438523
۱۲		گرگان- بعد نوده ملک به سمت عطا آباد –حسین آباد نوده ملک	N3655157	E5438159
۱۳		آق قلا- جنوب عطاآبادح کنار آنبار تپه	N3657265	E5437337
۱٤		آق قلا- روستای پیر واش	N3657514	E5439514
۱٥		علی آباد- غرب مزرعه کتول	N3657173	E5451027
۱٦		علی آباد- جنوب امیر آباد فندرسک	N3658469	E5455103
۱۷		علی آباد –جعفر آباد نامتلو (کیلوکتر ۲۵ آزاد شهر)	N3658441	E5458093

شماره نمونه	استان	آدرس محلهای نمونه بردای	مختصات جغرافیایی	
۱۸		علی آباد- شهرک دارکلاته- علی آباد کتول	N3657548	E5457128
۱۹		گرگان- بین نوده ملک و قرق - شرق روستای جهان تیغ	N3652559	E5440233
۲۰		گرگان- روستای مرزنکلاته	N3652060	E5436356
۲۱		گرگان - جادههاشم آباد	N3651089	E5421431
۲۲		گرگان- بعد از جاده ورسن	N3650078	E5419196
۲۳		کردکوی- روستای چهارده	N3648403	E5409504
۲٤		کردکوی- غرب کردکوی	N3647094	E5403469
۲۵		بندرگز- ابتدای جاده روستای کوه صحرا	N3645330	E5358370
۲٦		بندرگز- روستای سوته ده – جاده قدیم کردکوی	N3644418	E5401427
۲۷		کردکوی- جاده قدیم- روستای سرکلاته خراب شهر – اول امام زاده قاسم	N3645224	E5403068
۲۸		کردکوی- سالیکنده	N3646508	E5404458
۲۹		کردکوی- جاده قدیم - روستای زارع محله	N3647034	E5412068
۳۰		گرگان- جاده قدیم کردکوی- روستای کفش گیری	N3648416	E5416528
۱		ساری - گیلرد	N4052424	E677596
۲		ساری به بابلسر- پنبه زار کتی	N4061816	E684501
۳		جویبار - گیلخواران	N4064024	E672009
٤		جویبار – کوهی خیل	N4062107	E668656
۵		بابلسر – نفت چال	N4063330	E662594
٦		بابلسر- عرب خیل	N40662391	E656661
۷		ساری – زردی جان	N4048008	E677933
۸		ساری- مشهدی کلا(کشتارگاه سابق)	N4077428	E680191
۹		ساری- شیخ کلا	N4047756	E679266
۱۰		ساری- المشیر	N4044336	E674723
۱۱	مازندران	جاده ساری قائمشهر- پشت شرکت تخته فشرده	N4043472	E673785
۱۲		ساری	N4043964	E671980
۱۳		ساری - قائمشهر	N4041392	E673321
۱٤		بابل- استردی کلا - روبروی ترانس برق	N4042528	E655021
۱۵		ساری – شرف دار کلا	N4046005	E678282
۱٦		ساری – روستای اسپندان پایین	N4068611	E688782
۱۷		ساری – روستای اسپندان بالا	N4066858	E689129
۱۸		جویبار- بیکار آیش	N406404	E666408
۱۹		ساری- کشتارگاه جدید	N4049420	E675717
۲۰		جاده قائمشهر – پایین لموک	N4042044	E673998
۲۱		قائمشهر- روستای کاسگر	N4042069	E670381
۱	خراسان رضوی	نیشابور	N668376	E4005877

شماره نمونه	استان	آدرس محلهای نمونه بردای	مختصات جغرافیایی	
۲		نیشابور	N668979	E4005835
۳		نیشابور	N667270	E4004990
٤		نیشابور	N669446	E4006929
٥		نیشابور	N669137	E4006642
٦		نیشابور	N668071	E4006397
۷		نیشابور	N668735	E4004270

جداسازی، خالص سازی و شناسایی مقدماتی: جداسازی باکتری‌های ریزوبیومی از گره به روش Pii و همکاران (۱۹۹٤) انجام شد. آزمون‌های شناسایی مانند آزمون گرم، کاتالاز، اکسیداز و آزمون‌های مختلف قندی طبق روش ارائه شده در کتاب طبقه بندی سیستماتیک باکتری شناسی برجی (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) نسخه ۲۰۰٤ جلد دوم برای شناسایی باکتری تا حد جنس و گونه انجام شد. برای سهولت مطالعه جدایه‌ها بر اساس تجزیه خوشه ای به روش بیشترین شباهت با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ١٦ گروه بندی شدند.

آزمون گره‌زایی جدایه‌های ریزوبیومی(PIT[1]): برای تعیین توان گره‌زایی جدایه‌های ریزوبیومی روی ریشه‌های باقلا طبق روش سوماسگران و هوبن (۱۹۹٤) با اندکی تغییرات انجام شد. برای این کار بذرهای باقلا رقم برکت از بخش اصلاح بذر و تهیه نهال مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان تهیه و پس از چند بار شستشو با آب شهر به مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۹٦ درجه و ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت ۲/۵ درصد غوطه‌ور شدند. بعد از طی این مدت بذرها ۵ بار با استفاده از آب مقطر استریل شستشو و روی تشتک‌های پتری شیشه ای با قطر ۱۰ سانتی‌متری حاوی آب-آگار (نسبت ۱۰ به ۱) و داخل انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. برای کاشت از جارهای پلاستیکی (ظرف نوشابه ۱/۵ لیتری به ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر و قطر دهانه ۹ سانتی‌متر) استفاده شد. این جارها با محلول ۲/۵ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شدند. این جارهای پلاستیکی با مخلوط اتوکلاو شده از ماسه دو بار شسته شده و پرلیت (۱ تا ۲ میلی‌متری) به نسبت ۲ به ۱ با ماسه پر شدند. در هر جار ۵ عدد بذر جوانه زده در عمق ۲ سانتی‌متری کاشته شد. پس از کشت هر بذر با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت ۲×۱۰^{۸} ریزوبیوم در هر میلی‌لیتر تلقیح شدند. سپس روی آن با ۱/۵ سانتی‌متر از مخلوط ماسه و پرلیت استریل پوشانده شد. جارها به اتاق رشد بخش تحقیقات خاک و آب و در دمای ۵±۲۳ درجه سلسیوس و تناوب نوری ١٤ ساعت روشنایی با لامپ‌های فلورسنت انتقال یافتند. کلیه جارها به مدت ۵ روز با آب مقطر آبیاری شدند. پس از گذشت ۵ روز گیاهچه‌های باقلا سر از بستر کشت بیرون آوردند. به منظور جلوگیری از آلودگی روی بستر و بین جوانه‌های باقلا با ماسه سفید شسته و استریل شده به ضخامت ۵ میلی متر پوشانده شد. با ظهور برگ اصلی در بیش از ۵۰ درصد جارهاها آبیاری گیاهان با محلول غذایی فاقد نیتروژن (Hansen and

[1] PIT (plant-infection test)

Choudhary, 2017) به‌مدت ۸ هفته محلول غذایی (هر دو هفته) داده شدند. در پایان ۸ هفته اندام هوایی از بالای طوقه گیاه جدا و بعد از شستن ریشه‌ها وجود و عدم وجود گره‌ها ، اندازه و رنگ درون گره برای تعیین شاخص گره‌زایی (Prevost and Antoun, 2008) ثبت گردید. در نهایت تعداد ۲۱ جدایه که از لحاظ مورفولوژی کلنی روی پلیت YMA مشابه ریزوبیوم و توانایی ایجاد گره روی باقلا را داشتند برای ادامه کار انتخاب شدند.

اثر تنش خشکی روی شاخص گره زایی، کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی، وزن خشک اندام هوایی، محتوای آب اندام هوایی، مقدار نیتروژن اندام هوایی باقلا رقم برکت

برای بررسی اثر تنش خشکی روی برخی از پارامترهای رشدی و شاخص گره زایی، کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی وزن خشک اندام هوایی، محتوای آب اندام هوایی، مقدار نیتروژن ، کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی و شاخص گره زایی آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی به صورت فاکتوریل شامل، فاکتوراول کود ((مایه تلقیح باکتریایی با ۲۱ جدایه ریزوبیومی و یک تیمار شاهد منفی (بدون باکتری ریزوبیومی) و یک تیمار شاهد مثبت (بدون باکتری همراه با کود نیتروژنی به میزان ۷۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از منبع اوره)) و فاکتور دوم دو سطح تنش خشکی (بدون تنش و تنش شدید) در ۳ تکرار در شرایط گلخانه ای در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان در سال ۱۳۹٤ انجام شد. وزن خشک اندام هوایی، محتوای آب اندام هوایی، مقدار نیتروژن، کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی و شاخص گره زایی برای مقایسه بین جدایه‌ها اندازه‌گیری شدند.

شاخص گره زایی (NI) به روش پروست (۲۰۰٦) استفاده شد. برای این کار در پایان ۸ هفته اندام هوایی از بالای طوقه گیاه جدا و بعد از شستن ریشه‌ها وجود و عدم وجود گره‌ها ، اندازه و رنگ درون گره برای تعیین شاحص گره زایی استفاده شدند (Prevost and Antoun, 2008).

$A \times B \times C \leq 18$

A =Nodule size: small 1 medium 2 large 3

B =Nodule color: white 1 pink 2

C=Nodule number: few 1 several 2 many 3

برای بررسی کارایی تبیثت نیتروژن (SE) جدایه‌ها از روش Somasegaran و Hoben (۱۹۹٤) استفاده شد. به منظور تهیه مایه تلقیح از محیط کشت YMB به مقدار کافی و با توجه به تعداد نمونه‌ها تهیه و درون ارلن‌ها توزیع و اتوکلاو شدند. تمام جدایه‌های ریزوبیومی خالص سازی شده به این ارلن‌های استریل تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر دورانی با دوران ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. تعداد پنج بذر جوانه‌زده در ظروف پلاستیکی (جار لئونارد) در عمق ۲ سانتی‌متری کاشته شد. هر بذر با یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت $۱/۲\times۱۰^{۸}$ سلول در هر میلی لیتر تلقیح شد (Somasegaran and Hoben, 1994). روی جارها با درب پلیت‌های استریل با قطر ۱۰ سانتی متر برای جلوگیری از آلودگی پوشانده شد. بعد از یک هفته از سبز شدن گیاهچه‌های باقلا تعداد آنها به سه عدد کاهش یافت همزمان با تنک کرده گیاهچه‌ها محلول زیرین جارهای پلاستیکی (۲۰۰ میلی لیتر) محلول غذایی فاقد نیتروژن برای لگم‌های دانه درشت (Pii et al., 2015) استفاده شد. تنش خشکی شدید (۵۵ ٪ ظرفیت مزرعه‌ای) با استفاده از غلظت ۳۱۰ گرم در لیتر پلی اتیلن گلیکول ٦۰۰۰ اعمال شد (Alizadegan et al., 2015; Abdi et al., 2014). سطوح مختلف خشکی با پلی اتیلن گلیکول (٦۰۰۰) اعمال گردید. غلظت پلی اتیلن گلیکول که برای تهیه پتانسیل آب لازم بود از طریق رابطه زیر بدست آمد.

$QS= (1018\times10^{-2})\ C-(1018\times10^{-4})\ C2 + (2067\times10^{-4})\ CT+ (8039\times10^{-7})\ C2T$

QS: پتانسیل اسمزی بر حسب بار

C: غلظت پلی اتیلن گلیکول بر حسب گرم در لیتر

T: درجه حرارت بر حسب درجه سانتی‌گراد

برای این منظور محلول‌های غذایی هر دو هفته با محلول‌های غذایی جدید پر شدند. این جارهای حاوی گیاهچه در شرایط گلخانه ای مشابه با شرایط قبل (آزمون گره زایی) تا مرحله اولیه گل‌دهی (۸ هفته) نگهداری شدند. در طول دوره رشد ازمحلول غذایی عناصر کم مصرف و پر مصرف (بدون نیتروژن) استفاده شد. تیمار نیتروژنی به مقدار ۷۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به فرم اوره و به صورت تقسیط در ٤ مرحله و هر مرحله به میزان ۱۷/۵ میلی گرم در کیلوگرم به ترتیب در ۱، ۳،۵ و ۷ هفتگی استفاده شد.در انتهای ۸ هفته اندام هوایی از محل طوقه جداسازی و در داخل پاکت‌های کاغذی به مدت سه روز در دمای ٦٨ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از گذشت این مدت وزن خشک اندام هوایی اندازه گیری و کارای همزیستی با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید

$SE= (Ti-Tc)/ (Tn-Tc) \times100$

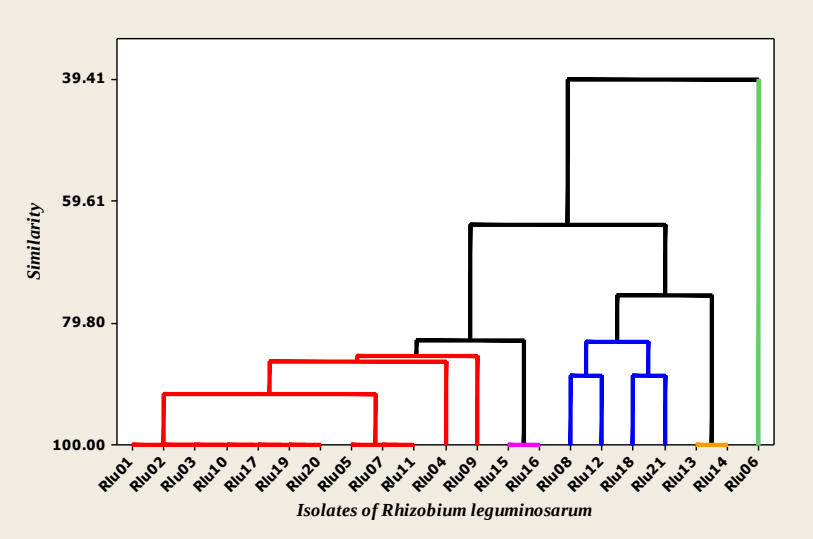
که در این معادله SE کارایی همزیستی جدایه ریزوبیومی در شرایط تنش خشکی، Ti وزن خشک اندام هوایی گیاه تلقیح شده با جدایه ی ریزوبیومی، Tc وزن خشک اندام هوایی در تیمار شاهد منفی (تلقیح نشده و کود داده نشده) و Tn وزن خشک اندام هوایی در تیمار شاهد مثبت (تلقیح نشده و کود داده شده) بودند. در ضمن به منظور مقایسه میزان نیتروژن در تیمارهای آزمایشی مقدار نیتروژن موجود در اندام هوایی به وسیله دستگاه کجدال اندازه گیری شد. در ارزیابی کارایی همزیستی اکر SE< 50 بود جدایه در طبقه با کارایی ضعیف، SE-50-75 در طبقه با کارایی متوسط و SE- 75-100 در طبقه با کارایی خوب و SE>100 در طبقه با کارایی خیلی خوب گروه بندی شدند (Somasegaran and Hoben, 1994). برای اندازه گیری محتوای نسبی آب (RWC) در ساعت ۱۰ صبح از آخرین برگ توسعه یافته (برگ سوم انتهایی) به طور تصادفی نمونه‌برداری انجام شد. برگ‌های جدا شده از هر بوته به‌طور جداگانه در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد و برای جلوگیری از تلفات آب، نمونه‌ها روی تکه‌های یخ به سرعت به آزمایشگاه منتقل و وزن تر آنها اندازه‌گیری شد. سپس برگ‌ها در آب مقطر به مدت ٢٤ ساعت در دمای اتاق و نور کم برای محاسبه وزن اشباع غوطه‌ور شدند و پس از این مدت نمونه‌ها بسرعت و با دقت با دستمال کاغذی خشک و وزن اشباع آنها اندازه گیری شد. در نهایت برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها را به‌مدت٢٤ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون قرار داده شد، و RWC طبق معادله زیر تعیین گردید(Creus et al., 2004؛ Ritchie et al., 1990).

RWC= (وزن خشک – وزن اشباع /وزن خشک – وزن تر)×۱۰۰

نتایج

جداسازی ریزوبیوم‌ها از گره، شناسایی و دسته بندی و آزمون گره‌زایی: تعداد ۲۱ جدایه ریزوبیومی که ۱۰ جدایه از گره‌های باقلا در استان‌های خراسان رضوی (١٦/٤٠ درصد)، ۸ جدایه از گره‌های گلستان (۱۲/۱۱ در صد)و ۳ جدایه (٤/٩٢ در صد) از مازندران جداسازی شدند. از ۲۱ جدایه ریزوبیومی همزیست با باقلا، تعداد ١٦ جدایه قادر به استفاده از ساکارز به عنوان منبع کربنی بودند و ۵ جدایه نیز توانایی مصرف ساکارز را نداشتند. تعداد ۱۵ جدایه توانایی رشد در pH برابر ۹ و همه جدایه‌ها توانایی رشد در محیط با pH برابر با ۸ را داشتند. همه جدایه‌ها گرم منفی، میله‌ای، هوازی متحرک و کلنی‌های آنها اغلب دایره‌ای،محدب، برآمده ،لعابی

نیمه مات، فاقد توان جذب کنگورد با قطر کلنی دو تا ٤ میلی‌متر پس از پنج روز بودند. شناسایی مقدماتی بر اساس کتاب برجی (۱۹۹٤) نشان داد که همه جدایه‌های ریزوبیومی منسوب به گونه ریزوبیوم لگمینوزاروم بودند. گروه بندی جدایه‌های ریزوبیومی وجود ۱۰ گروه فرعی را بر اساس تفاوت در صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک نشان داد(شکل ۱). در گروه اول بیشترین تعداد جدایه‌ها یعنی ۷ جدایه قرار داشت. در گروه دوم سه جدایه و در ٤ گروه بعدی هر کدام ۲ جدایه ریزوبیومی داشتند. در نهایت نیز سه گروه وجود داشت که تنها یک جدایه در آن قرار داشتند (شکل ۱).



شکل ۱: تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم همزیست با باقلا

بررسی وضعیت گره‌بندی (فراوانی، اندازه و رنگ داخل گره‌ها) جدایه‌های ریزوبیومی همزیست با باقلا نشان داد که بین جدایه‌ها از این لحاظ تفاوت وجود داشت. در نتیجه شاخص گره زایی برای هر جدایه با جدایه دیگر تفاوت داشت. نتایج بررسی شاخص گره بندی جدایه‌های مختلف براساس نتایج آزمون آلودگی گیاه در جدول ۱ آورده شده است.

از لحاظ دسته بندی بر اساس شاخص گره زایی این ۲۱ جدایه به ۵ دسته متفاوت تقسیم شدند (جدول ۲) که از لحاظ تعداد بین دسته‌ها تفاوت وجود داشت (جدول ۲). جدایه‌های *Rlu01*،*Rlu07*، *Rlu15*و*Rlu20* دارای ضرایب گره زایی بالاتری از بقیه جدایه‌ها بودند. جدایه‌ها در شرایط بدون تنش دارای شاخص گره زایی از ٤ تا ۱۸ بودند.

همچنین از لحاظ کارایی تثبیت نیتروژن در شرایط بدون تنش خشکی این ۲۱ جدایه به ٤ دسته متفاوت تقسیم شدند که بین دسته‌ها از لحاظ تعداد تفاوت وجود داشت (جدول۳).

جدول ۱: بررسی ضریب گره زایی در جدایه‌های ریزوبیومی همزیست با باقلا

جدایه‌ها ریزوبیومی	محل‌های جداسازی	تعداد گره	اندازه گره‌ها	رنگ داخل گره	شاخص گره‌زایی (NI[1])
*Rlu*01	گلستان	۳	۳	۲	۱۸
*Rlu*02	گلستان	۲	۳	۲	۱۲
*Rlu*03	گلستان	۱	۲	۲	٤
*Rlu*04	گلستان	۲	۲	۲	۸
*Rlu*05	گلستان	۱	۲	۲	٤
*Rlu*06	گلستان	۲	۳	۲	۱۲
*Rlu*07	گلستان	۳	۳	۲	۱۸
*Rlu*08	گلستان	۲	۳	۲	۱۲
*Rlu*09	خراسان رضوی	۲	۲	۲	۸
*Rlu*10	خراسان رضوی	۳	۱	۲	٦
*Rlu*11	خراسان رضوی	۲	۱	۲	٤
*Rlu*12	خراسان رضوی	۲	۱	۲	٤
*Rlu*13	خراسان رضوی	۲	۳	۲	۱۲
*Rlu*14	خراسان رضوی	۲	۲	۲	۸
*Rlu*15	خراسان رضوی	۳	۳	۲	۱۸
*Rlu*16	خراسان رضوی	۱	۲	۲	٤
*Rlu*17	خراسان رضوی	۲	۲	۲	۸
*Rlu*18	خراسان رضوی	۲	۱	۲	٤
*Rlu*19	مازندران	۱	۲	۲	٤
*Rlu*20	مازندران	۳	۳	۲	۱۸
*Rlu*21	مازندران	۱	۲	۲	٤

جدول ۲: دسته بندی جدایه‌های ریزوبیومی بر اساس شاخص گره‌زایی

شاخص گره زایی	تعداد جدایه‌ها	جدایه‌های ریزوبیومی
٤	۸	*Rlu03، Rlu05، Rlu011 ، Rlu12 ،Rlu16 ، Rlu18 ،Rlu19 و Rlu21*
٦	۱	*Rlu10*
۸	٤	*Rlu04، Rlu09، Rlu14 ، Rlu17*
۱۲	٤	*Rlu02، Rlu06، Rlu08 ، Rlu13*
۱۸	٤	*Rlu01، Rlu07، Rlu15 ، Rlu20*

[3]Nodulartion Index (Prevost and Antoun,2006): A×B×C≤18 A(Nodule size: small 1 medium 2 large 3), B(Nodule color: white 1 pink 2) and C(nodule number : few 1 several 2 many 3)

جدول۳: دسته‌بندی جدایه‌های ریزوبیومی براساس کارایی تثبیت نیتروژن در شرایط بدون تنش خشکی

شاخص گره زایی	تعداد جدایه‌ها	جدایه‌های ریزوبیومی
I	۱	*Rlu*17
E	۱۳	*Rlu*13، *Rlu*012 ،*Rlu*11 ،*Rlu*09 ،*Rlu*08 ،*Rlu*05 ،*Rlu*04، *Rlu*03 ،*Rlu*02 *Rlu*01 *Rlu*21 ، *Rlu*19 *Rlu*16
PE	۴	*Rlu*06 ، *Rlu*10 ، *Rlu*14 ، *Rlu*18 ، *Rlu*07
VE	۳	*Rlu*07، *Rlu*15، *Rlu*20 ، *Rlu*06 ، *Rlu*08، *Rlu*09، *Rlu*19

اثر تنش خشکی روی شاخص گره زایی، کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی، وزن خشک اندام هوایی، محتوای آب اندام هوایی، مقدار نیتروژن اندام هوایی باقلا رقم برکت: نتایج تجزیه واریانس ماده خشک کل، گره‌بندی و صفات وابسته به آن، مقدار نیتروژن تثبیت شده در گره و عملکرد تثبیت نیتروژن، تحت تاثیر سطوح مختلف تنش خشکی و سطوح مختلف تلقیح با جدایه‌های ریزوبیوم لگومینوزاروم در جدول ٤ نشان داده شده است. تاثیر تیمار خشکی و تیمار تلقیح جدایه‌های ریروبیومی واثر متقابل سطوح خشکی و جدایه‌های ریزوبیومی روی صفات اندازه گیری شده معنی دار بود (جدول ٤).

جدول ٤: نتایج تجزیه واریانس گره بندی و صفات وابسته به آن، مقدار نیتروژن، وزن خشک اندام هوایی و ریشه

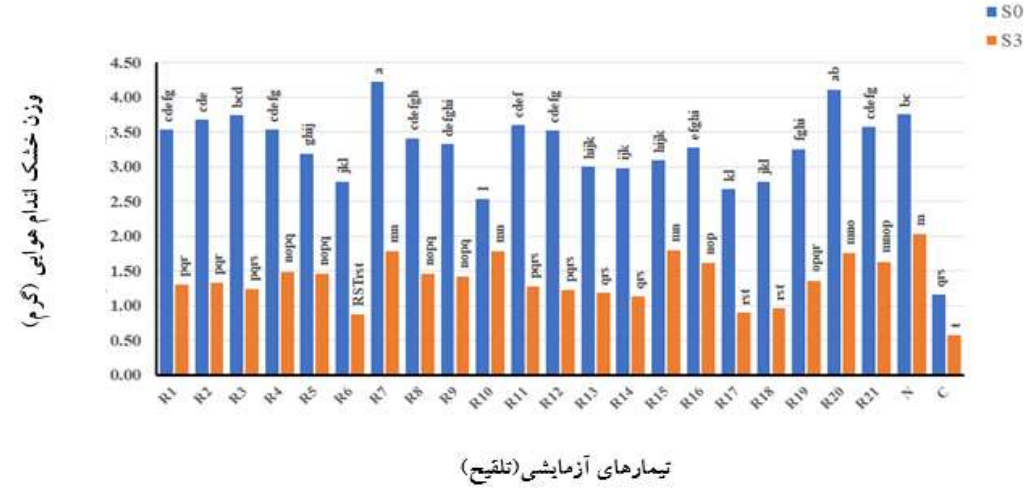
منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن خشک اندام هوایی	میزان نیتروژن اندام هوایی	کارایی همزیستی	محتوای نسبی آب	شاخص گره زایی
تنش خشکی	۱	۱۲۱/۱۵**	۳۹۲۸۹۸/۲۲**	۳۳۷٤۸/۹۳**	۱۲٥۳۰/٦۲**	۷۸۹/۱۳**
تیمار تلقیح	۲۲	۲٦/۲۳**	۳۱۱۱۲۱٥/۳۸**	۷۷٥۱۲/۲۰**	٤۸٥/۷۷**	۱۷٦۳/٤۸**
اثر متقابل	۲۲	۷/٦۳**	۲۷۸۲٦/۸۳**	٦۹۰۳/۹۷**	۲۰٦/٥٥**	٦۹۲/۸۷**
خطا	۹۲	٥/۹٤	٥٦۷۳/۸۳	٦/٦۱	۹۲/٦۷	۲٤/۰۱
ضریب‌تغییرات(٪)	–	۱۰/۹۹٦	٦/٦۸۷	٦/٤۱	۱/۲۲	۸/۸۳

** و ns به‌ترتیب معنی‌داری در سطح ۱ درصد و عدم وجود اختلاف معنی دار

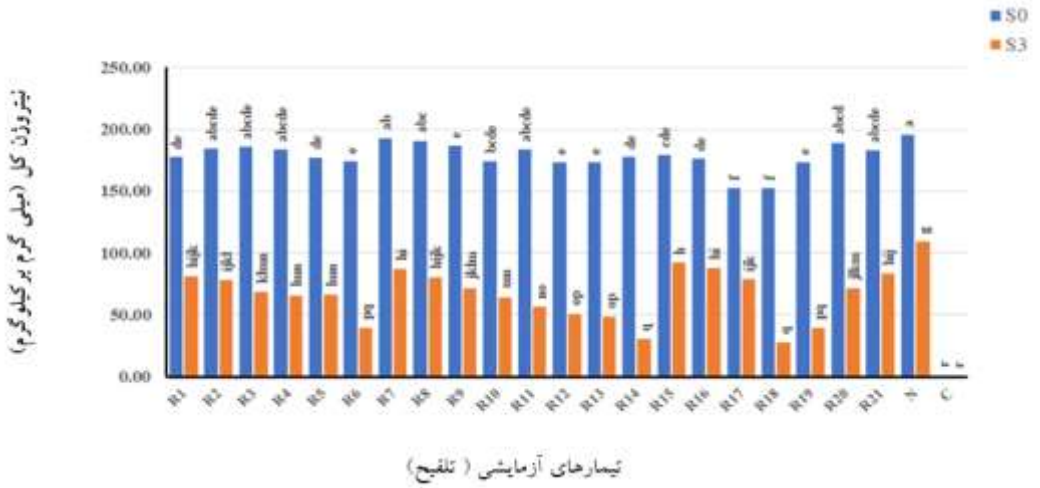
نتایج حاصل از این صفت کارایی همزیستی جدایه‌های ریزوبیومی نشان داد که در شرایط بدون تنش ۱٤/۳ درصد جدایه در گروه خیلی موثر، ٦۲ درصد در گروه جدایه‌های موثر و ۱۹ درصد در گره جدایه‌های نسبتاً موثر و ٤/۸ درصد در گروه جدایه‌های غیرموثر قرار داشتند (شکل٦).

اثر تنش شدید خشکی روی وزن خشک اندام هوایی، مقدار نیتروژن و شاخص گره زایی در تیمارهای تلقیح شده با جدایه‌های ریزوبیومی تفاوت داشتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که مقدار نیتروژن گیاهچه‌ها در تیمارهای تلقیح شده با جدایه‌های *Rlu07* ، *Rlu15* و *Rlu20* تفاوت کمتری نسبت به تیمار شاهد مثبت (تیمار نیتروژنی) داشتند. یکی دیگر از اثرات تنش خشکی کاهش وزن خشک اندام هوایی بود. بیشترین وزن خشک اندام هوایی در شرایط تنش خشکی شدید مربوط به جدایه *Rlu15* بود. همچنین مقدار نیتروژن، تعداد گره و مقدار تثبیت نیتروژن اندام هوایی در گیاهچه‌های تلقیح شده با این جدایه نسبت به شاهد بیشتر بود. در این آزمایش بیشترین میزان نیتروژن تثبیت شده مربوط به جدایه‌های ریزوبیومی *Rlu07* ، *Rlu15* و *Rlu20* و کمترین مقدار مربوط به تیمار شاهد (*C*) بود

(شکل‌های ۲ و ٤). اعمال تنش خشکی باعث کاهش وزن خشک اندام هوایی، مقدار نیتروژن اندام هوایی، درصد نیتروژن تثبیت شده، درجه کارایی، درجه گره زایی و محتوای نسبی آب در برگ شد.

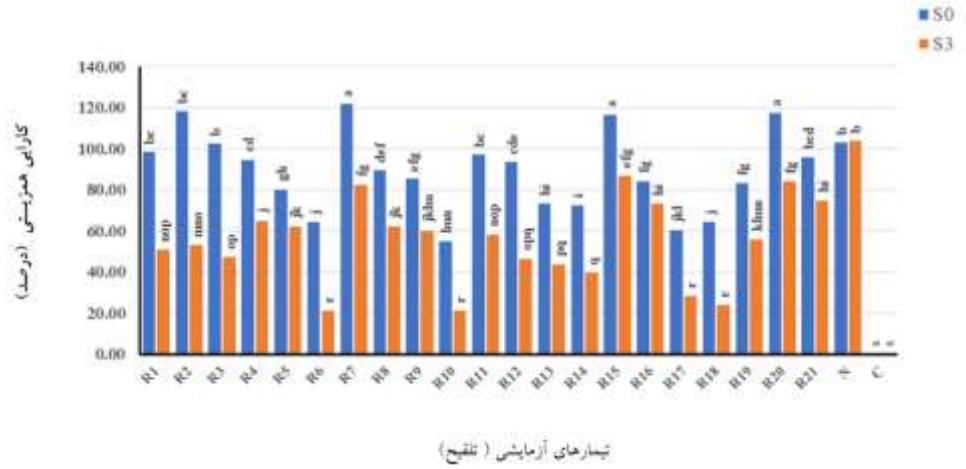


شکل ۲: اثر تنش خشکی روی وزن خشک اندام هوایی باقلا رقم برکت



شکل ۳ : اثر تنش خشکی روی مقدار نیتروژن اندام هوایی باقلا رقم برکت

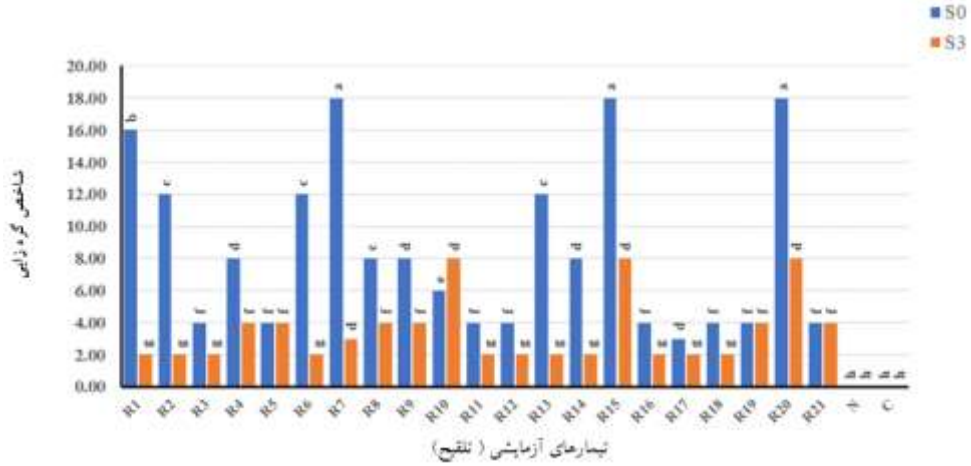
یکی دیگر از اثرات تنش خشکی کاهش کارایی جدایه‌ای ریزوبیومی بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که در صورت اعمال تنش خشکی شدید تعداد جدایه‌های با کارایی بالا و خوب کاهش یافته و غربالگری بهتر برای انتخاب جدایه‌های مقاوم و کارا صورت می‌گیرد. در کل کارایی جدایه‌های با توانایی موثر ٤٦ درصد کاهش یافت. علاوه بر کارایی همزیستی جدایه‌ها در اثر افزایش تنش خشکی گروه بندی جدایه‌های ریزوبیومی نیزتغییر کرد و جدایه‌ها غیر موثر بیشتر شدند. به طوری که جدایه‌های با کارایی خیلی موثر به صفر درصد، گروه با کارایی موثر به ۲۳/۸ درصد، گروه با کارایی نسبتاً موثر به ۳۳/۳ درصد و گروه ریزوبیومی با کارایی غیر موثر به ٤۳/۹ درصد تغییر یافتند (شکل٤). سه جدایه با کارایی بالا (*Rlu07*، *Rlu15* و *Rlu20*) با اعمال تنش خشکی، یک درجه کاهش کارایی همزیستی در آنها مشاهده گردید. کلاس کارایی این سه جدایه از خیلی موثر به موثر کاهش یافت (شکل ٤).



شکل٤: اثر تنش خشکی روی کارایی همزیستی باقلا رقم برکت

شکل ٥: اثر تنش خشکی روی محتوای نسبی آب اندام هوایی باقلا رقم برکت

بررسی محتوای نسبی آب در گیاهچه‌های تلقیح شده با جدایه‌های ریزوبیومی بیشتر از تیمار شاهد بود (شکل ٥). یکی دیگر از اثرات تنش خشکی کاهش شاخص گره زایی در ریشه‌های تلقیح شده بود (شکل ٦)، به‌طوری که نیمی از جدایه‌ها دارای شاخص گره زایی پایین تر از ٤ شدند.



شکل٦ : اثر تنش خشکی روی شاخص گره زایی باقلا رقم برکت

در شرایط تنش خشکی از لحاظ دسته‌بندی بر اساس شاخص گره زایی این ۲۱ جدایه به ۳ دسته متفاوت تقسیم شدندکه از لحاظ تعداد بین دسته‌ها تفاوت وجود داشت(جدول۵). جدایه‌های *Rlu07*، *Rlu10*، *Rlu15* و *Rlu20* دارای ضرایب گره زایی بالاتری از بقیه جدایه‌ها بودند. جدایه‌ها در شرایط بدون تنش دارای شاخص گره زایی از ۲ تا ۸ بودند.

جدول ۵: دسته بندی جدایه‌های ریزوبیومی بر اساس شاخص گره زایی در شرایط تنش شدید

شاخص گروه زایی	تعداد جدایه‌ها	جدایه‌های ریزوبیومی
۲	۱۱	*Rlu01*، *Rlu02*، *Rlu03* ، *Rlu06*، *Rlu11*، *Rlu12*، *Rlu13*، *Rlu14*، *Rlu16*، *Rlu17* و *Rlu18*
٤	٦	*Rlu04* ، *Rlu05*، *Rlu08*، *Rlu09* ، *Rlu19* ، *Rlu21*
٨	٤	*Rlu07*، *Rlu10*، *Rlu15* ، *Rlu20*

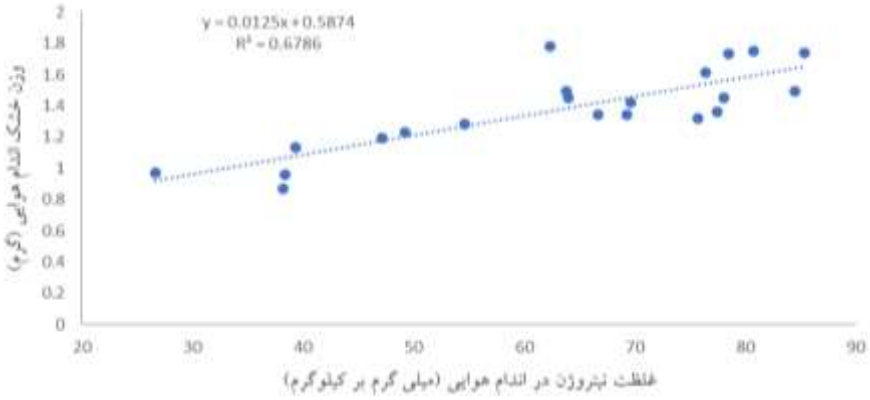
از لحاظ کارایی تثبیت نیتروژن در شرایط تنش خشکی این ۲۱ جدایه به ۳ دسته متفاوت تقسیم شدند که بین دسته‌ها از لحاظ تعداد تفاوت وجود داشت (جدول ٦).

جدول ٦: دسته‌بندی جدایه‌های ریزوبیومی بر اساس کارایی تثبیت نیتروژن در شرایط تنش شدید

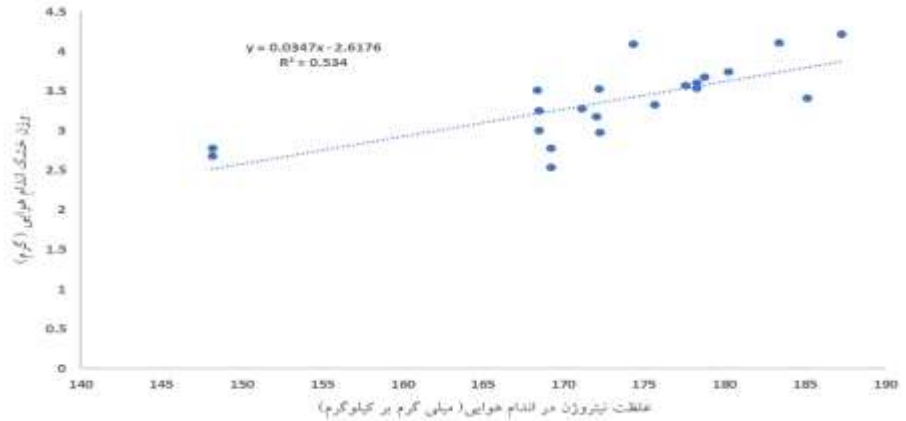
شاخص کارایی	تعداد جدایه‌ها	جدایه‌های ریزوبیومی
I	۹	*Rlu0*، *Rlu03*، *Rlu10* ، *Rlu11*، *Rlu12* ، *Rlu13*، *Rlu14* ، *Rlu17* و *Rlu18*
E	٥	*Rlu07* ، *Rlu15*، *Rlu16*، *Rlu20* ، *Rlu21*
PE	٧	*Rlu02*، *Rlu04*، *Rlu05*، *Rlu06* ، *Rlu08*، *Rlu09*، *Rlu19*

بین جذب نیتروژن و وزن خشک اندام هوایی گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های ریزوبیوم همبستگی بیشتری در حالت تنش شدید نسبت به شرایط بدون تنش مشاهده شد(شکل۷). Lerki و Akhgar (۲۰۱٤) به وجود رابطه بین جذب نیتروژن و وزن خشک اندام هوایی تاکید داشتند. بر اساس میانگین داده‌ها بیشترین وزن خشک اندام هوایی با در گیاهان تلقیح شد با جدایه‌های *Rlu07*، *Rlu15* و *Rlu20* (بالاترین غلظت نیتروژن) بدست آمد.

A



B



شکل۷: رابطه بین مقدار نیتروژن در اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی در شرایط بدون تنش (A) و در شرایط تنش خشکی شدید (B)

بحث

استفاده از جدایه مناسب باکتری ریزوبیومی و تلقیح آن می‌تواند مقدار زیادی از نیاز نیتروژنی باقلا را برطرف نماید. لذا اولین مرحله از کار جداسازی و بررسی کارایی این جدایه‌ها و سپس انتخاب جدایه‌ها با کارایی بالاست. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که ۳٤ در صد از نمونه‌های گره، واجد ریزوبیوم وقابل جدا سازی با روش معمول بودند. از ۵۸ نمونه گره ریشه ای باقلا ۲۱جدایه توانایی ایجاد گره روی ریشه‌های باقلا را داشتند. گاهی اوقات طولانی شدن زمان نگهداری باکتری روی لوله‌های حاوی محیط کشت مورب (اسلنت) تا آزمون گره زایی ،کشت‌های متوالی حین فرایند خالص سازی (واکشت‌ها) ممکن است ، باعث از دست رفتن پلازمیدهای حاوی ژن *nod* ، که نقش اصلی را در فرایند گره زایی دارند، شده باشد (Laguerre et al., 2003).

صفت کارایی همزیستی یک معیار مهم در انتخاب جدایه‌های ریزوبیومی است که بیانگر توانایی تثبیت نیتروژن در گیاهان گره دار شده می باشد (Somasegaran and Hoben, 2004). در اتیوپی از ۳۸ جدایه تنها ۱۳ درصد جدایه‌ها (۵ جدایه) در گروه با کارایی خیلی موثر و ۷۱ درصد (۲۷ جدایه) جدایه‌ها در گروه با کارایی موثر (خوب) قرار داشتند. افزایش وزن خشک ساقه و ریشه در اثر تلقیح (یونجه و شبدر) با جدایه‌های ریزوبیومی همانند کارهای Lerki و Akhgar (۲۰۱٤) مطابقت داشت. البته میزان افزایش نیتروژن نسبت به شاهد در این آزمایش به دلیل اعمال تنش خشکی کمتر بود. در واقع گیاه در حالت تنشی انرژی زیادی را صرف بقای خود می‌کند.

همانند نتایج آین آزمایش Farnia و همکاران (۲۰۰۷) به نقل از Hafiz و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که جدایه‌های باکتری *ریزوبیوم لگومینوزارم* اثر معنی داری بر وزن خشک گره عدس دارند و اعمال تنش رطوبتی تأثیر معنی‌داری روی این صفت می‌گذارد. همچنین دانشیان (۱۳۷٤) در مطالعه روی اثر متقابل جدایه‌های باکتری *ریزوبیوم* (هلی نیترو، گلدکت و ریزوکینگ) و ارقام مختلف سویا (ویلیا مز، سنچوری وهارکور) به اثر معنی‌دار جدایه باکتری تحت تاثیر عوامل محیطی اشاره نمود که در این بین جدایه گلدکت از گره زایی بیشترینسبت به سایر جدایه‌ها برخوردار بود. Farnia و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بررسی اثر تنش خشکی بر گره بندی و تثبیت نیتروژن سه کود زیستی هلی نیترو، ریزوکنیک و نیتراژین روی سویا نشان داد که باکتری موجود در کود زیستی هلی نیترو در شرایط مطلوب آبیاری مقدار تثبیت نیتروژن، ماده خشک بالاتری نسبت به بقیه کودهای زیستی

داشت. در حالی که با اعمال تنش خشکی کود زیستی ریزوکینگ از کارایی بیشتری برخوردار بود و تعداد گره فعال بیشتر ، تثبیت نیتروژن بیشتر و در نتیجه ماده خشک بالاتری را تولید نمود. در نتیجه آنها کود زیستی هلی نیترورا برای حالت بدون تنش خشکی و کود زیستی ریزوکینگ را برای شرایط تنش خشکی پیشنهاد دادند. با توجه به نتایج حاصل از این سه شاخص جدایه‌های با بیشترین مقدار یعنی جدایه‌های ریزوبیومی *Rlu07*، *جدایه Rlu15* و *جدایه Rlu20* انتخاب شدند.

مقایسه کارایی جدایه‌ها می‌تواند براساس میزان نیتروژن جذب شده توسط گیاه و یا مقایسه وزن خشک اندام هوایی صورت گیرد. اندازه گیری میزان نیتروژن اندام هوایی مطابق نظر Fesenko و همکاران (۱۹۹۵) نسبت به اندازه گیری وزن خشک اندام هوایی مناسب تر است. برخی دیگر از محققین نیز اندازه گیری وزن خشک اندام هوایی را موثرتر از اندازه گیری نیتروژن در اندام هوایی می‌دانند (Khosravi, 2014; Lerki and Akhgar, 2014). در این آزمایش نیز اندازه‌گیری میزان نیتروژن اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی هردو انجام شد و نتایج حاصل نشان داد که ٤٨ درصد جدایه‌ها دارای کارایی غیر موثر، ۳۳ درصد موثر و تنها ۱۹ درصد خیلی موثر بودند.علل این کمی کارایی ممکن است به علت مصرف کودهای نیتروژنی، حضور جمعیت بومی ریزوبیوم‌های غیرکارا یا کم کارا وشرایط محیطی باشد. توان تثبیت نیتروژن و تولید ماده خشک گیاه، تحت تاثیر عوامل مختلفی از قبیل ژنوتیپ گیاه، جدایه باکتری، رطوبت خاک، نیتروژن طبق نظر Serraj و همکاران (۱۹۹۹)، در بین ریزوبیوم‌ها جدایه‌های تند رشد به از دست دادن رطوبت بیشتر از جدایه‌های کند رشد حساس هستند (Serraj et al., 1999). اما بقای ریزوبیوم‌ها در خاک تحت تنش خشکی مهم نیست. تکثیر و حرکت ریزوبیوم‌هادر خاک‌های خشک می تواند عامل محدود کننده خصوصاً در مراحل اولیه ایجاد رابطه همزیستی باشد که این امر می تواند باعث کاهش فرایند آلوده‌سازی شود. (Serraj et al., 1999).

همچنین تنش خشکی نیز یکی دیگر از عوامل مهم درفرایند تثبیت نیتروژن است (Chammakhi, 2022). کافی نبودن آب از دو طریق فعالیت گره‌ها را کاهش و یا متوقف می کند، یکی اثر غیرمستقیم تنش خشکی است که در مراحل اولیه باعث کاهش فتوسنتز گیاه می‌شود، زیرا روزنه‌ها بسته شده و کاهش ورود دی اکسیدکربن به برگ باعث کاهش فعالیت فتوسنتزی گیاه می‌گردد، چنانچه این شرایط به مدت طولانی ادامه یابد انتقال کربوهیدرات‌ها به گره‌ها کاهش می‌یابد، که دلیل آن کاهش میزان تولید مواد فتوسنتزی و همچنین مصرف مواد فتوسنتزی جهت رشد و توسعه ریشه به منظور دستیابی به منابع جدید آب، می‌باشد. این عامل باعث کاهش تثبیت نیتروژن شده و با کاهش نیتروژن مورد نیاز گیاه، فرایند تولید و توسعه برگ‌ها و اندام‌های رویشی کند می شود که خود منجر به کاهش فتوسنتز گیاه می‌گردد و در تنش سخت این عامل تشدید می‌گردد. همچنین اثر مستقیم تنش خشکی بر تثبیت نیتروژن، از طریق کاهش انتشار اکسیژن به گره و در نتیجه کاهش تنفس گره است (Elbagory, 2022). با توجه به این که تثبیت نیتروژن واکنشی انرژی خواه می باشد، محدودیت تولید انرژی در گره‌های موجود بر روی ریشه، تثبیت نیتروژن را کاهش می دهد. نتایج آزمون کارایی ۲۱ جدایه‌های ریزوبیومی تثبیت کننده بیولوژیکی نیتروژن در تنش خشکی شدید نشان داد که ضریبت گره زایی در جدایه‌ها از ٥٦ تا ۸۹ درصد و کارایی تثبیت نیتروژن از ۱۰ تا ۵۰ درصد کاسته می شود. در واقع ضریب گره زایی نسبت به کارایی حساسیت بیشتری به تنش خشکی دارد. Serraj و همکاران (۱۹۹۹) کاهش تعداد گره و وزن خشک را بعد از اعمال تنش شدید خشکی گزارش کردند (Serraj et al., 1999).

خشکی باعث کاهش تجمع نیتروژن و کاهش عملکرد در لگم‌ها می‌شود. این کاهش به دلیل کاهش فعالیت نیتروژناز است که خود به دلایلی مانند محدودیت یا کاهش منابع کربن، کاهش اکسیژن و بازخورد خود تنظیمی حاصل از تجمع نیتروژن در اندام‌های هوایی باشد. تغییر در جریان آب در آوند آبکش باعث تغییر در فشار تورژسانس در برگ‌ها شده که این امر خود باعث تغیر شدید در فعالیت گره‌ها می‌شود. از طرفی اثر تنش خشکی جریان سیگنال نیتروژن همراه با تجمع نیتروژن در ساقه و گره‌ها را باعث می‌شود که خود می‌تواند باعث ممانعت از تثبیت نیتروژن در مراحل اولیه در خاک‌های خشک شود. وجود تفاوت‌های ژنتیکی رقم‌ها امکان افزایش تثبیت نیتروژن و مقاومت به شرایط خشکی را فراهم می‌کند.بر اساس نتایج به‌دست آمده، مقدار نیتروژن اندام هوایی و ماده خشک اندام هوایی می‌تواند به‌عنوان معیار مناسب برای مقایسه کارایی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گیرد. هم چنین معیار تعداد و وزن خشک گره همبستگی مثبت و معنی‌دار با میزان نیتروژن اندام هوایی دارند، در صورتی که وزن تر و خشک ریشه معیار مناسبی به شمار نمی‌آید و از این فاکتور نمی‌تواند جهت تعیین کارآیی جدایه باکتری برتر استفاده نمود (جدول۷).

جدول۷: ضریب همبستگی بین صفات اندازه گیری شده

صفات اندازه گیری شده	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
محتوانی نسبی آب(۱)	۱/۰۰۰							
وزن تر اندام هوایی(۲)	۰/٥٥٦*	۱/۰۰۰						
وزن خشک اندام هوایی(۳)	۰/۰۷۲۷**	۰/۸۹۰**	۱/۰۰۰					
وزن تر ریشه(٤)	۰/۷۸۹**	۰/٦۷۲**	۰/۷۹٦**	۱/۰۰۰				
وزن خشک ریشه(٥)	۰/۳۱٦*	۰/٦۰۹*	۰/٦۰٦**	۰/٤۹۷**	۱/۰۰۰			
میزان نیتروژن اندام هوایی(٦)	۰/٤۹٥**	۰/۹۳۱**	۰/۸۸۰**	۰/٦٥۲**	۰/٦٦٤**	۱/۰۰۰		
تعداد گره در بوته(۷)	۰/۳۸۰**	۰/۸۹۱**	۰/۷۸۰*	۰/٥٦۰**	۰/٦٥۹**	۰/۹٥٦**	۱/۰۰۰	
وزن خشک گره دربوته(۸)	۰/۳۸٦**0	۰/۸۸۱**	۰/.۷۹۰*	۰/٥۹٤**	۰/٦۸٦**	۰/۹٦۰*	۰/۹٤۰**	۱/۰۰۰

**. Correlation is significant at the 0.01 level
*. Correlation is significant at the 0.05 level

Farnia و همکاران (۲۰۰۷) نیز تعداد گره و نه اندازه گره را معیار مناسبی برای توان تثبیت جدایه‌های ریزوبیومی بیان کردند. همچنین در آزمایش گلخانه‌ای روی یونجه تحت شرایط کم آبی مشاهده کردند که وزن گیاه و مقدار نیتروژن در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های ریزوبیوم میلیلوتی در شرایط خشک بیشتر بود (Serraj et al., 1999). افزایش مقدار نیتروژن تثبیت شده تقریبا به‌طور خطی مقدار ماده خشک تولید شده را افزایش داد که خود به‌دلیل تولید سطح فتوسنتزکننده بیشتر و تولید و انتقال مواد فتوسنتزی بیشتر به ریشه می باشد و این خود می‌تواند بر تثبیت نیتروژن اثر تشدید کننده داشته باشد (Farnia et al., 2007; Khosravi, 2014; Lerki and Akhgar, 2014).

با اعمال تنش خشکی مقدار تثبیت نیتروژن و ماده خشک در گیاهانی از قبیل سویا، باقلا، نخود و نخود فرنگی کاهش می یابد(Farnia et al., 2007). کاهش تثبیت نیتروژن در جدایه‌های مختلف باکتری تحت تاثیر سطوح تنش خشکی و به خصوص در تنش شدید می‌تواند عمدتاً مربوط به آنزیم موجود در برگ

باشد که مسئول تجزیه محصولات تثبیت نیتروژن انتقال یافته از گره‌ها به برگ‌ها می‌باشد این آنزیم دارای حساسیت زیادی نسبت به کمبود آب است و فعالیت آن دچار اختلال می گردد، با کاهش فعالیت این آنزیم، اثر بازخوردی منفی روی فعالیت تثبیت نیتروژن دارد، در نتیجه تثبیت نیتروژن کاهش می‌یابد، اما مکانیسم آن به‌طور کامل مشخص نشده است. دلیل دیگری که می توان علت کاهش تثبیت نیتروژن با کاهش رطوبت خاک را توجیه نمود، کاهش تنفس سلول‌های ریشه و مخصوصا تنفس گره‌های موجود روی ریشه می‌باشد، با کاهش تنفس گره، انرژی مورد نیاز تثبیت نیتروژن کاهش می یابد و سبب کاهش تثبیت نیتروژن می‌گردد. کاهش بیش از ۲۰ درصد رطوبت گره، سبب توقف تثبیت نیتروژن می‌گردد و تنفس گره را به شدت کاهش می دهد، هم چنین تغییرات روزانه قابل توجهی در میزان تثبیت نیتروژن به وسیله گره سویا در رابطه با تغییرات مقدار رطوبت گزارش شده است (Farnia et al., 2007). به‌نظر می‌رسد که کاهش تثبیت نیتروژن در اثر خشکی گره، مربوط به کاهش تنفس گره به دلیل کمبود اکسیژن در باکتری‌ها می‌باشد، چنین کمبودی در اثر ایجاد یک مانع فیزیکی در ورود اکسیژن به گره به وجود می آید که در اثر بی‌میلی لگ هموگلوبین گره خشک نسبت به اکسیژن پدید می‌آید. این نظریه با توجه به این که اثرات منفی کمبود ر طوبت بر تثبیت نیتروژن و تنفس گره با افزایش غلظت اکسیژن در اطراف گره برطرف می‌شود مطرح می‌گردد (Farnia et al., 2007). تنش خشکی ملایم باعث کاهش تثبیت نیتروژن گردید، اما در تنش‌های متوسط و شدید، تثبیت نیتروژن کاهش شدیدی را نشان داد. به‌نظر می‌رسد کمبود رطوبت در حد متوسط سبب تغییرات ساختمانی از قبیل پارگی پلاسمودسماتا در بخش خارجی سلول‌های کورتکس گره‌های سویا می شود، این خسارت نه تنها در اثر تعرق بیش از حد گره به دلیل خشکی هوای خاک، بلکه در اثر جذب مواد مضر مانند نمک‌های در تماس با ریشه ایجاد می گردد (Farnia et al., 2007).

نتیجه‌گیری کلی

با کاهش میزان آب در برگ (محتوای نسبی آب) در اثر تنش خشکی مقدار نیتروژن اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی کاهش یافت. به‌طوری که با کاهش هر یک درصد میزان آب در اندام هوایی مقدار نیتروژن ۱/۵ درصد و مقدار عملکرد (وزن خشک اندام هوایی) به میزان ۱/٦ درصد کاهش می‌یابد. لذا در هنگام استفاده از مایه تلقیح‌های ریزوبیومی باید از جدایه‌های مقاوم به تنش خشکی استفاده نمود. در این تحقیق نیز اثر سطح تنش خشکی شدید روی برخی از اجزای اصلی سیستم همزیستی بررسی شد و در نهایت از بین ۲۱ جدایه، سه جدایه *Rlu07*، *Rlu15* و *Rlu20* از گونه *Rhizobium leguminosarun* دارای مقدار بیشتری نیتروژن و وزن خشک اندام هوایی بودند به‌عنوان جدایه‌های مقاوم گزارش شدند.

References

Abdi, H., Bihamta, M., Azizof. E., and Chogan, R. (2013). Investigating the levels of drought stress caused by polyethylene glycol (PEG 6000) on the components of seed rejuvenation and its relationship with drought tolerance indices in promising varieties and lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) Iranian Agricultural Research, 14(4): 582-596.

Alam, T., and Najam, L. (2022). Faba-Bean Antioxidant and Bioactive Composition: Biochemistry and Functionality. In Faba Bean: Chemistry, Properties and Functionality, (pp. 123-162). Springer, Cham.

Alikhani, H. A., Mohammadi, L. (2009). Investigating the salinity and drought tolerance of lentil symbiotic rhizobial isolates in rainfed conditions. Plant production technology, 10(1): 59-68.

Alizadegan, A., Hosseini Sarqin, S., and Jameei, R. (2014). investigating the effect of drought stress on antioxidant compounds in fava bean plant (*Vicia faba*), the second scientific research conference of biology and horticultural sciences of Iran, Tehran.

Ammar, M. H, F., Anwar, E. H., El-Harty, H. M., Migdadi, S. M., Abdel-Khalik, S. A., Al-Faifi, M., and Farooq and Alghamdi S. S. (2014). Physiological and yield responses of faba bean (*Vicia faba* L.) drought in a Mediterranean-type Environment. J Agro Crop Sci, 201: 280–287.

Beauchamp, C. J., Kloepper, J. W., Shaw, J. J. and Chalifour, F. P. (2001). "Root colonization of faba bean (*Vicia faba* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in the presence of nitrate-nitrogen," Canadian Journal of Microbiology, 47(12): 1068–1074. doi: 10.1139/cjm-47-12-1068.

Benmoussa, S., Nouairi, I., Rajhi, I., Rezgui, S., Manai, K., Taamali, W., Abbes, Z., Zribi, K., Brouquisse, R. and Mhadhbi, H. (2022). Growth Performance and Nitrogen Fixing Efficiency of Faba Bean (*Vicia faba* L.) Genotypes in Symbiosis with Rhizobia under Combined Salinity and Hypoxia Stresses. Agronomy, 12(3): p.606.

Bhattacharyya, P. N., and Jha, D. K. (2012). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence in Agriculture. World J Microbiol Biotechnol, 28(4): 1327-50.

Borucki, W., and Sujkowska, M. (2008). The effects of sodium chloride-salinity upon growth, nodulation, and root nodule structure of pea (*Pisum sativum* L.) plants. Acta Physiologiae Plantarum, 30(3): 293-301.

Burlyn, E., Michela and Merrill R. and Kaufmann (1973). The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Journal of Plant Physiology, 51: 914-916.

Chammakhi, C., Boscari, A., Pacoud, M., Aubert, G., Mhadhbi, H., and Brouquisse, R. (2022). Nitric Oxide Metabolic Pathway in Drought-Stressed Nodules of Faba Bean (*Vicia faba* L.). International Journal of Molecular Sciences, 23(21): p.13057.

Creus, C. M., Sueldo, R. J., and Barassi, C. A. (2004). Water relations and yield in Azospirillum-inoculated wheat exposed to drought in field.Can. Journal of Botany. 82: 273–281.

Creus, C. M., Sueldo, R. J., and Barassi, C. A. (1998). Water relations in Azospirillum - inoculated wheat seedlings under osmotic stress. Canadian Journal of Botany. 76: 238–244.

Elbagory, M., El-Nahrawy, S., and Omara, A. E. D. (2022). Synergistic Interaction between Symbiotic N2 Fixing Bacteria and Bacillus strains to Improve Growth, Physiological Parameters, Antioxidant Enzymes and Ni Accumulation in Faba Bean Plants (*Vicia faba*) under Nickel Stress. Plants, 11(14): p.1812.

Farnia, A., Noormohammadi, Q., and Naderi, A. (2007). Effect of drought stress on nodulation and nitrogen fixation of different races of Rhizobium japonicum in soybean. A new find in agriculture. second year, 2: 132-149.

Fesenko, A. N., Provorov, N. A., Orlova, I. F., Orlov, V. P., and Simarov, B.V. (1995). Selection of Rhizobium leguminosarum bv. viceae strains for inoculation of Pisum sativum L. cultivars: analysis of symbiotic efficiency and nodulation competitiveness. Plant Soil, 172: 189–198.

Gontia-Mishra, I, Sapre, S., Sharma, A., and Tiwari, S. (2015). Effect of plant growth-promoting Bacillus sp. on growth, antioxidant enzymes and DNA content of tomato seedlings under salt stress. Springerplus, 4:130

Guo, R., Silsbury, H., and Graham, R. D. (1992). Effect of four nitrogen compounds on nodulation and nitrogen fixation in faba bean, white lupine and medic plants. Australian Journal of plant physiology, 19: 501-508.

Hafeez, F. Y., Safdar, M. E., Chaudhury, A. U., and Malik, K. A. (2004). *Rhizobial* inoculation improves seedling emergence, nutrient uptake and growth of cotton. Australian Journal of Experimental Agriculture, 44: 617-622.

Hansen, A. P., and Choudhary, D. K. (2017). *Rhizobium Biology and Biotechnology*. doi: 10.1007/978-3-319-64982-5.

Joseph, B., Patra, R. R., and Lawrence, R. (2007). "Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.)," *International Journal of Plant Production*, 1(2): 141–151 ST–Characterization of plant growth pro.

Khosravi, H. (2014). Investigating some physiological characteristics of Rhizobium leguminosarum bv.viciae native to Iran. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 28(4): 513-523.

Laguerre, G., Louvrier, P., Allard, M. R., and Amarger, N. (2003). Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of Rhizobium leguminosarum biovar viciae for nodulation of host legumes. Applied and Environmental Microbiology, 69: 2276–2283.

Lalande, R., Blowaneza, P. C., Antoun, H. (1990). Symbiotic effectiveness of strains of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli from soils of Rawanda.Plant and Soil, 121: 41-46.

Lerki, S., and Akhgar, A. R. (2014). Effect of Sinorhizobium bacteria on growth, nodulation and nitrogen fixation in fenugreek plant. Journal of Soil Biology, 2(2): 137-148.

Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., and Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. Biotechnol Adv, 32(2): 429-48

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S., and Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. Biology and Fertility of Soils, 51(4): 403-415.

Prevost, D., and Antoun, H. (2008). Root nodule bacteria and symbiotic nitrogen fixation. In: Carter MR, Gregorich EG (eds), Soil sampling and methods of analysis (2nd edn). Boca Raton: CRC Press, 379–397.

Ramos, M. L. G., Gordon, A. G., Minchin, F. R., Sprent, J. I. and Parsons, R. (1999). Effects of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*phaseolus vulgaris* L.). Annals of Botany, 83(1): 57-63.

Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., and Holaday, A. S. (1990). Leaf water content and gas exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. Crop Sci, 30: 105-111.

Saghafi, D., Alikhani, H. A., and Motsharazadeh. (2013). Investigating plant growth stimulating properties of some rhizobial bacteria isolated from Iranian soils. Journal of Soil Management and Sustainable Production, 4(2): 131-150.

Serraj, R., Sinclair, T. R., Purcell, L. E. (1999). Symbiotic N2 fixation response to drought. Journal of Experimental Botany, 50:143-155.

Somasegaran, P., and Hoben, H. (1994). *Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology*. Springer Science & Business Media

Suarez, R.; Wong, A., Ramirez, M., Barraza, A., Orozco, M., Cevallos, M., Lara, M., Hernandez, G., and Iturriaga, G. (2008). Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6- phosphate synthase in rhizobia. Molecular plant microb interactions. Published by APS PRESS in cooperation with the International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, 21(7): 958-966.

Tahir, M., Mirza, M. S., Zaheer, A., Dimitrov, M. R., Smidt, H., and Hameed, S. et al. (2017). Synergistic Effects of Biochar and Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on the Growth and Physiology of *Oryza sativa* L. Front Plant Sci, 8:162.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M. L., Touraine, B., Moënne-Loccoz, Y., and Muller, D. et al. (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Front Plant Sci. 2013;4:356

Weir, B. (2006). Systematics, Specificity, and Ecology of New Zealand Rhizobia (Doctoral dissertation, The University of Auckland New Zealand).