جداسازی و شناسایی سودوموناسهای محرک رشد گیاه و تاثیر آنها بر عملکرد کلزا

هادی اسدی رحمانی[1]، نصرت اله منتجبی[2]، و احمد اخیانی[3]، احمد اصغرزاده[4]، کبری ثقفی[5]، ویدا همتی[6]، خدیجه اربابی[7] و اکرم اوتادی[8]

1-4- عضو هیئت علمی، موسسه تحقیقات خاک و آب

5-8 – کارشناس، موسسه تحقیقات خاک و آب

asadi_1999@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق از 23 سویه سودوموناس فلورسنت جدا شده از خاک ریزوسفری مزارع کلزا در استان تهران، 15 سویه سودوموناس جدا شده از ریزوسفر گندم و دو سویه رفرانس خارجی استفاده شد. صفات سویه‌های مذکور شامل تولید اکسین در دو محیط DF و TSB، تولید آنزیم ACC دآمیناز، حلالیت فسفاتهای معدنی در دو محیط جامد و مایع، تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن بررسی شد. اثرات تلقیح 40 سویه مورد آزمایش بر شاخص‌های رشدی کلزا در شرایط استریل مورد مطالعه و در مرحله بعد تاثیر تلقیح 14 سویه برتر سودوموناس فلورسنت بر رشد و میزان جذب عناصر غذایی در کلزا ارزیابی شد. در پایان اثرات 9 سویه منتخب بر رشد و عملکرد کلزا در استانهای اصفهان، سمنان و گلستان مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که سویه های برتر دارای توان متفاوتی در تولید مواد تنظیم کننده رشد گیاه بودند. در آزمایش گلخانه ای تلقیح گیاهان سبب افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه و نیز جذب نیتروژن، فسفر، پتاسیم، آهن، روی و مس گردید. در آزمایش مزرعه ای باکتریهای مورد مطالعه توانستند رشد و عملکرد گیاه را افزایش دهند. در مجموع سویه R168 بیشترین تاثیر را بر رشد گیاه بر جای گذاشت.

کلمات کلیدی: کلزا، باکتریهای محرک رشد، سودوموناس، عملکرد

مقدمه

با توجه به اهمیت کلزا در تامین روغن کشور و با عنایت به اینکه کشور ما یکی از بزرگترین واردکنندگان روغن در جهان می‌باشد، هر تلاش برای افزایش عملکرد و بهبود خصوصیات کیفی این محصول می تواند در صرفه جویی ارزی و افزایش درآمد ناخالص ملی کمک نماید. سطح زیر کشت این محصول از میزان 5000 هکتار در سال زراعی 78-1377 به 270000 هکتار در سال زراعی 85-1384 رسیده است. فواید استفاده از کودهای بیولوژیک به لحاظ صرفه جویی در مصرف کودهای شیمیایی و نیز حفظ محیط زیست ، ضرورت تحقیق در این زمینه را مشخص می سازد. قیمت اندک کودهای بیولوژیک و توان ساخت آنها در داخل کشور از دیگر جنبه های مفید آنها می‌باشد. میکروارگانسم‌های ریزوسفری به سه گروه مفید، مضر و بی‌اثر طبقه‌بندی می‌شوند (Whipps، 2001). انواعی که بطور مستقیم یا غیر مستقیم اثرات مفیدی بر روی رشد گیاهان اعمال می کنند به نام باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria=PGPR) معروفند (Asghar و همکاران، 2004). باکتریهای محرک رشد گیاه از طریق مکانیسم های مختلفی بطور مستقیم و یا غیر مستقیم در افزایش رشد و عملکرد گیاه ایفای نقش می نمایند. افزایش حلالیت عناصر غذایی کم محلول مانند فسفر (Rashid و همکاران، 2004)، تثبیت نیتروژن (Dobbelaere و همکاران، 2003)، تولید سیدروفور (O'Sullivan و O'Gara، 1992)، تولید ACC-دآمیناز (Penrose و Glick، 2003) و تولید هورمونهای محرک رشد گیاهی (Bent و همکاران 2001) از مکانیسم های مستقیمی است که باکتریهای محرک رشد سبب افزایش رشد گیاهان می‌شوند. ریحانی تبار (1379) با جداسازی باکتریهای سودوموناس فلورسنت (دو گونه فلورسنس و پوتیدا) از خاکهای زراعی استان تهران و شناسایی، به مطالعه تاثیر تلقیح گندم با این باکتریها در دو خاک استریل و غیر استریل پرداختند و مشاهده کردند که پاسخ گندم به تلقیح در اکثر موارد مثبت بوده و این باکتریها سبب افزایش معنی دار در ارتفاع گیاه، تعداد خوشه و پنجه شدند. جلیلی (1386) با جداسازی و مطالعه سودوموناسهای فلورسنت تولیدکننده ACC-دآمیناز از ریزوسفر گندم نشان داد که این

باکتریها در کاهش اثرات شوری در کلزا موثر هستند. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی سودوموناسهای فلورسنت از ریزوسفر کلزا و بررسی خصوصیات محرک رشدی این باکتریها و اثرات تلقیح این باکتریها بر رشد و عملکرد کلزا بود.

مواد و روشها

به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس از ریزوسفر کلزا، 20 نمونه خاک ریزوسفری از مزارع کرج تهیه و به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از تهیه سوسپانسیون از خاک، بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت KingB پخش گردید. پلیت‌ها پس از 24 الی 48 ساعت رشد در دمای 28^oC با استفاده از لامپ UV بررسی و کلونی‌های با خاصیت پرتوافشانی (فلورسنس) با کشت مجدد روی همان محیط جداسازی شدند. در این تحقیق، علاوه بر سویه های جدا شده از ریزوسفر کلزا، 15 سویه جدا شده از ریزوسفر گندم و دو سویه خارجی GRP3 و MPFM از کلکسیون میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب نیز مورد آزمایش قرار گرفتند. سویه‌های جدا شده از ریزوسفر گندم عبارت بودند از R_1، R_{30}، R_{41}، R_{69}، R_{112}، R_{143}، R_{150}، R_{159} و R_{168} از گونه‌های ***Pseudomonas putida*** و R_{26}، R_{36}، R_{93}، R_{99}، R_{173}، R_{187} که به گروه ***Pseudomonas fluorescens*** تعلق داشتند. GRP3 و MPFM1 از گونه ***Pseudomonas aeruginosa*** بودند. در مجموع برای انجام آزمون‌های بعدی، 40 سویه مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی جدایه‌ها آزمون‌های واکنش گرم (Gram)، بررسی شکل ظاهری باکتری، کاتالاز (Catalase)، اکسیداز (Oxidase)، تحرک در محیط نیمه جامد (Motility)، ذوب ژلاتین (Gelatin liquefaction)، رشد در دمای 41^oC، هیدرولیز آرژینین (Arginine dihydrolase)، تولید لوان (Levan)، نیترات‌زدایی (Denitrification) و استفاده از قندهای ترهالوز (Trehalose) و ل-آرابینوز (L-arabinose) انجام گرفتند (Vlassak و همکاران، 1992؛ Bossis و همکاران، 2000). مقدار تولید اکسین توسط هر یک از جدایه‌های مورد آزمایش، با استفاده از دو محیط DF (Patten و Glick، 2002) و TSB (Bent و همکاران، 2001)، اندازه‌گیری شد. آزمون توان تولید آنزیم ACC دِآمیناز به روش Amico و همکاران (2005) با کمی تغییرات انجام گرفت. اندازه‌گیری توان حل فسفات‌های معدنی در محیط جامد (Rashid و همکاران، 2004)،اندازه‌گیری میزان انحلال فسفات در محیط مایع(Jeon و همکاران، 2003)، توان تولید سیانید هیدروژن (Donate-Correa و همکاران 2004)،مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی اثرات تلقیح کلزا با سویه‌های مورد آزمایش با دو آزمون: **کشت** گیاه در شرایط استریل با 40 سویه باکتری در لوله حاوی شن استریل و کاشت بذرهای استریل کلزا و ابیاری با محلول غذایی (Tolay و همکاران، 2001) و آزمون گلخانه‌ای با استفاده از 14 سویه برتردر آزمون اول در گلدان انجام شد. پس از برداشت گیاهان، وزن تر و خشک اندام هوایی، میزان نیتروژن، فسفر، آهن، منگنز، مس و روی بخش هوایی اندازه‌گیری شدند. کلیه نتایج این مرحله با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و میانگین‌ها به روش دانکن گروه‌بندی شدند. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند. آزمایشات مزرعه‌ای با 9 سویه باکتری انتخابی از مراحل اول و دوم در استانهای اصفهان، سمنان و گلستان در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با تیمارهای آزمایشی شامل 9 سویه باکتری و یک تیمار شاهد (بدون تلقیح) در چهار تکرار انجام شد. در پایان وزن تر کل اندام هوایی (ساقه، برگ، غلاف و دانه) در واحد گیاه، طول غلاف، تعداد دانه در غلاف، تعداد غلاف در هر بوته و وزن غلاف با دانه و عملکرد دانه نیز اندازه‌گیری با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفت.

نتایج

از کل 20 نمونه خاک ریزوسفری ارقام کلزا در مناطق ذکر شده 23 جدایه منتسب به گروه سودوموناس‌های فلورسنت بودند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد کـه 48% سـویه‌هـا ***Pseudomonas putida*** ، 35% ***Pseudomonas***

fluorescens و 17% *Pseudomonas fluorecens/putida* بودند. این نتایج نشان داد که *Pseudomonas putida* درصد بالایی از سودوموناس‌های فلور سنت ریزوسفرکلزا را تشکیل می‌دهد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر غلظت-های مختلف تریپتوفان در تولید اکسین نشان داد که افزایش تریپتوفان در هر دو محیط غنی TSB و حداقل DF باعث افزایش تولید اکسین شد. نتایج بررسی توان مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن نشان داد که چهار سویه R1، P10، R150 و R159 توانستند به خوبی در محیط DF حاوی ACC رشد کنند و سویه R1 بهترین سویه در مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن بود. نتایج حاصل از ارزیابی تولید سیدروفور نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید آن را داشتند. نتایج ارزیابی توان تولید سیانیدهیدروژن نشان داد که30/ درصد از سویه‌های جدا شده از ریزوسفر کلزا و 33/33 درصد از سویه‌های جدا شده از ریزوسفر گندم توانستند سیانید هیدروژن تولید کنند. نتایج حاصل از کاربرد 40 سویه مذکور در شرایط استریل نشان داد که این سویه‌ها باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی (تا 53/7%)، وزن خشک ریشه (تا 47/8%)، طول ریشه (تا 21/6%)، طول اندام هوایی (تا 17/7%)، وزن تر اندام هوایی (تا 52/5%)، وزن تر ریشه (تا 56/5%)، نسبت اندام هوایی به ریشه در حالت خشک (تا 20/3%) و نسبت اندام هوایی به ریشه در حالت‌تر (تا 20/3%) شدند. نتایج آزمون اثرات محرک رشد سویه‌ها بر شاخص‌های رشد کلزا و جذب عناصر غذایی در شرایط گلخانه‌ای نشان داد که 14 سویه برتر انتخاب شده برای انجام این آزمون، تاثیر معنی-داری بر وزن تر و خشک اندام هوایی و جذب عناصر غذایی توسط گیاه داشتند و در مقایسه با شاهد تلقیح نشده، باعث افزایش وزن تر اندام هوایی (تا 30/21%)، وزن خشک اندام هوایی (تا 27/55%) و همچنین جذب عناصر غذایی شامل نیتروژن (تا 26/54%)، فسفر (تا 28/24%)، پتاسیم (تا 25/81%)، آهن (تا 100/19%)، روی (تا 64/66%)، منگنز (تا 70/78%) و مس (تا 70/33%) شدند. در مجموع سویه R187 چه از نظر افزایش شاخص‌های رشد گیاهی و چه از نظر افزایش جذب عناصر توسط گیاهان موثرترین وکارامدترین سویه بود. نتایج مزرعه ای در استان سمنان نشان داد که اثر سویه های مختلف باکتری در سطح آماری 5% بر عملکرد و در سطح آماری 1% بر ارتفاع بوته موثر بوده است. سویه P19 با 2220 کیلوگرم در هکتار بیشترین عملکرد و بیشترین افزایش ارتفاع بوته به میزان 111/5 سانتیمتر را دارا بوده و در گروه اول آماری قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین عملکرد دانه در استان اصفهان نشان میدهد که بین سویه های باکتری و تیمار شاهد اختلاف معنی دار وجود نداشت. با این حال اکثر باکتریهای مورد استفاده سبب افزایش عملکرد نسبت به تیمار شاهد شدند. بیشترین عملکرد از سویه های R_{168} و R_{112} که به ترتیب، 4535 و 4392 کیلوگرم در هکتار بود بدست آمد.

جدول 1- نتایج تاثیر تلقیح بر عملکرد دانه در استان های سمنان و اصفهان

تیمار	سمنان	اصفهان
P23	2035 AB	4004 A
R168	2087 AB	4535 A
R187	1904 AB	4187 A
P9	1526 B	4257 A
R112	2026 AB	4392 A
R1	1937 AB	4291 A
R30	1524 B	4326 A
R159	1654 AB	3869 A
P19	2220 A	4249 A
Control	1553 B	4006 A

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که بسیاری از باکتریهای ریزوسفری از جنس سودوموناس توان اعمال خصوصیات مفید از قبیل تولید هورمونهای محرک رشد گیاه، تولید سیدروفور، حل کنندگی فسفاتهای نامحلول را دارا می باشند. کاربرد باکتریهای برتر توانست در شرایط درون شیشه ای و گلخانه ای شاخص های رشد گیاه و جذب عناصر غذایی را افزایش دهد. باکتریهای برتر انتخاب شده توانستند در شرایط مزرعه ای سبب افزایش رشد و عملکرد گیاه شوند. باکتری R_{168} برترین باکتری مورد استفاده بود که عملکرد دانه را به ترتیب 34 و 13 درصد در استانهای سمنان و اصفهان افزایش داد.

فهرست منابع

جلیلی ف، 1386. بررسی توانایی تولید ACC دآمیناز توسط سودوموناسهای فلورسنت بومی ایران و تاثیر بعضی از سویه های منتخب در تعدیل اثرات مضر شوری در کشت کلزا. پایا نامه دکتری دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

ریحانی تبار، ع. 1379. بررسی فراوانی سودوموناسهای فلورسنت در خاکهای زراعی استان تهران. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران

Amico ED, Cavalca L and Andreoni V, 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-risistant, potentially plant growth-promoting bacteria. FEMS Microbiology Ecology 52: 153-162.

Asghar HN, Zahir ZA and Arshad M, 2004.Screening rhizobacteria for improving the growth ,yield,and oil cotent of canola (*Brassica napus* L.).Australian Journal of Agricultural Research 55:187-194.

Bent E, Tuzan S, Chanway CP and Enebak S, 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology 47:793-800.

Bossis E, Lemanceau P, Latour X and Gradan L, 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: Current status and need for revision.Agronomy 20:51-63.

Dobbelaere S, Vanderleyden J and Okon Y, 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences 22:107-149.

Donate-Correa J, Leon-Barrios M and Perez-Galdona R, 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. Plant and Soil, 266:261-272.

Jeon JS, Lee SS, Kim HY, Ahn TS and Song HG, 2003. Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganism. Journal of Microbiology 41:271-276.

O,Sullivan DJ and O,Gara F, 1992. Traits of Pseudomonas fluorescens spp. Involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological Reviews 56:662-676.

Patten CL and Glick BR, 2002. Role of *pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of host plant root system.Applied and Environmental Microbiology 68:3795-3801.

Penrose DM and Glick BR, 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiology of Plant 118:10-15.

Rashid MS, Khalil N, Ayub S and Latif F, 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions.Pakistan Journal of Biological Sciences 7:187-196.

Tolay I, Erenoglu B and Cakmakci I, 2001. Phytosiderophore release in Aegilopsis and Triticum species under zinc and iron deficiencies. Journal of Experrimental Botany 52:1093-1097.

Vlassak K, Vanholm L, Duchateau L, Vanderleyden J and Demot R, 1992. Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads associated with the roots of rice and banana grown in sri lanka.Plant and Soil, 145:51-63.

Whipps JM, 2001. Microbiol interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experrimental Botany 52: 487-511.