مقایسه تنوع عملکردی باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری نهال‌های پسته

فاطمه حجت‌نوقی[1]، عبدالرضا اخگر[2]، عیسی اسفندیارپور[2]، کاظم خاوازی[3]
1- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه ولی‌عصر (عج)رفسنجان
2- استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه ولی‌عصر (عج)رفسنجان
3 – استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک وآب
F_hojjat90@yahoo.com

چکیده
به منظور مقایسه تنوع عملکردی باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری نهال‌های پسته از یک خاک غیرشور با بافت متوسط استفاده گردید. پس از گذشت دو ماه از کشت، جدایه‌ها از نظر برخی صفات محرک رشد گیاه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد فراوانی جدایه‌های ریزوسفری نسبت به غیرریزوسفری از نظر تولید IAA و تثبیت نیتروژن بیشتر بود. لیکن در توانایی حل فسفات‌های معدنی بین جدایه‌ها تفاوتی وجود نداشت و کلیه جدایه‌ها قادر به انحلال فسفات‌های معدنی بودند. در مورد تولید سیدروفور تعدادی از جدایه‌ها آن هم به مقدار کم توانایی نشان دادند. لیکن تعداد آن‌ها در ریزوسفر بیشتر بود.

کلمات کلیدی: تنوع عملکردی، ریزوسفر، غیرریزوسفر، PGPR

مقدمه

ریزوسفر به لایه نازک 1 الی 2 میلی‌متری خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که بسته به شکل هندسی ریشه گیاهان بخش قابل ملاحظه‌ای (5 الی40 درصد) از خاک موجود در اطراف سیستم ریشه‌ای گیاه را تشکیل می‌دهد (Boven & Rovira, 1999). مواد ترشح شده از ریشه‌ها شامل مواد آلی با وزن مولکولی زیاد وکم که می‌توانند همراه با فاکتورهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیک، جمعیت و فعالیت میکروبی در ناحیه ریزوسفر را نسبت به توده خاک افزایش دهند(Brimecombe *et al*., 2001) . باکتری‌های ریزوسفری که می‌توانند از طریق مکانسیم‌های مختلف باعث افزایش رشد گیاه شوند به باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه PGPR معروف می‌باشند (Davison, 1988). باکتری‌های PGPR می‌توانند از طریق مکانیسم‌هایی شامل تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید سیدروفور، تولید هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین، سیتوکینین، جیبرلین، افزایش فسفر قابل دسترس، تثبیت نیتروژن، تولید آنزیم ACC– دآمیناز و در نتیجه افزایش تحمل گیاه به شوری ،عناصر سنگین و آفت کش‌ها در گیاه موجب افزایش رشد گیاه شوند (Glick *et al*., 1999). در این پژوهش، جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری نهال‌های پسته از نظر تولید IAA، تثبیت نیتروژن، توانایی حل فسفات‌های معدنی و تولید سیدروفور مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

1) کشت نهال‌های پسته:

بدین منظور، از یک خاک با بافت لومی‌شنی و شوری معادل 1 دسی‌زیمنس بر متر استفاده شد. خاک مورد نظر، پس از هوا خشک‌کردن، کوبیدن و الک‌کردن (با الک دو میلی‌متر) به گلدان 2/5 کیلوگرمی منتقل شد. به‌منظور کشت نهال پسته، از بذرهای پسته رقم بادامی زرند استفاده شد که پس از جداسازی پوست سخت آن‌ها، ضدعفونی سطحی شدند. برای انجام ضدعفونی، بذرها به مدت 10 دقیقه در محلول 10% هیپوکلرید سدیم نگهداری و با آب مقطر استریل

چندین مرتبه (8 تا 10 بار) شست‌وشو و به مدت 24 ساعت در یک لیتر آب مقطر استریل نگهداری شدند. آن‌گاه بذرها بر روی محیط واترآگار[1] به مدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سلسیوس قرار داده شدند تا جوانه‌دار شوند. در نهایت، بذرهای جوانه‌دار در خاک گلدان‌ها کشت گردیدند و برای مدت دو ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند.

2) جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری:

پس از گذشت دو ماه از کشت نهال‌های پسته، 10 گرم از ریشه‌ها به همراه خاک ریزوسفری اطراف آن‌ها و همچنین 10 گرم از خاک غیرریزوسفری به‌طور جداگانه به ارلن 250 میلی‌لیتری حاوی 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم 0/85 درصد) منتقل و برای مدت 20 دقیقه بر روی شیکر با دمای 28 درجه سلسیوس و 120 دور در دقیقه تکان داده شدند. سپس از ارلن‌های مذکور رقت‌های مختلف (10^2 تا 10^5) تهیه و مقدار 0/1 میلی‌لیتر از هر رقت بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت NA[2] پخش گردید. پس از 48 ساعت از رشد باکتری‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس، پلیت‌های تلقیح شده که دارای 30 تا 100 کلنی بودند انتخاب و تمامی‌کلنی‌های رشدیافته در پلیت با چند بار کشت متوالی خالص‌سازی شدند و پس از حصول اطمینان کامل از خلوص باکتری‌ها، تا زمان استفاده بعدی بر روی محیط کشت شیب‌دار در یخچال و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (25 جدایه ریزوسفری و 23 جدایه غیرریزوسفری).

تعیین برخی خصوصیات مهم محرک رشد گیاه:

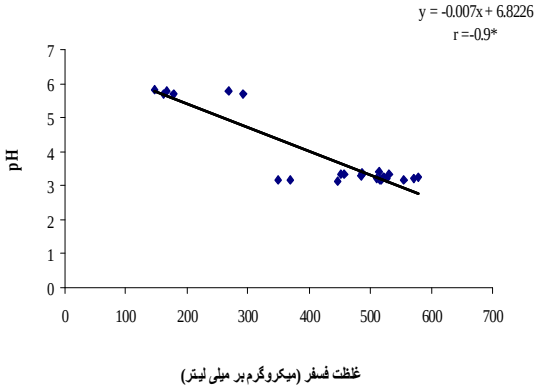
پس از جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری، برخی از خصوصیات مهم محرک رشد جدایه-ها شامل توانایی تولید IAA ، توانایی در تثبیت نیتروژن، توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول و تولید سیدروفور اندازه‌گیری شدند. توانایی تولید IAA جدایه‌ها با استفاده از روش Bent و همکاران (2001) با کمی تغییرات و توانایی تثبیت نیتروژن جدایه‌ها با استفاده از محیط کشت بدون نیتروژن رنی (Rennie, 1980) درون لوله(به صورت مایع) انجام گرفت.جهت بررسی توان حل فسفات‌های معدنی جدایه‌ها از محیط کشت Sperber (1958) استفاده شد. برای تعیین روش مناسب در ارزیابی توان جدایه‌ها در تولید سیدروفور ابتدا آزمون گرم انجام و جدایه‌های گرم منفی و گرم مثبت تفکیک , سپس با استفاده از محیط کشت CAS Blue Agar مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه‌های گرم منفی به روش سنجش عمومی CAS یا کشت مستقیم (Alexander & Zuberer, 1991) و جدایه‌های گرم مثبت به روش پیشنهادی میلاگرس یا کشت نیمانیم اندازه‌گیری شدند (Milagres *et al*., 1999) .

نتایج و بحث

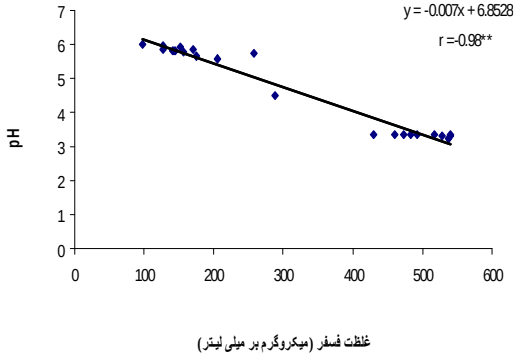
نتایج حاصل از مقایسه جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری در خاک مورد مطالعه از نظر تولید IAA، تثبیت نیتروژن، توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول و تولید سیدروفور نشان داد که توانایی جدایه‌های ریزوسفری در خاک مورد مطالعه نسبت به جدایه‌های غیرریزوسفری از نظر تولید صفات محرک رشد گیاه بیشتر بوده، به‌طوری‌که فراوانی جدایه-های ریزوسفری از نظر تولید IAA، تثبیت نیتروژن و توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول به ترتیب 60، 64 و 100 درصد و فراوانی جدایه‌های غیرریزوسفری به ترتیب 47/8، 17/4 و 100 درصد بود. همچنین بین pH و مقدار فسفر آزادشده در سوسپانسیون جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری همبستگی منفی و معنی‌داری بدست آمد (شکل‌های 1 و 2). نتایج آزمون گرم نشان داد 32 درصد جدایه‌های ریزوسفری و 8/7 درصد جدایه‌های غیرریزوسفری گرم منفی و مابقی جدایه‌ها گرم مثبت بودند و از نظر تولید سیدروفور تعدادی از جدایه‌های ریزوسفری(48%) و غیرریزوسفری(13%) آن هم

1- Water-Agar
2 - Nutrient agar

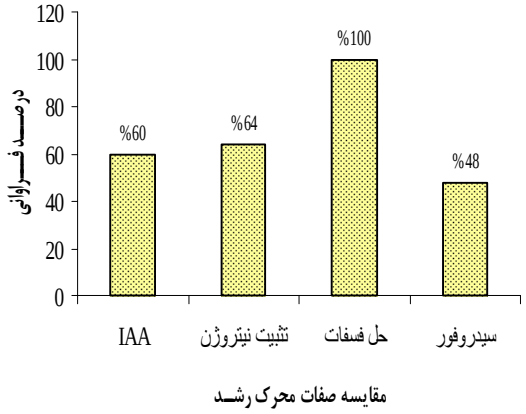
به مقدار کم توانایی نشان دادند (شکل‌های 3 و 4) . شکل 5 درصد فراوانی جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری خاک مورد مطالعه را در تولید IAA، توان تثبیت نیتروژن، توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول و تولید سیدروفور نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود به‌جز در مورد توان حل فسفات‌های معدنی که فراوانی باکتری‌ها از این حیث یکسان و معادل 100% بود، جمعیت باکتری‌ها با خصوصیات دیگر محرک رشد در خاک ریزوسفری نسبت به خاک غیرریزوسفری بیشتر است، به‌نظر می‌رسد وجود ترشحات ریشه‌ای حاوی ال- تریپتوفان و سایر اسیدهای‌آمینه و نیز حضور مقادیر فراوان هیدرات‌های کربن در ناحیه ریزوسفری باعث افزایش فراوانی جدایه‌های قادر به تولید IAA و تثبیت نیتروژن و حتی سیدروفور بود.



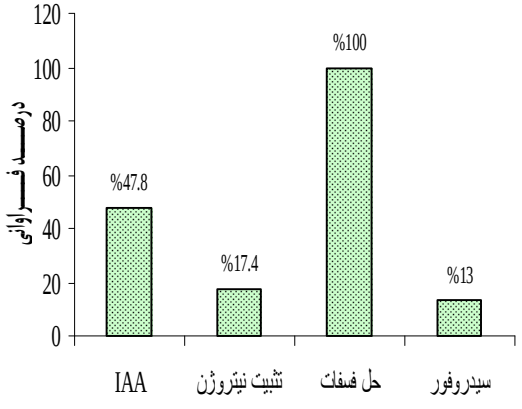
شکل 1- همبستگی بین pH محیط رشد جدایه‌های ریزوسفری با غلظت فسفر آزاد شده



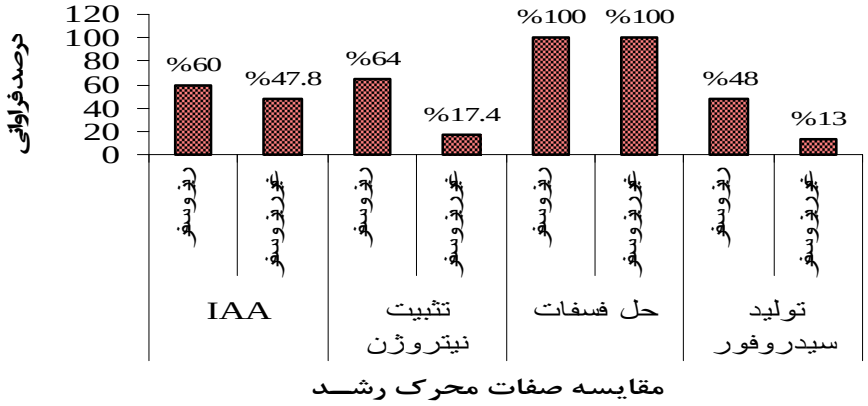
شکل 2- همبستگی بین pH محیط رشد جدایه‌های غیرریزوسفری با غلظت فسفر آزاد شده



شکل 3- درصد فراوانی جدایه‌های ریزوسفری در خاک مورد مطالعه



شکل 4- درصد فراوانی جدایه‌های غیرریزوسفری در خاک مورد مطالعه



شکل 5- درصد فراوانی جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری خاک مورد مطالعه

منابع:

.Alexander DB and Zuberer DA, 1991. Use of chrome azurol Sreagents to evauatesiderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil. Soils, 2:39- 4.

Bent E, Tuzan S, Chanway CP and Enebak S, 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgeple pines inoculatied with rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 47: 793- 800.

Boven GD and Rovira AD, 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. Adv. Agron. 66:1-102.

Brimecomb MJ, Delelj FA and Lynch JM, 2001. The rhizosphere. The effect of root exudates on rhizosphere microbil populations. In: Rinton, R, Varanini Z and Nannipieri P (eds.). The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil- Plant Interface. Marcel Dekker, New York, Pp 95- 140.

Davison J, 1988. Pant beneficial bacteria. Biotec. 6:282-286.

Glick BR, Patten CL, Holguin G and Penrose DM, 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial college press, London, UK.

Milagres AMF, Machuca A and Napoleao D, 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrom azurol S (CAS) agar plate assay. J. Microbiol. Methods, 37: 1-6.

Rennie RJ, 1980. A single medium for the isolation of ecetylene-reducting (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. Can. Microbiol. 27:8-14.

Sperber JI, 1958. Incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. Aust. J. Agr. Res. 9: 778-781.