دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران
تبریز، 12 الی 14 شهریور 1390
(بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک)

بررسی تاثیر کاربرد باکتری‌های جنس فلاوباکتریوم بر رشد و عملکرد گندم در مناطق مختلف کشور

هادی اسدی رحمانی[1]، جلال قادری[2]، پیمان کشاورز[3]، حسن حقیقت نیا[4]، کامران میرزاشاهی[5]، محمود رضا رمضانپور[6]، علی چراتی آرایی[7]، فرهاد تقی پور[8]،کاظم خاوازی[9]، میترا افشاری[10]، ویدا همتی[11] و ندا علیزاده[12]

1-10- عضو هیئت علمی، موسسه تحقیقات خاک و آب
11،12 – کارشناس، موسسه تحقیقات خاک و آب
asadi_1999@yahoo.com

چکیده

در این تحقیق، ابتدا 90 نمونه خاک از ریزوسفر گیاه گندم از استانهای مختلف کشور تهیه و سپس 44 باکتری فلاوباکتریوم از آنها جداسازی و خالص سازی شده و سپس صفات محرک رشدی این باکتریها شامل توان حلالیت فسفاتهای نامحلول، تولید اکسین، تولید آنزیم Acc-deaminase، سیدروفور، اسید سالیسیلیک و کیتیناز مورد اندازه گیری قرار گرفت. نتایج بررسی صفات محرک رشد گیاهی در این باکتری‌ها نشان داد که هیچکدام از جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور، اسید سالیسیلیک، آنزیم کیتیناز و همچنین قدرت استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن را نداشتند. ویژگی تولید سیانید هیدروژن جدایه‌های مورد مطالعه همگی مثبت ولی از پایین‌ترین شدت ممکن (درجه 1) برخوردار بود. تعداد 34 جدایه از جدایه‌های مورد بررسی نیز از قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی نامحلول برخوردار بودند. کلیه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید اکسین را داشتند. با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری این صفات هفت جدایه F9, F11, F20, F21, F22, F34, F40 به عنوان جدایه‌های برتر انتخاب گردیدند و اثر آنها بر صفات رشدی گندم رقم چمران در شرایط گلخانه ای مورد آزمایش قرار گرفت. بر اساس نتایج آزمون گلخانه‌ای چهار جدایه F9, F11, F21, F40 در آزمایش‌های مزرعه‌ای در کنار تیمار شاهد تلقیح نشده در استانهای فارس، کرمانشاه، مازندران، خراسان رضوی و صفی آباد دزفول مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جدایه های مورد استفاده در اکثر استانها سبب افزایش رشد و عملکرد گندم شدند.

کلمات کلیدی: **فلاوباکتریوم، گندم، تلقیح، صفات محرک رشد**

مقدمه

ریزوسفر به لایه نازکی (معمولاً یکی الی سه میلی‌متر) از خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه (نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای) قرار دارند (Boven و Rovira، 1999). باکتری های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) به گروه نا متجانسی از باکتری‌های ریزوسفری اطلاق می‌شود که با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص موجب بهبود شاخص‌های رشد و نمو گیاه می‌گردند (Kloepper و همکاران، 1989).

بطورکلی باکتری‌های محرک رشد گیاه به دو روش مستقیم و غیرمستقیم بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارند (Glick، 1995). در روش مستقیم این باکتری‌ها با روشهایی مانند سنتز تنظیم کننده های رشد (Patten و Glick، 2002)، سیدروفور (Loper و Henkels، 1999)، آنزیم ACC- دِآمیناز (Penrose و Glick، 2003) و افزایش حلالیت فسفاتهای نامحلول (Raju و Reddy، 1999) باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند.

در روش غیرمستقیم باکتری‌های محرک رشد گیاه، اثرات مضر عوامل بیماری‌زا را در ریزوسفر با تولید مواد مختلف (از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن و ...) یا افزایش مقاومت گیاه میزبان نسبت به عوامل بیماری‌زا، خنثی یا تعدیل می‌کنند (Glick ، 1995).

امروزه باکتری‌های مختلفی از قبیل Acetobacter, Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter, Rhizobium, Enterobacter, Bacillus, Burkholderia, Erwinia, Serratia, وFlavobacterium در فهرست باکتریهای محرک رشد گیاه قرار دارند (Glick ، 1995).

باکتری‌های جنس فلاوباکتریوم هوازی، گرم منفی، متقارن و میله ای به طول 3-1 میکرومتر و پهنای 0/5 میکرومتر می‌باشند. این باکتری‌ها فاقد گرانول‌های پلی-بتا هیدروکسی بوتیرات، اندوسپور و فلاژل هستند. این باکتری‌ها هنگام رشد در محیط جامد رنگدانه‌های زرد تا نارنجی رنگ تولید می‌کنند. کلونی این باکتری‌ها نیمه شفاف (گاها کدر)، گرد(با قطر 2-1 میلی متر)، محدب، صاف و درخشان با لبه‌های کامل می‌باشند.

گونه‌های شناخته شده در این جنس ***F.meningosepticum F.aquatile ,F.breve ,F.baslustinum*** ***F.multivorum ,F.odoratum*** و **F.*spiritivorum*** می‌باشند (Holmes et al.,1984; Holmes,1991).

گزارشاتی مبنی بر توان باکتریهای جنس Flavobacterium در بهبود رشد و عملکرد گیاهان وجود دارد (Asghar et al., 2004) ولی تحقیقات زیادی در خصوص صفات محرک رشد گیاهی این باکتری‌ها و تاثیر آنها بر رشد و نمو گیاهان صورت نگرفته است. Belimov و همکاران (2004) نشان دادند که طول ریشه گیاهچه‌های کلزا در اثر تلقیح با جدایه Flavobacterium sp P-4 5 در حضور یاعدم حضور غلظت‌های بالای کادمیم افزایش یافت. Pishchick و همکاران(2002) نشان دادند که جدایه Flavobacterium sp L30 باعث افزایش طول ریشه گیاهچه‌های جو و افزایش محصول تحت در خاک‌های آلوده به کادمیم گردید.

این تحقیق به منظور جداسازی، بررسی صفات محرک رشدی و تاثیر جدایه های منتخب فلاوباکتریوم در افزایش رشد و عملکرد گندم در شرایط گلخانه ای و مزرعه ای انجام شد.

مواد و روشها

به منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری گندم شامل سودوموناس‌های فلورسنت و فلاوباکتریوم، تعداد 90 نمونه خاک ریزوسفری (شامل ریشه‌های کامل گندم) از مزارع گندم واقع در استان‌های اردبیل، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، زنجان، تهران، همدان و کردستان تهیه گردید.

برای جداسازی باکتریها از محیط کشت اختصاصی برای فلاوباکتریوم با ترکیب زیر (Flavobacterium Isolation Media) FIM استفاده شد (Holmes et al.,1984; Holmes,1991).

کازئین هیدرولیز شده 2گرم، پروتئوز پپتون 4 گرم، کلرو سدیم 3 گرم، عصاره گوشت 2 گرم، سولفات منیزیم 0/1 گرم، عصاره مخمر 0/5 گرم، آگار 18- 15 گرم، آب‌مقطر 1000 میلی‌لیتر و pH 7/4 – 2/ 7.

برای شناسایی جدایه‌های فلاوباکتریوم از آزمون‌های گرام، کاتالاز، اکسیداز، فسفاتاز، OF و تحرک استفاده شد (Holmes et al.,1984; Holmes,1991).

پس از بررسی نتایج آزمون‌های مذکور جدایه‌های با مشخصات گرام منفی، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، فسفاتاز مثبت، متابولیسم اکسایشی (تنفسی)، غیر متحرک و ایندول مثبت به عنوان جدایه‌های فلاوباکتریوم انتخاب شدند.

صفات محرک رشدی باکتریها شامل توان تولید اکسین (Patten and Glick, 2002)، حل کنندگی فسفاتهای نامحلول (Vasquez et al., 2000)، توان تولید آنزیم ACC -deaminase (Amico et al., 2005)، توان تولید سیدروفور (Alexander and Zuberer, 1991) و توان تولید سیانید هیدروژن (Donate-correa et al. , 2004) مورد سنجش قرار گرفتند.

اثر تلقیح هفت سویه برتر بر مرفولوژی و طول ریشه گندم، در یک آزمون درون لوله ای و اثر این باکتریها بر صفاتی مانند تعداد پنجه، تعداد خوشه، طول ساقه، طول خوشه، وزن کاه وکلش، وزن خوشه، تعداد دانه و وزن هزار دانه در یک آزمایش گلخانه ای بررسی شد.

به منظور بررسی اثر بخشی تلقیح باکتریهای منتخب بر رشد و عملکرد گندم، آزمایشاتی در استان‌های خراسان رضوی، خوزستان (صفی‌آباد دزفول)، فارس (داراب)، مازندران (ساری)، کرمانشاه و سمنان انجام شد. آزمایش به صورت طرح بلوک‌های کامل تصادفی با 5 تیمار (F9, F11, F21, F40 و یک تیمار شاهد)، بر روی گندم و در چهار تکرار انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمون‌ها با استفاده از نرم افزار های SAS و SPSS و رسم نمودارها به کمک نرم افزار Excel انجام شدند.

نتایج

در این تحقیق 44 جدایه فلاوباکتریوم از ریزوسفر گندم مناطق مختلف کشور جداسازی شد. نتایج حاصل از بررسی توان تولید اکسین جدایه‌های ***Flavobacterium*** نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه دارای توانایی تولید اکسین بودند. متوسط میزان تولید 2/03 µg/ml و دامنه آن از 0/27 تا12/03 µg/ml بود. نتایج حاصل از ارزیابی توانایی جدایه‌های فلاوباکتریوم در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول نشان داد که سی و چهار جدایه از توانایی حل کردن تری کلسیم فسفات بطور نسبی برخوردار بودند. هیچ یک ازجدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید آنزیم - ACC deaminase و سیدروفور را نداشتند و توان تولید سیانید هیدروژن سیانید هیدروژن بسیار کم و در سطح 1 درجه‌بندی گردید. بر اساس این نتایج هفت سویه F9, F11, F20, F21, F22, F34, F4 به عنوان سویه های برتر انتخاب شدند.

نتایج حاصل از آزمایش درون شیشه ای و گلخانه ای نشان داد که جدایه های مورد استفاده سبب افزایش طول ریشه، صفات رشدی و عملکرد گندم گردیدند.

نتایج آزمایشات مزرعه ای نشان داد باکتریهای مورد استفاده سبب افزایش رشد و عملکرد دانه در استانهای مذکور شدند (جدول 1).

جدول 1- تاثیر تیمارهای مختلف بر عملکرد گندم در استانهای مختلف

	استان				
تیمار	مازندران	فارس	کرمانشاه	خراسان	صفی آباد
F9	30/1 A	6121/9 C	5607 A	4305/9 AB	6201 A
F11	28/9 AB	6621/6 AB	5584/4 A	4567 AB	5621 A
F21	29/5 AB	6422/5 BC	5765 A	4362/8 AB	6079 A
F40	29/9 AB	6849/6 A	5652/5 A	5128/5 A	5756 A
Control	31/3 A	6208/9 C	5530/6 B	3882 B	5758 A

جدول 2- افزایش عملکرد نسبی در گیاهان تلقیح شده با سویه های مختلف نسبت به شاهد

استان	سویه های مورد استفاده			
	F9	F11	F21	F40
مازندران	31/4	24/7	1/8	30/2
فارس	-	6/6	3/4	10/3
کرمانشاه	1/4	1	4/2	2/2
خراسان	11	17/6	12/3	32/1
صفی آباد	7/7	-	5/6	-
میانگین	10/3	10	5/5	15

نتایج کلی این تحقیق نشان داد که باکتریهای جنس فلاوباکتریوم در ریزوسفر گندم در ایران حضور دارند و می توانند سبب بهبود مشخصات رشدی و عملکرد گندم در آزمایشات گلخانه ای و مزرعه ای شوند. در مجموع باید گفت این باکتریها دارای این پتانسیل می باشند که بعنوان کود بیولوژیک در گندم مورد استفاده قرار گیرند. جدایه F40 در مجموع سبب افزایش حدود 15 در صد در عملکرد دانه نسبت به تیمار شاهد شد که به عنوان بهترین جدایه تشخیص داده شد که می تواند به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گیرد (جدول 2).

فهرست منابع

Alexander, D. B., and Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol. Fertil. Soils. 12: 39-45.

Amico, E.D., 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, H.N., Zahir, Z.A. and Arshad, M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth ,yield,and oil cotent of canola (*Brassica napus* L.).Aust. J.Agric. Res.55:187-194.

Belimov, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., Demchinskaya, S. V., Piluzza, G., Bulitta, S. and Glick, B. R.2004. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. czern.).Soil Biol. Biochem. 37: 241-250.

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

Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., 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 Soil. 266: 261-272

Glick, B. R. 1995 The enhancement of plant growth by- free- living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-117.

Holmes, B. 1991. The genera *Flavobacterium* , sphingobacterium , and weeksella. in ;Balows, A., Truper, H. , Dworking , M., Harder, W., AND Schleifer, k. (eds). The prokayotes: a hand book on the biology of bacteria, vol.4,pp: 3620-3627, springer- verlag, New York.

Holmes, B., Owen, R., MCMeekin, T. 1984. Genus *Flavobacterium*. in krieg , N. R., and Holt, J.G. (eds.) Bergys Mannual of systematic Bacteriology. Voli. Pp: 353-361, Williams and wilkins, U.S.A.

Kloepper, J. W., Lifshitz, R. and Zablotwicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7: 39-43.

Loper, J.E., Henkles, M. D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. 65: 5357-5363.

Patten, C. L. and Glick, B. R. 2002. Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and stationary-phase sigma factor Rpos. Can. J. Microbial. 48: 635-642.

Penrose, M.and Glick, R. 2003. Methods for isolating and characterizing Acc deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant 118: 10-15.

Pishchik, V. N., Vorobyev, N.L., chernyaeva, I.I., Timofeeva, S. V., Pleozhemyak. V, A., Alexeer, Y. V., Lukin, S. M. 2002. Experimental and mathematical simulation of plant growth promoting rhizobacteria and plant interaction under cadmium stress. Plant soil. 243: 173-186.

Raju, R. A. and Reddy, M. N. 1999. Effect of rock phosphate amended with phosphate solubilizing bacteria and farmyard manure in wetland (*Oryza sativa*). Ind.J. Agri. Sci. 69: 451-453.

Vesquez, p., G. Holguin , M.E.Puente, A. Lopez Cortes and Y. Bashan, 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils, 30: 460-468.