توان تولید هورمون اکسین و حل فسفات در برخی سویه های ازتوباکترکروکوکوم بومی خاک‌های تحت کشت گندم در استان چهارمحال و بختیاری

سعیده رجایی، فائز رئیسی، حسینعلی علیخانی و جواد گیوی

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد خاکشناسی دانشگاه شهرکرد، استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه شهرکرد، استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه تهران و دانشیار گروه خاکشناسی دانشگاه شهرکرد

مقدمه

ایندول استیک اسید یکی از فیتوهورمون های محرک رشد گیاه است که به وسیله بعضی از باکتری‌های خاکزی ساخته می‌شود. در چند سال اخیر اهمیت مواد محرک برای بهبود رشد گیاهان مورد توجه قرار گرفته است. ازوتوباکتر کروکوکوم از جمله دی آزوتروف های تثبیت کننده نیتروژن ملکولی است که در زمرهٔ انواع ریزوباکتری های محرک رشد گیاه (PGPR) قرار دارد. این باکتری قادر است با تولید مواد محرک رشد از جمله اکسین باعث بهبود و افزایش رشد گیاه شود. گزارشات محققین نشان داده است که علیرغم توان تثبیت ازت باکتری‌های ازتوباکتر افزایش محصول در گیاهان تلقیح شده ممکن است، عمدتاً ناشی از توانایی تولید فیتو هورمون این باکترها می‌باشد. توانایی باکتری های مختلف در تولید ایندول استیک اسید متفاوت می‌باشد. حتی سویه های مختلف یک گونه نیز از این نظر ممکن است متفاوت باشد(۱).

هدف ما در این تحقیق اندازه گیری تولید ایندول استیک اسید با استفاده از سویه هایی مختلف ازتوباکترکروکوکوم و انتخاب بهترین آنها می‌باشد.

فسفر بعد ازت یکی از عناصر محدود کننده رشد گیاه و یکی از غیرمتحرک ترین و غیر قابل دسترس ترین عناصر غذایی می باشد که کمبود آن ها در اکثر خاک ها باعث کاهش تولید می گردد. تعدادی از میکرو ارگانیزهای خاک قادرند ترکیبات مختلف فسفر را حل کرده و فسفر موجود در آن ها را آزاد نمایند که اولین بار Geresten در سال ۱۹۴۸ نشان داد که میکرو ارگانیزم های ریزوسفری در جذب فسفر توسط گیاه موثراند (۳). همچنین kumar (۱۹۹۷) نشان داد سویه هایی از ازوتوباکتر کروکوکوم قادر به انحلال تری کلسیم فسفات می باشند (۲). در بسیاری از خاک های ایران به دلیل بالا بودن pH و فراوانی یون کلسیم معمولا" فرم قابل جذب فسفرکمتر از مقدار لازم و مورد نیاز برای تامین رشد مناسب گیاه است که راه حل های بیولوژیک برای حل چنین مشکلی استفاده از سویه هایی حل کننده فسفات است.

بنابراین شناسایی و کاربرد این میکروارگانیزم ها در جهت افزایش قابلیت جذب فسفر در منطقه ریشه در جهت نیل به کشاورزی پایدار ضروری می باشد

مواد و روش‌ها

در این بررسی تعداد ۷۵ نمونه خاک مخلوط از ریزوسفر گندم اراضی تحت کشت در استان چهارمحال وبختیاری تهیه شده بلافاصله پس از نمونه برداری نمونه ها سریعا" به یخچال منتقل گردید و در دمای چهار درجه نگهداری شد. ایزوله‌ها با استفاده از روش گل اشباع و پیروات سدیم و محیط کشت جامد وینوگرادسکی جدا سازی و خالص شدند.

ارزیابی تولید کیفی و کمی ایکس[1]

برای بررسی پتانسیل تولید ایندول استیک محیط کشت جامد LB حاوی تریپتوفان (LB-T) تهیه و پس از سترون سازی محیط، در پلیت توزیع شد. (۱) پس از آن پلیت‌ها شبکه بندی شده و در مرکز هر خانه ۲ µl سوسپانسیون میکروبی باجمعیت $۱/۸ \times ۱۰^{۹}$ به روش قطره گذاری تلقیح شد. بعد از اینکه این عمل در مورد تمامی سویه ها انجام گرفت برشی از کاغذ نیتروسلولز با ابعاد شبکه روی سطح محیط و باکتری قرار می گیرد. درب پلیت مسدود پلیت ها به مدت سه الی یک هفته در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از این که باکتری ها رشد کردند درب پلیت باز و کاغذ نیتروسلولز را از روی محیط برداشته و آن را روی کاغذ صافی اشباع شده با معرف سالکوسکی قرار داده بعد از گذشت نیم ساعت چنانچه باکتری آین تولید کرده باشد هاله‌ای به رنگ صورتی اطراف کلنی مشاهده خواهد شد. برای آزمون کمی ۲۵ µl سوسپانسیون میکروبی در ارلن های حاوی ۲۰ cc محیط مایع LB-T تلقیح شد و این ارلن ها در داخل انکوباتور شیکردار در دمای ۲۵ درجه قرار گرفت سپس بعد از گذشت ۶۰ ساعت ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون هر ارلن سانتریفوژ (100rpm,20min) شده و محلول شفاف رویی جدا و به نسبت ۲:۱ با معرف سالکوسکی مخلوط شده و بعد از گذشت نیم ساعت به روش کالری متری در طول موج ۵۳۰ نانومتر غلظت آین تولید شده توسط باکتری قرائت گردید. محلول‌های استاندارد آین نیز در رقت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰و میلی‌گرم در لیتر ۱۵۰ برای بدست آوردن منحنی کالیبراسیون تهیه شد.

1-Indole Acetic Acid (IAA)

آزمون کیفی جوانه زنی و رشد ریشه

برای بررسی اثر IAA بر روی جوانه زنی بذر و رشد ریشه تعدادی بذر گندم انتخاب و بعد از سترون سازی تعداد ۳۰ عدد بذر در داخل ۳ پلیت قرار داده شده (دو تکرار) به پلیت اول ml ۴ آب مقطر به پلیت دوم ml ۴ محلول قندی ۱ درصد مانیتول و به پلیت سوم cc ۴ محلول قندی ۱ درصد مانیتول و µl ۴ سوسپانسیون باکتری (AZT-13) افزوده و پلیت ها را در انکوباتور تاریکی قرار گرفته و وضعیت جوانه زنی تا قبل از ظهور برگ بررسی می شود.

آزمون کیفی انحلال فسفات های آلی و معدنی

برای مطالعه توانایی حل فسفات های معدنی ازسه محیط کشت جامد Pikovskaya , Sperber و LG استفاده شد و برای بررسی انحلال فسفات های آلی یکبار نیز به جای تری کلسیم فسفات از اسید فیتیک به عنوان فسفر آلی در این سه محیط استفاده شد. پلیت ها شبکه بندی شده و در مرکز هر خانه µl ۲ از سوسپانسیون تازه ازتوباکتر به روش نقطه گزاری تلقیح گردید. باکتری به مدت ۱۰ روز تحت انکوباسیون قرار گرفت در صورت انحلال فسفر هاله شفاف در اطراف کلنی ها مشاهده خواهد شد. همچنین محیط کشت مایع وینوگرارسکی تهیه و توسط باکتری تلقیح شد و در روزهای ۲ و ۴و ۶و ۸ pH محیط اندازه گیری شد.

نتایج و بحث

۹۰ درصد سویه ها در محیط LB-T قادر به رشد بودند که در این میان ۶۷ درصد سویه های انتخابی قادر به تولید IAA بودند. بیشترین IAA در دامنه ۶۰ تا ۷۲ میلی‌گرم در لیتر برای سویه های AZT-13,AZT-25,AZT-70می باشد.

جدول (۱) مقادیر به دست آمده از درصد جوانه زنی در تیمارهای متفاوت

باکتری و محلول قندی	محلول قندی ۱ درصد	آب مقطر	نام پلیت
۹۶/۷	۶۸	۷۰	درصدجوانه

جدول (۲) بررسی انحلال فسفات های آلی یکبار نیز به جای تری کلسیم فسفات از اسید فیتیک به عنوان فسفر آلی در این سه محیط

شماره باکتری	قطرهاله به کلنی (mm)	IAA(m , L^{-1})
11	8/3	60
13	8/4	70
20	15/4.5	10.77
25	7/3	72.01
70	10/4	66.6
72	6/4	67
64	4/2	42.93
54	0	0
42	15/4.5	49.61

جدول (۳) بررسی انحلال فسفات های آلی یکبار نیز به جای تری کلسیم فسفات از اسید فیتیک به عنوان فسفر آلی در این سه محیط

	pH				
day	0	2	4	6	8
AZT-25	7.25	6.9	6.85	6.78	6.67
AZT-13	7.25	7.4	7	6.7	6.5
AZT-72	7.25	6.8	6	6.5	6
AZT-54	7.25	6.92	6.86	6.6	6
BLANK	7.25	7.27	7.25	7.25	7.25

طبق جدول (۱) درصد جوانه زنی با حضور باکتری در حدود ۳۰ درصد افزایش یافته، همینطور بذرها آغشته به باکتری ۳۶ ساعت زودتر از سایر بذرها جوانه دار شدند که بعد از جوانه دار شدن ریشه های طویل تری ایجاد کردند. طویل شدن ریشه نمی‌تواند ناشی از جذب ازت تثبیت شده توسط باکتری باشد. چون بذر از ذخیره موجود در لپه ها تا مدتی استفاده کرده بنابراین تسریع جوانه زنی و رشد طولی ریشه می‌تواند ناشی از IAA تولید شده باشد در واقع می توان گفت باکتری در حضور ترشحات ریشه بذر اکسین تولید کرده و IAA در غلظت های پایین اثر مثبت روی جوانه زنی و طویل شدن سلول‌ها دارد.

در آزمون حل فسفات ۹۸ درصد سویه ها قادر به رشد در هر سه محیط بودند اما برخلاف رشد سریع باکتری ها هاله شفاف اطراف باکتری دال بر انحلال فسفات های آلی و معدنی مشاهده نشد(جدول۲). .مطالعه pH سوسپانسیون میکروبی هر چند سیر نزولی نشان می دهد اما این کاهش نسبت به آنچه در منابع برای

باکتری‌های حل کننده فسفات آمده خیلی بیشتر است. pH سوسپانسیون در سویه‌هایی از ازتوباکتر که توانسته بودند فسفر را حل کنند(جدول۳). توسط کومار(۲) در حدود ۴/۲ گزارش شد. در حالی که کمترین pH اندازه گیری شده در سویه‌های مورد نظر ۶ می باشد. هر چند برای تعیین فسفر حل شده نیاز به کشت باکتری در محیط مایع و اندازه گیری فسفر محلول در مایع و اندازه گیری فعالیت آنزیم فسفاتاز لازم است اما به طور خلاصه می‌توان اینطور نتیجه گیری کرد که شاید چون سویه‌های مورد نظر قادر به کاهش pH به حد پایین تر از ۶ نیستند، بنابراین قابلیت انحلال فسفر را ندارند.

منابع مورد استفاده

1- Bric, J.M., R.M. Bostock, and S.E. Siverstone. 1991. Rapid in situ assay for Indoleacetic Acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose memberane.Applied & Environmental Microbiology, 54: 535-538.

2- Kumar, V., A.N. Kumar and B.P. Sing. 2000. Performance and persistence of.phosphate solubilizing Azotobacter chroococcum in wheat rhizosphere.Folia-Microbiologica, 5: 343-347.

3- Kumar, V. and N. Narula. 1999. Solubilization of inorganic phosphate and growth emergence of wheat as affected by Azotobacter chroococcum mutans. Biology and Fertility of Soils, 5: 301-305.

4- Sarwar ,M and W.T. Frankenberger.1993. Influence of L-tryptophan and auxins applied to the rhizisphere on the vegetative growth of Zea mays L.Plant & Soil, 160: 94-104.

5- Rodriguez, H.,R.1999. Phosphate Solubilizing bacteria and their role in plant growth promotation.Biotechnology Advances, 17: 319-339.