اثر دو ایزوله بومی باکتری آزوسپیریلوم روی فعالیت آنزیم های فسفاتاز اسیدی و قلیایی در خاک اطراف ریشه گیاه گندم در سطوح مختلف ازت

داود فرج زاده، ناصر علی اصغرزاده، رقیه حاجی بلند و هادی اسدی رحمانی

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، استادیار گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، استادیار گروه علوم گیاهی دانشکده علوم طبیعی دانشگاه تبریز و عضو هیئت علمی بخش بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب تهران

مقدمه

یکی از مهمترین عناصر غذایی که کمبود آن محدود کننده رشد گیاه است فسفر می باشد. در خاک بخش مهمی از آن در ساختمان مواد آلی وجود دارد، بنابراین معدنی شدن آن از نظر تغذیه گیاهان و کشاورزی اهمیت زیادی دارد. فسفاتازهای خاک، نقش مهمی در این معدنی شدن ایفا می کنند. فسفر آلی خاک بین ۲۰ تا ۸۰ درصد کل فسفر لایه سطحی خاک ها را تشکیل می دهد (۱۵). چون گیاهان نیاز فسفری خودشان را از طریق جذب آنیون های فسفات از خاک به دست می آورند، لذا فرمهای آلی فسفر، جهت قابل استفاده شدن برای گیاهان بایستی توسط آنزیم هایی که هیدرولیز استرها و انیدریدهای اسید فسفریک را کاتالیز می کنند، به صورت معدنی درآیند (۷). بنابراین سرعت معدنی شدن فسفر آلی در خاک به وسیله غلظت فسفر محلول کنترل می شود (۱۳). فسفو مونو استرازها در واقع فسفاتازهای خاک هستند که به طور گسترده مطالعه شدند و به دو صورت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی طبقه بندی می شوند (۷). فسفاتازهای اسیدی و قلیایی توسط پروتوزوآ (۱۴)، قارچ های میکوریز (۱۲)، کرم‌های خاکی و میکروارگانیسم ها (۱۰) تولید می شوند. با وجود این، بخش اعظم فسفاتازهای اسیدی خاک اساساً منشاء گیاهی دارند (۹ و ۱۸). ریچ و روویرا (۱۶) فعالیت فسفاتاز اسیدی را در ریشه های جوان گندم در حضور و عدم حضور میکروارگانیسم ها اندازه گیری کردند. آنها یافتند که تلقیح با یک میکروارگانیسم تولید کننده فسفاتاز تاثیری روی فعالیت فسفاتاز سطح ریشه نداشت و افزودن مایه تلقیح خاکی فعالیت فسفاتاز ریشه را کاهش داد. با وجود این، استرمن و مک لارن (۹)گزارش کردند که میکروارگانیسم های خاک فعالیت فسفاتاز سطح ریشه های جو را افزایش دادند. داگلاس و همکاران (۶) در تحقیقی بر روی تاثیر باکتری و آمیب روی فعالیت فسفاتاز اسیدی گیاه blue grama چنین یافتند که حضور باکتری و یا باکتری و آمیب مقدار فعالیت فسفاتاز اسیدی را در کشت هیدروپونیک افزایش داد اما اثری از فعالیت فسفاتاز قلیایی دیده نشد. آلارکون و همکاران (۳) نشان دادند که در گیاهان تلقیح شده با گلوموس کلاردیوم در مقایسه با تیمارهای تلقیح توام قارچ و باکتری آزوسپیریلوم و گیاهان شاهد (بدون تلقیح)، مقدار فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی در محلول خاک ($P<0/01$) به صورت معنی داری افزایش یافت. اما در تلقیح گیاهان با آزوسپیریلوم مقدار فسفاتاز اسیدی محلول با گیاهان شاهد اختلاف معنی داری نداشت. نتایج یک تحقیق دیگر نشان داد که فعالیت فسفاتاز اسیدی در سیستم ریشه گونه ها و واریته های مختلف غلات با pH و غلظت فسفر قابل استفاده در محلول غذایی همبستگی منفی داشته و نیز فعالیت فسفاتاز اسیدی در واریته های داخل یک گونه متفاوت بود (۱۷). لذا چنین بنظر می‌رسد که در اثر همیاری بین این باکتری و گیاه گندم مقدار فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی افزایش یافته و در نتیجه با انحلال بخش آلی فسفر خاک در تغذیه فسفات گیاه موثر واقع شوند. بررسی منابع موجود نشان می دهد که بیشترین توجه به نقش تثبیت ازت این باکتری ها شده و به سایر اثرات باکتری کمتر پرداخته شده است. از طرفی هر چند در پاره ای از مطالعات مذکور، به نحوی به خصوصیات PGP این باکتری ها اشاره گردیده ولی اکثراً اقدام به اندازه گیری شاخص های کمی در این خصوص نشده است. در این تحقیق، به منظور اثبات برخی خصوصیات PGP در ایزوله های بومی این باکتری، در سه نوبت به ترتیب ۲۰، ۴۰ و ۶۰ روز پس از کشت گیاه گندم، اقدام به اندازه گیری کمی فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی در خاک اطراف ریشه گیاه گندم شده است.

مواد و روش‌ها

خاک به مقدار کافی از عمق ۰ تا ۳۰ سانتی متری برداشت شد و پس از آماده سازی و عبور از غربال ۴ میلی متری در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی و در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتورهای آزمایشی شامل دو ایزوله بومی (ایزوله های شماره ۲۱ و ۳) باکتری آزوسپیریلوم و شاهد بدون تلقیح، سه سطح کودی ازته (۰، ۵۰/۶۳، ۱۰۱/۲۶ میلی گرم ازت در هر کیلوگرم خاک به فرم اوره، طبق دستورالعمل منبع ۳) و زمان (۲۰،۴۰ و ۶۰ روزپس از کشت) بودند که در یک آزمایش گلخانه ای اعمال گردیدند.

کلنی های حاصله بطور جداگانه به محیط کشت NFb مایع همراه ۱ گرم در لیتر از NH_4Cl منتقل گردیدند و پس از تلقیح با ایزوله‌های مورد نظر به مدت دو روز در شیکر انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند(۵). پس از تعیین جمعیت باکتریها به روش کدورت سنجی[1](۸)، بلافاصله سوسپانسیون باکتری در نسبت مناسب با پودر ورمیکولیت استریل مخلوط شدند، تا تراکم جمعیت در ورمیکولیت ۱۰۷ Cells/g گردد.

بذرهای گندم (T.aestivum) رقم شیرودی (تهیه شده از مرکز اصلاح بذر و نهال کرج) در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی سطحی شده و متعاقباً با آب استریل چندین

1- Turbidimetry

بار شستشو شدند. پس از کشت و اعمال تیمارها، گیاهان در گلخانه رشد داده شدند. همچنین برای تأمین شرایط رشد گیاه در گلخانه، درجه حرارت روز حدود ۲۵ و شب حدود ۲۰ درجه سانتی گراد، طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و مقدار نور بین ۷۰۰۰-۸۰۰۰ لوکس با نور لامپ‌های هالوژن و جیوه‌ای تنظیم گردید. همچنین با توزین گلدانها، رطوبت خاک در حدود FC ۰/۸ تنظیم شد. در طول دوره رشدی گیاه در سه نوبت (۲۰،۴۰ و ۶۰ روزپس از کشت) اقدام به نمونه برداری از خاک اطراف ریشه گیاهان گردیده و فعالیت آنزیم های فسفاتاز اسیدی و قلیایی به روش عیوضی و طباطبایی (۱۱) اندازه گیری شد. آنالیز آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار MSTATC و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excell انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده ها نشان می‌دهد که اثر اصلی ازت بر فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی معنی‌دار ($P<0/05$) بوده است . اثر اصلی باکتری نیز بر فعالیت آنزیم های فسفاتاز اسیدی و قلیایی ($P<0/01$) معنی‌دار شد. اثر زمان فقط روی آنزیم فسفاتاز قلیایی ($P< 0/05$) معنی‌دار بود.

مقایسه میانگین اثر اصلی ازت نشان داد که با افزایش ازت، میزان فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی افزایش یافته و تفاوت معنی‌داری بین سطح سوم ازت با بقیه سطوح آن دیده می‌شود.

لوچنکو و لیسوال[2] (۱۹۷۴) گزارش کردند که کودهای معدنی فاقد فسفر نظیر اوره، نیترات آمونیوم با پتاسیم یا بدون آن، فعالیت فسفاتاز را زیاد می‌کنند (۱۱).

آزمایشات در گیاهان تلقیح شده با nif این باکتری نشان داد که در این گیاهان، باز ترکیبات ازته تجمع می یابند. چنین استنباط کردند که هر چند این سویه ها قادر به تثبیت ازت اتمسفری نیستند اما قادر به تولید هورمون می باشند. بنابراین سطح جذب ترکیبات ازته را از طریق توسعه سیستم ریشه ای زیاد می کنند. با استناد به این موضوع می توان چنین استنباط کرد که اگر چه با افزایش کود ازت، فعالیت تثبیت ازت باکتری کاهش می یابد، اما این کاهش، الزاماً موجب کاهش فعالیت PGP ای این باکتری ها نمی شود. به طوری که در اینجا نیز افزایش کود ازت موجب افزایش فعالیت فسفاتاز اسیدی شده است (۵).

دلیل عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین سطح اول و دوم ازت برای آنزیم فسفاتاز اسیدی، شاید به علت واریانس مکانی زیاد می باشد که در نمونه‌برداری وجود داشت. از طرفی با توجه به اینکه آنزیمهای فسفاتاز اسیدی توسط گیاه و نیز باکتری تولید و ترشح می‌شود. لذا توزیع نرمالی از این آنزیم در خاک گلدانها وجود داشته است اما چون آنزیم فسفاتاز قلیایی تنها توسط باکتری ترشح می‌شود و چون باکتری‌ها در تماس نزدیک با ریشه گیاه قرار دارند، بنابراین ممکن است واریانس خیلی زیادی در نمونه‌برداری با سیلندر از خاک اطراف ریشه برای آنزیم فسفاتاز قلیایی در مقایسه با فسفاتاز اسیدی وجود داشته باشد.

مقایسه میانگین اثر اصلی باکتری روی آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین ایزوله ۳ با ایزوله ۲۱ و شاهد از نظر فسفاتاز اسیدی و تفاوت معنی‌داری بین ایزوله ۳ با شاهد از نظر فسفاتاز قلیایی وجود دارد.

همچنین مقایسه میانگین تیمارها برای فاکتور زمان نشان داد که بیشترین فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در مرحله ۲ (۴۰ روز پس از کشت) به وجود می آید و پس از آن به ترتیب مرحله ۳ (۶۰ روز پس از کشت) و مرحله۱ (۲۰ روز پس از کشت) می‌باشند. با توجه به اینکه در مراحل اولیه رشد گیاه، باکتریها به طور کامل استقرار پیدا نکردند لذا فعالیت کمتری نسبت به مرحله ۲ و ۳ دیده می‌شود. چنین به نظر می رسد که حضور آزوسپیریلوم در خاک ریزوسفری سبب افزایش قابل ملاحظه فعالیت آنزیم های فسفاتاز اسیدی و مخصوصاً قلیایی گردیده، که می تواند در افزایش قابلیت جذب فسفر از منابع آلی موثر واقع شود.

منابع مورد استفاده

۱- عمو آقایی، ریحانه. ا. مستأجران، و گ. امتیازی.۱۳۸۱. اثر سویه و غلظت باکتری آزوسپیریلوم برازیلنس روی رشد و نمو ریشه ارقام گندم. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد۳۳، شماره۲، صفحات ۲۱۳-۲۲۲.

۲- ملکوتی، محمد جعفر و م. ن. غیبی. ۱۳۷۹. تعیین حد نهایی بحرانی عناصر غذایی موثر در خاک، گیاه و میوه. نشر آموزش کشاورزی.

3- Alarcon, A., T. Frederick and N. Johnatan. 2002. N short term effects of Glomus claroideum and A.brasilense on growth and root acid phosphatase activity of carica papaya L. under phosphorus stress. Microbiologia, 44(1): 31-37.

4- Bashan, Y., G. Holguin and R. Lifshitz. 1993. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. CRC Press.

5- Bashan, Y., M, Singh and Q. H., Levanony. 1989. Contribution of Azopirillum brasilense Cd. To growth of tomato seedling is not through nitrogen fixation. Can. J. Bot. 67: 2429-2434.

6- Douglas Gould, P. and C., David. 1979. Effect of bacteria and Amoebae on rhizosphere phosphatase activity. Appl Environ Microbiol. 37(5): 943-946.

7- Eivazi, F, and M.Tabatabai. 1977. Phosphatases in soils. Soil Biol. Biochem. 9:167-172.

8- Elmerich, C., W., Zimmer and C. Vieille. 1992. Associative Nitrogen -Fixing Bacteria, In: Stacey, G. et al. Biological Fixation, chapman and Hall. New York.

9- Estermann, E. F. and A. D, McLaren. 1961. Contribution of rhizoplane organisms to the total capacity of plants to utilize organic nutrients. Plant Soil , 15:243-260.

10- Herbien, S.A and J. A., Neal. 1990. Soil pH and phosphatase activity. Commen Soil Sci Plant Anal. 21: 434-456.

2- Levchenko and Lisoval

11- Levchenko, L. A, A. P., Lisoval. 1974. Effect of nitrogen fertilizers on the behaviour of phosphorus in the roots of winter wheat. Vest. Sel, Skokhoz. Nauki, Mosk, 6: 23-29.

12- MacDonald, R. M. and M. Lewis. 1978. The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus Glomus mosseae.New Phytol, 80:135-141.

13- MacGill, W. B. and C. V. Cole. 1981. Comparative aspects of C, N, S, and P cycling through soil organic matter during pedogenesis. Geoderma, 26: 267-286.

14- Martin, S. M, and T.J., Byers. 1976. Acid hydrolase activity during growth and encystment in Acanthamoeba castellanii. J. Protozool. 23:608-613.

15- Oberson, A., J.M. Benson, N. Maire, and H. Sticher. 1996. Microbial processes in soil organic phosphorus transformation in conventional and biological cropping system, Biol Fertil Soils. 21: 138-148.

16- Ridge, E.H and A.D. Rovira. 1971. Phosphatase activity of intact young wheat roots under sterile and non-sterile conditions. New Phytol. 70:1017-1026.

17- Sarapatka, B, and L. Dudova. 2002. Acid phosphatase activity in cereals roots cultivated on a medium with different pH and phosphate supplies.Sym no.6. 17th WCSS, 14-21 August 2002, Thailand.

18- Woolhouse, H.W. 1968. Differences in the properties of the acid phosphatases of plant roots and their significance in the evolution of edaphic ecotypes, p. 357-380. In I.H. Rorison (ed.), Ecological aspects of the mineral nutrition of plants. Symposium of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications, Oxford.