جداسازی ریزوبیوم از خاک‌های شور و ارزیابی برخی از ویژگی‌های محرک رشدی آن‌ها

معصومه جهانشاهی[۱]، محسن علمائی[۲]، اسماعیل دردی پور[۲]
۱ و ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

چکیده

به منظور جداسازی ریزوبیوم‌های بومی خاک شور تعداد ۱۰ نمونه از اراضی شور استان گلستان تهیه و تعداد ۲۰ باکتری جداسازی گردید بعد از انجام آزمایشات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تعداد ۱۵ جدایه منسوب به ریزوبیوم انتخاب گردید. جدایه‌ها از نظر میزان تحمل به شوری (در سطوح ۰، ۲، ۵، ۷ درصد نمک کلرید سدیم) و برخی ویژگی‌های محرک رشد مانند تولید اکسین، انحلال فسفات و آزادسازی پتاسیم مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای باکتری، شوری، و اثر متقابل آن‌ها در سطح یک درصد آماری معنی‌دار بود. همچنین با افزایش شوری مقدار تولید اکسین، انحلال فسفات و آزادسازی پتاسیم کاهش یافته است. دامنه تولید اکسین (۱۹/۳-۱/۱ میلی‌گرم درلیتر)، فسفر (۱۲۰/۲-۱۰/۱ میلی‌گرم درلیتر)، پتاسیم (۴۰/۵_۱۰ میلی‌گرم درلیتر) بود.

واژه های کلیدی: اکسین، پتاسیم، شوری، ریزوبیوم

مقدمه

شوری یکی از مهم‌ترین تنش‌های غیرزیستی است که به شدت قابلیت تولید گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. شوری با ایجاد تنش اسمزی و کاهش جذب عناصر غذایی موردنیاز گیاه در اثر غلظت بیش از حد یون‌های سدیم و کلر موجب کاهش رشد گیاه می‌شود (Sairam et al., 2004). با توجه به روند افزایش توسعه اراضی شور و فقدان اراضی مطلوب برای کشاورزی، شناسایی راهکارهایی که باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر شرایط شوری شود، اهمیت زیادی دارد. باکتری‌های محرک رشد گیاه به عنوان تعدیل‌کننده تنش شوری در نظر گرفته می‌شوند. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بخش کوچکی (۵-۲ درصد) از باکتری‌های ریزوسفری هستند که رشد گیاه را تحریک می‌کنند. باکتری‌های ریزوبیومی از باکتری‌های متداول در ریزوسفر می‌باشد به طور کلی باکتری‌های محرک رشدی می‌توانند به دو صورت "مستقیم" با تحریک رشد گیاه از طریق ساز و کارهای تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مانند تولید هورمون‌های گیاهی، حل‌کنندگی فسفات، تسریع فرآیند معدنی شدن و یا "غیرمستقیم" با کنترل عوامل بیماری‌زا به رشد بهتر گیاه کمک نمایند (Poole et al., 2008). با توجه به نقش باکتری‌های متحمل به شوری در کاهش اثرات منفی آن در گیاه از طریق تولید مواد محرک رشد گیاه، هدف از این پژوهش جداسازی ریزوبیوم‌های بومی خاک شور، ارزیابی میزان رشد جدایه‌ها در درصدهای مختلف نمک و سنجش برخی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های ریزوبیومی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری ریزوبیوم مقاوم به شوری

برای جداسازی ریزوبیوم‌های بومی تعداد ۱۰ نمونه ریشه‌ی گره‌دار به همراه خاک ریزوسفری از اراضی شور استان گلستان جمع‌آوری شد و سپس مراحل جداسازی و خالص‌سازی بر روی محیط YMA[۱] حاوی ۵٪ نمک انجام گرفت. آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی (آزمون‌های گرم، کاتالاز، اکسیداز، جذب کنگورد) انجام شد (Parry et al., 1988) و تعداد ۱۵ جدایه منسوب به ریزوبیوم انتخاب گردید.

[1]Yeast Extract Monnitol Agar

توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک

به منظور سنجش رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نمک، محیط کشت YMA جامد حاوی غلظت‌های (۷، ۵، ۲، ۰) درصد نمک تهیه گردید و جدایه‌ها در شرایط مناسب انکوباسیون شدند. بعد از رشد کافی قطر کلنی‌ها با شاهد (بدون کلرید سدیم) مقایسه شده و به صورت کیفی به سه گروه حساس، نیمه مقاوم و مقاوم گروه‌بندی شدند.

اندازه‌گیری فاکتورهای محرک رشد گیاه (PGPR)

اندازه‌گیری کمی توان تولید اکسین (IAA)

برای اندازه‌گیری کمی توانایی تولید هورمون اکسین جدایه‌های باکتری در محیط نوترینت براث حاوی (۷، ۵، ۲، ۰) درصد نمک کشت داده شدند و از سوسپانسیون باکتری به محیط نوترینت براث حاوی L-Tryptophane با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تلقیح و شیک گردید. سوسپانسیون میکروبی سانتریفیوژ و محلول شفاف رویی به آرامی جدا و ۱ میلی‌لیتر از این محلول به ۲ میلی‌لیتر معرف سالکووسکی افزوده شد. در نهایت شدت رنگ تولید شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید و با استفاده از مقادیر قرائت شده برای استانداردها مقادیر اکسین تولید شده برای نمونه‌ها محاسبه شد (Rubio et al., 2000).

اندازه‌گیری کمی توان انحلال فسفات معدنی نامحلول

به منظور اندازه‌گیری میزان حلالیت فسفر در محیط مایع ابتدا از کشت تازه باکتری به محیط اسپربر حاوی (۷، ۵، ۲، ۰) درصد نمک مایه زنی شد، ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون داخل میکروتیوپ ریخته سانتریفیوژ شده و ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی با ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات و ۳ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه مخلوط می‌شود. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت و سپس مقدار جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده توسط KH_2PO_4 محاسبه گردید (Mehta et al.,2001).

اندازه‌گیری کمی توان آزادسازی پتاسیم معدنی

بعد از کشت باکتری یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون تازه میکروبی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط الکساندروف حاوی (۷، ۵، ۲، ۰) درصد نمک افزوده شد، برای اندازه گیری غلظت پتاسیم ۱۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون را برداشته سانتریفیوژ کرده و محلول رویی بدست آمده را به وسیله دستگاه شعله‌سنج (فلیم فتومتر) قرائت گردید (Savostin. 1971).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		تولید اکسین	انحلال فسفات	آزادسازی پتاسیم
باکتری	۱۴	۸۷/۷۵	۹۵۳۴/۸۹	۲۵۹/۶۶
شوری	۲	۳۳۴/۱۴	۴۷۶۱/۴۸	۳۱۹/۱۱
باکتری*شوری	۲۸	۲۱/۸۰	۱۱۳/۲۴	۲۳/۴۴
خطا		۰/۱۶	۰/۱۳	۰/۱۴

نتایج و بحث

نتایج حاصل از میزان تحمل جدایه‌های مختلف به درصدهای مختلف شوری نشان داد که با افزایش میزان نمک، رشد جدایه‌ها کاهش یافت، میزان کاهش رشد جدایه‌ها متفاوت بود. تمامی جدایه‌ها به جز جدایه‌های (۲، ۴، ۱۳، ۱۵) توانستند تا غلظت ۵ درصد نمک را تحمل نمایند. جدایه‌های (۱، ۳، ۵، ۶، ۷، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۴) توانایی رشد نسبتا ضعیف تا متوسطی در

غلظت ۷ درصد نمک از خود نشان دادند این در صورتی بود که جدایه‌های (۲، ۴، ۸، ۱۱، ۱۳، ۱۵) توانایی رشد را از خود نشان ندادند (جدول۲). پژوهشگران گزارش کرده‌اند که رشد اکثر ریزوبیوم‌ها در شوری ۸۰ میلی‌مولار متوقف می‌شود اما برخی از جدایه‌های *بردی ریزوبیوم ژاپونیکوم* و *سینوریزوبیوم ملیلوتی* قادرند مقادیر بیش از ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم را نیز تحمل کنند (Rigand. 1987). نتایج تجزیه واریانس تیمارهای باکتری، شوری و اثر متقابل آن‌ها نشان داد که تولید اکسین، انحلال فسفات و آزادسازی پتاسیم دارای تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۱ درصد می‌باشد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین مقدار اکسین در سطح بدون نمک مربوط به جدایه ۷ با میانگین (۱۹/۳) میلی‌گرم در لیتر می‌باشد، شوری سبب کاهش تولید اکسین در جدایه‌ها گردید به طوری‌که به ترتیب در سطوح (۲، ۵) درصد نمک بیشترین میزان تولید اکسین مربوط به جدایه‌های (۱۰،۷) بود و کمترین مقدار تولید اکسین در سه سطح شوری مربوط به جدایه ۱ به ترتیب با میانگین (۲/۲، ۱/۴، ۱/۱) میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. همچنین پاول و همکاران (Paul et al., 2014) گزارش کردند باکتری *Azotobacter* سویه H11 و A32 در غلظت نمک ۰/۳ مولار بیشترین مقدار اکسین را تولید کردند که با افزایش این غلظت مقدار اکسین تولید شده در سویه H11 افزایش اما در سویه H12 کاهش یافت. براساس نتایج (Yasmin et al., 2009) میزان تولید ایندول استیک اسید (IAA) را در ۱۵ سویه از باکترهای ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی شیرین، در دو محیط دارای تریپتوفان و فاقد تریپتوفان مطالعه نمودند و به این نتیجه رسیدند که تمام سویه‌ها قادر به تولید ایندول استیک اسید بوده که غلظت آن در محیط فاقد تریپتوفان ۱۳/۳۳-۳/۸۴ میلی‌گرم متغیر بود. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار انحلال فسفات در سطوح (صفر، ۲، ۵ درصد نمک) مربوط به جدایه ۷ می‌باشد که بیشترین مقدار با میانگین ۱۲۰/۲۱ میلی‌گرم در لیتر در محیط بدون نمک می‌باشد و کمترین میزان آن در سطح (صفر، ۲، ۵ درصد نمک) به ترتیب مربوط به جدایه (۱۱، ۱۰، ۱۲) با میانگین (۲۲/۶۰، ۱۲/۵۶، ۱۰/۱۶) میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. بیشترین میزان آزادسازی پتاسیم در سطح بدون نمک و ۲ درصد نمک مربوط به جدایه ۲ به ترتیب با میانگین (۴۰/۵ و ۳۵/۲) می‌باشد و در سطح ۵ درصد نمک مربوط به جدایه ۱ با میانگین ۲۵/۵ می‌باشد و کمترین میزان آن در سه سطح شوری مربوط به جدایه ۱۴ با میانگین (۱۲/۷، ۱۱/۵ و ۱۰) می‌باشد.

جدول۲-آزمون مقاومت به شوری

باکتری	درصد نمک			گروه	باکتری	درصد نمک			گروه
	٪۰	٪۵	٪۷			٪۰	٪۵	٪۷	
۱	++++	++	+	نیمه مقاوم	۹	+++	++	+	نیمه مقاوم
۲	++++	_	-	حساس	۱۰	++++	++	+	نیمه مقاوم
۳	++++	++	+	نیمه مقاوم	۱۱	+++	+	-	نیمه مقاوم
۴	+++	_	-	حساس	۱۲	+++	++	+	نیمه مقاوم
۵	++++	++	++	مقاوم	۱۳	++++	-	-	حساس
۶	+++	++	+	نیمه مقاوم	۱۴	++++	++	+	نیمه مقاوم
۷	++++	+++	++	مقاوم	۱۵	++++	-	-	حساس
۸	++++	+	_	نیمه مقاوم					

جدول۳- میزان انحلال فسفات در سطوح مختلف نمک

باکتری	انحلال فسفات mg/l			باکتری	انحلال فسفات mg/l		
	٪۰	٪۲	٪۵		٪۰	٪۲	٪۵
۱	۱۰۳/۵^{e}	۹۰/۶^{i}	۶۸/۷^{r}	۹	۹۴/۱۵^{g}	۷۸/۷^{n}	۷۰/۶۷^{q}
۲	۸۴/۳^{k}	۷۳/۳۶^{o}	۴۲/۷^{z}	۱۰	۲۹/۷۰^{d}	۱۲/۵۶^{m}	۱۳/۵۸^{l}
۳	۶۱/۳^{t}	۴۶/۸۳^{x}	۳۳/۶^{b}	۱۱	۲۲/۶^{g}	۱۹/۳^{i}	۱۶/۲۳^{j}
۴	۹۳/۰۲^{h}	۸۵/۲۶^{j}	۸۱/۸^{l}	۱۲	۲۵/۷^{f}	۱۴/۶۳^{k}	۱۰/۱۶^{n}
۵	۷۱/۴۵^{p}	۶۵/۹^{s}	۴۹/۳۶^{w}	۱۳	۳۰/۹^{c}	۲۷/۲۳^{e}	۲۰/۵۶^{h}
۶	۱۱۵/۱۶^{b}	۱۰۲/۰۳^{f}	۹۴/۲۳^{g}	۱۴	۳۶/۵۳^{a}	۱۹/۲^{i}	۱۳/۴^{l}
۷	۱۲۰/۲۱^{a}	۱۱۳/۹۳^{c}	۱۰۹/۵۴^{d}	۱۵	۵۵/۷^{u}	۵۳/۴^{v}	۴۶/۱^{y}
۸	۸۱/۰۳^{m}	۷۳/۳۶^{o}	۴۶/۱۰^{y}				

جدول۴- میزان تولید اکسین در سطوح مختلف نمک

باکتری	تولید اکسین mg/l			باکتری	تولید اکسین mg/l		
	٪۰	٪۲	٪۵		٪۰	٪۲	٪۵
۱	۲/۲^{tuv}	۱/۴۶^{xy}	۱/۱۳^{y}	۹	۱۱/۷^{ef}	۸/۶۶^{h}	۳/۲$^{p-s}$
۲	۱۲/۷^{d}	۹/۸^{g}	۱/۵۳^{wxy}	۱۰	۶/۲۶^{j}	۵/۶۶^{jk}	۴/۳^{lmn}
۳	۳/۸$^{m-p}$	۳/۴^{opq}	۲/۴^{tu}	۱۱	۳/۱۳^{qrs}	۲/۷۳^{rst}	۲/۲۶^{tuv}
۴	۶/۱^{j}	۴/۶۳^{l}	۲/۱۶$^{t-w}$	۱۲	۲/۴^{tu}	۲/۰۳$^{u-x}$	۱/۳^{y}
۵	۱۴/۰۳^{c}	۱۱/۳۳^{f}	۲/۵۶^{stu}	۱۳	۷/۶^{i}	۵/۳۳^{k}	۳/۳^{pqr}
۶	۱۲/۱۶^{de}	۱۰/۲^{g}	۱/۶۶$^{v-y}$	۱۴	۵/۸۳^{jk}	۴/۶۶^{l}	۳/۷$^{n-q}$
۷	۱۹/۳۶^{a}	۱۶/۴۶^{b}	۲/۷^{rst}	۱۵	۴/۶۶^{l}	۴/۲^{lmn}	۳/۳^{pqr}
۸	۵/۴^{k}	۳/۹۶^{mno}	۱/۷$^{v-y}$				

جدول۵- میزان آزادسازی پتاسیم در سطوح مختلف نمک

باکتری	آزادسازی پتاسیم mg/l			باکتری	آزادسازی پتاسیم mg/l		
	٪۰	٪۲	٪۵		٪۰	٪۲	٪۵
۱	۲۷/۱۳^{c}	۲۶/۰۶^{de}	۲۵/۵۶^{ef}	۹	۲۴/۰۳^{g}	۲۲/۴^{h}	۲۱/۲۶^{i}
۲	۴۰/۵۳^{a}	۳۵/۲۳^{b}	۱۹/۱۳^{lm}	۱۰	۲۰/۴۶^{j}	۱۹/۷۶^{k}	۱۹/۳۱^{kl}
۳	۲۷/۴۶^{c}	۲۵/۳۶^{f}	۲۴/۰۶^{g}	۱۱	۱۵/۲۶^{rst}	۱۴/۶۶^{tu}	۱۳/۹^{vw}
۴	۲۴/۳^{g}	۱۸/۰۳^{n}	۱۵/۷۳^{pqr}	۱۲	۱۷/۶^{no}	۱۶/۲۶^{p}	۱۴/۳^{uv}
۵	۲۲/۱۳^{h}	۱۷/۱۳^{o}	۱۵/۹۳^{pq}	۱۳	۱۷/۸۶^{n}	۱۵/۷^{pqr}	۱۴/۹۶st
۶	۲۶/۳۶^{d}	۲۱/۳۳^{i}	۱۹/۶۶^{kl}	۱۴	۱۲/۷۳^{x}	۱۱/۵^{y}	۱۰^{z}
۷	۲۳/۷۶^{g}	۲۰/۴^{j}	۱۵/۵۶^{qrs}	۱۵	۱۳/۵۶^{w}	۱۲/۹۳^{x}	۱۲/۳۶^{x}
۸	۲۴/۳۳^{g}	۱۸/۶۶^{m}	۱۵/۹۳^{pq}				

منابع

Dilworth, M.J., Carson, K.C., Giles, R.G.F., Byrne, L.T., and Glenn, A.R. 1998. *Rhizobium leguminosarum b.v. viciae* produces a novel cyclic *trihydroxamate siderophore*, *vicibactin.* Microbiology, 144: 781-791.

Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. Am. J. Altern. Agric. 1: 51-57.

Mehta, S., and Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. Current Microbiol. 43: 51-56.

Mohammad, R. M., M. Akhbavan-Kharazian, W. F. Campbell, and Rambough, M. D. 1991. Identification of salt and drought tolerant *Rhizobium meliloti L*. strain.Plant and soil. 134:271-276.

Parry M., Tarnball P.C. and Gibson J. R: A Color atlas of bacillus Species Wolf Medical Publication itd, London. 1988.

Paul S., Bandeppa., Aggarwal Ch., Thakur, J.K., Rathi, M.S. and Khan, M.A. 2014. Effect of salt on growth and plant growth promoting activities of *Azotobacter chroococcum* isolated from saline soils. Environment and Ecology., 32 (4): 1255-1259.

Poole, P.S., Hynes, M.F., Johnston, A.W.B., Tiwari, R.P., Reeve, W.G., and Downie, J.A. 2008. Phsiology of root nodule bacteria. In: Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. and Newton, W.E.(eds). Nitrogen fixing leguminous symbioses. Springer, Netherland. Pp: 241-292.

Rehman, A., and Nautiyal, C. S. (2002). Effect of drought on the growth and survival of the streestolerant bacterium *Rhizobium* sp.NBRI2505 sesbania and its drought sensitive transposon Tn5 mutant. Current Microbiol., 45(5): 368-377.

Rigand, J. 1987. Salt tolerance of *Medicago* nodules and bacteroids, in plant genees involved in nitrogen fixationand prodactivity of alfalfa. USDA-IRAN workshop. Auzevil.

Rubio, M.G.T., Plata, S.A., Castillo, J.B., and Nieto, P.M. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp.and *Pseudomonas* sp., producers of Indole- 3-Acetic Acid and siderophores from Colombian Rice Rhizosphere, Revista Latinoamrican de Microbioloia, 5: 171-176.

Sairam R.K. and Tyagi A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. Current Science 86:407-421.

Savostin, P. 1971. Microbial Transformation of Silicates. Pflanzenernahr-bodenk. 132: 37-45.

Yasmin, F., Othman, R., Sijam, K., and Saad, M.S. 2009. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. African Journal of Microbiology Research. 11: 815-821.

Isolation of rhizobium isolates from saline soils and evaluation of some growth stimulating properties

M. jahanshahi[1], M.Olamaeei[2], E. Dordipour[2]
1, 2- M. Sc. Student and Associate Professor Department of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

In order to isolate native rhizobium from saline soil, 10 samples were collected from Saline lands in Golestan Province and 20 bacteria were isolated during this process. In the next step, and after physiological and biochemical experiments, 15 of the isolates related to rhizobium were selected. In the present study, the isolates were evaluated for salinity tolerance (0, 2, 5, 7% sodium chloride salt) and some characteristics of growth stimulus such as auxin production, phosphate solubilization and potassium releasing bacteria. According to the results, in our sample the production ranges of auxin were (19.3-1.1 mg/l), phosphorus (120/2-10/1 mg/l), potassium (.40/5-10 mg/l). Furthermore, the analysis of variance revealed that the effects of bacteria, salinity, as well as their interaction was statistically significant at the one percent level. Also, with increasing salinity, the amount of auxin production, phosphate solubilization and potassium releasing bacteria, have been decreased respectively.

Key words: Auxin, Potassium, Salinity, *Rhizobium*