پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران
۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

بررسی برخی خصوصیات محرک رشد گیاه باکتری های جداسازی شده از دیم‌زارهای گندم

لیلا محمدی[۱]، حسینعلی علیخانی*[۲]، حسن اعتصامی[۳]، مهدی بهشتی[۴]
۱، ۲، ۳ و ۴- دانشجوی کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و دانشجوی دکتری گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران

چکیده

نتایج این مطالعه نشـان داد که حدود ۲۲ درصد باکتری‌های جداسازی شده دارای توان انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی با قطر هاله به کلنی بالای ۱/۵ و متحمل به شـوری و خشکی بودند. بالاترین مقدار قطر هاله به کلنی در محیط انحلال فسفات آلی مربوط به جدایه‌های شـماره ۷، ۱۵۳ و ۷۲ بوده که به ترتیب میزان قطر هاله به کنی آن‌ها در زمان ۴۸ ساعت برابر ۵/۷۲، ۵/۵۲ و ۵/۲۵ بودند همچنین بالاترین نسـبت قطر هاله به کلنی در محیط CAS-agar در جدایه شماره ۱۰ بعد از ۱۲۰ ساعت برابر ۱/۸۵ مشـاهده شـد. بالاترین مقدار تولید هورمون اکسـین نیز در جدایه شـماره ۷ با ۵۱/۸ پی پی ام و کمترین مقدار در جدایه شـماره ۱۰۱ با ۱۱/۴ پی پی ام مشـاهده شـد. با توجه به نتایج بدست آمده باکتری شماره ۷، ۷۳ و ۱۵۳ و ۱۰ علاوه بر داشـتن توان انحلال فسـفات‌های نامحلول معدنی دارای خصـوصیات محرک رشدی بالایی نسبت به سایر جدایه‌ها بودند که به منظور مطالعات درون شیشه ای و گلدانی در فاز بعدی تحقیق انتخاب شدند.

کلمات کلیدی: اکسین، انحلال فسفات های آلی و معدنی، باکتری های محرک رشد گیاه، سیدروفور

مقدمه

از مولفه های اساسـی افـزایش عملکـرد محـصولات کـشاورزی، مصرف بیشتر انـواع نهـاده هـا، بـویژه کودهـای شـیمیایی اسـت. در سالهای اخیر کاربرد کودهای شیمیایی انقلابـی در تولیـد محـصولات زراعی بوجود آورده، به‌نحوی که در سال ۱۹۹۸حدود ۳۶۵ میلیون تـن کود شیمیایی در جهان و در سطحی معادل ۱/۴ میلیارد هکتـار مـورد استفاده قرار گرفته است. هر ساله نیز انواع جدیدتر کودهای شـیمیایی با فرمولاسیونها و درصد متفاوت عناصر غذایی معرفی مـی‌شـوند (Amara et al,1997). در دهه‌های اخیر با افزایش مصـرف کودهای شـیمیایی مشکلات جدی زیست محیطی و اقتصادی بر جامعه تحمیل شده است. ریزوبـاکتری‌هـای محـرک رشـد گیـاه (PGPR) بخش کوچکی(۲-۵ درصد) از ریزوباکترها هستند که رشد گیاه را تحریک می‌کنند (Gupta et al,2003). این باکتری‌ها در طیـف وسیعی از گیاهان زراعـی بـه منظـور افـزایش رشـد از طریق افـزایش دانـه در بوتـه، وزن بوتـه، عملکـرد و کنترل بیماری به کار برده می‌شوند. باکتریهای محرک رشد میتوانند به صورت "مستقیم "با تحریک رشد گیاه از طریق سازوکارهای تغذیه‌ای و فیزیولـوژیکی ماننـد تولیـد هورمـون‌هـای گیـاهی مانند اکسـین، حل کنندگی فسـفات‌های آلی و معدنی، تسـریع فرآیند معدنی شـدن مواد آلی، اکسـایش بیولوژیک گوگرد، تجزیه سیلیکاتها و آزاد سازی عناصری همچون پتاسیم، آهن و روی می‌باشد. و یا "غیر مستقیم "با کنترل عوامل بیماریزا از طریـق تولید ترکیبات مختلف مانند سـیانیدهیدروژن (HCN)، تولید سیدروفور، متابولیتهای ضد قارچ و آنتی بیوتیک‌ها به رشـد بهتـر گیـاه کمـک نماینـد (Zhu and yang, 2015). سیدروفورها ترکیبهای آلی با وزن مولکولی کـم و لیگانـدهای شـیمیایی بـا میـل ترکیبـی شـدید و اختصاصی برای پیوند شدن با آهن III هـستند. نقـش باکتریهای مولد سیدروفورهای میکروبی در افـزایش رشد گیاه میتواند به صـورت غیرمـستقیم و از طریـق بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی و یا تحریـک مـستقیم رشد گیاه به واسطه افزایش جـذب آهـن توسـط گیـاه باشد (Maurhofe et al,1995). هدف از انجام مطالعه حاضـر، بررسـی توانایی محرک رشـد گیاه باکتری‌های بومی جداسـازی شـده از دیم‌زارهای گندم به منظور دسـت‌یابی به کود بیولوژیک برای استفاده در شرایط دیم‌زار می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک از مزارع گندم دیم‌زارهای دشت استان قزوین و زنجان جمع آوری شده و به آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران منتقل گردید. برای جداسازی باکتری های محرک رشد گیاه ابتدا ۱۰ گرم خاک ریزوسفری و غیر ریزوسفری به ارلن های حاوی ۹۰ میلی لیتر محلول بافر استریل (کلرید سدیم ۰/۹ درصد) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیک داده شدند. پس از آن با تهیه سری رقت از خاک و با استفاده از محیط کشت NB جدا شد. بعد از این مرحله ۱۸۴ جدایه باکتری انتخاب و برای انجام تست های محرک رشد گیاه در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

آزمون نیمه کمی انحلال فسفات های نامحلول معدنی با استفاده از محیط کشت اسپربر برای بررسی توان انحلال فسفات های نامحلول معدنی در ۱۸۴ سویه صورت گرفت. معیار سنجش توان انحلال فسفات توسط جدایه ها محاسبه نسبت قطر هاله به قطر کلنی بر روی محیط کشت اسپربر بود لذا باکتری‌های دارای هاله‌ی شفاف بر روی محیط جامد اسپربر حاوی تری کلسیم فسفات[1] (TCP) شناسایی و قطر هاله و کلنی آنها اندازه گیری شد (Rashid et al,2004). که از این بین ۴۰ جدایه براساس قطر هاله به کلنی بالای ۱/۵ و متحمل به شوری و خشکی انتخاب گردید. بعد از شناسایی سویه های پرتوان برای انحلال فسفات های نامحلول معدنی، ویژگی های محرک رشد گیاه این سویه ها به صورت ذیل مورد بررسی قرار گرفت.

برای بررسی توانایی انحلال فسفات‌های آلی از محیط اسپربر اصلاح شده استفاده شد (Alikhani et al,2006). در این آزمون نیز ۴۰ جدایه برتر مربوط به انحلال فسفات های نامحلول معدنی مورد بررسی قرار گرفتند و باکتری‌های دارای هاله‌ی شفاف بر روی محیط جامد اسپربر حاوی نمک سدیمی فیتیک اسید[2] شناسایی و قطر هاله و کلنی آنها اندازه گیری شد (Alikhani et al,2006).

اندازه گیری توانایی تولید سیدروفور به روش اصلاح شده Alexander and Zuberer (1991) انجام شد. برای این منظور از محیط CAS-Agar[3] استفاده شد. برای تهیه این محیط چهار محلول شامل معرف Fe-CAS، بافر، محلول غذایی و کازو آمینو اسید با هم مخلوط شد. ابتدا باکتری ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت NB کشت داده شد، سپس ۵ میکرولیتر تعلیق تازه باکتری با جمعیت 10^8 ($CFU\ ml^{-1}$) به روش لکه گذاری روی پلیت های حاوی محیط CAS کشت داده شد و تولید هاله نارنجی رنگ در فواصل زمانی ۳ و ۵ روز اندازه‌گیری گردید.

به منظور توان تولید اکسین جدایه ها، ابتدا باکتری ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط TSB کشت داده و ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسون باکتری به ۲۵ میلی لیتر محیط TSB حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر ال-تریپتوفان منقل شد. بعد از ۴۸ ساعت سوسپانسون باکتری سانتریفوژ و یک میلی لیتر از محلول بالایی با ۴ میلی لیتر معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی لیتر $FeCl_3.6\ H_2O$ مولار) مخلوط شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بلافاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد (Bent et al, 2001). مقدار تولید اکسن با مقایسه این جذب با نمودار استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید (IAA) محاسبه شد. در نهایت داد های بدست آمده با نرم افزار SAS 9.2 آنالیز و برای مقایسه میانگین داده ها از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد و در نهاینت نمودارها به کمک نرم افزار اکسل ۲۰۱۳ رسم گردید.

نتایج و بحث

آزمون نیمه کمی انحلال فسفات های نامحلول معدنی

نتایج تجزیه واریانس توان تولید انحلال فسفات های نامحلول معدنی توسط جدایه ها در جدول ۱ آمده است. با توجه به جدول تجزیه واریانس اثر باکتری ها در سطح ۱ درصد معنی دار بود.

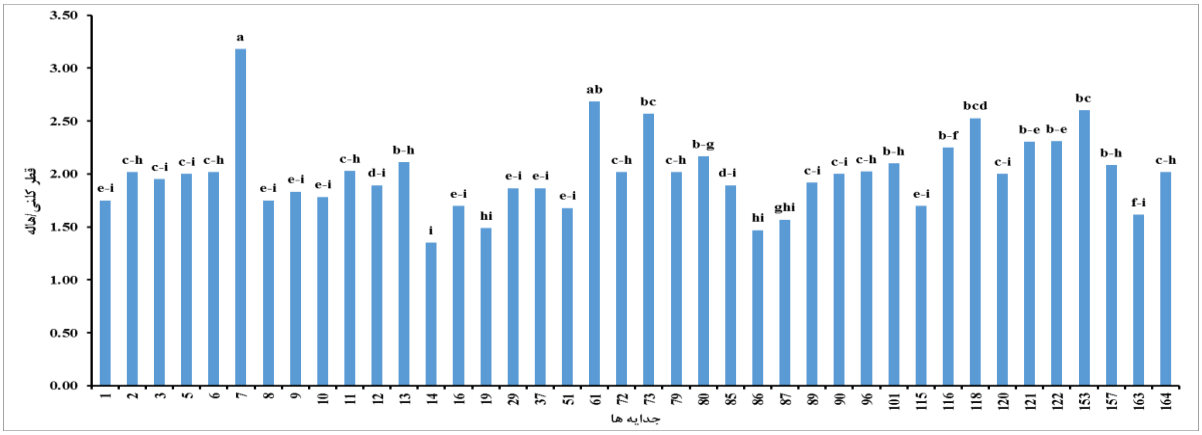
جدول ۱- جدول تجزیه واریانس توان انحلال فسفات معدنی توسط سویه های جداسازی شده از دیم زارهای گندم

میانگین مربعات (MS)	df	SOV

[1]Tri Calcium Phosphate
[2]Phytic acid sodium salt hydrate
[3] Chrome Azurol S

باکتری	۳۸	۰/۳۶**
خطا	۷۸	۰/۱۱
کل	۱۱۶	۰/۱۹
CV(%): ۱۶/۵۳		

** معنی داری در سطح ۱ درصد را نشان می دهد.



شکل ۱- مقایسه میانگین توان انحلال فسفات معدنی توسط جدایه ها

بالاترین مقدار قطر هاله به کلنی در محیط اسپربر در جدایه شماره ۷، ۱۵۳ و ۷۳ به ترتیب با میزان قطر هاله به کلنی ۳/۱۸، ۲/۶ و ۲/۵ مشاهده شد (شکل ۱). باکتری های خاکزی با تولید اسیدهای آلی، پروتون، ترکیبات کلات کننده و همچنین اسیدهای معدنی (سولفوریک، کربونیک و...) موجب افزایش انحلال فسفات های آلی و معدنی می شوند (Shahab et al,2008).

آزمون نیمه کمی انحلال فسفات های آلی

نتایج تجزیه واریانس توان تولید انحلال فسفات آلی توسط جدایه ها در جدول ۲ آمده است. با توجه به جدول تجزیه واریانس اثر باکتری ها در سطح ۱ درصد معنی دار بود. بالاترین مقدار قطر هاله به کلنی در محیط انحلال فسفات آلی مربوط به جدایه های شماره ۷، ۱۵۳ و ۷۲ بوده که به ترتیب میزان قطر هاله به کنی آن‌ها در زمان ۴۸ ساعت برابر ۵/۷۲، ۵/۵۲ و ۵/۲۵ بودند (جدول ۵). همچنین نتایج نشان داد میزان انحلال در جدایه در زمان های مختلف، متفاوت می باشد.

جدول ۲- جدول تجزیه واریانس توان انحلال فسفات آلی توسط سویه های جداسازی شده از دیم زارهای گندم

SOV	df	میانگین مربعات (MS)
باکتری	۳۸	۱۱/۱۶**
زمان	۳	۱۲۰/۵۴**
باکتری × زمان	۱۱۴	۰/۷۵**
خطا	۳۱۲	۰/۰۳
کل	۴۶۷	
CV(%): ۷/۹۳		

** معنی داری در سطح ۱ درصد را نشان می دهد.

جدول۳- مقایسه میانگین توان انحلال فسفات آلی توسط جدایه ها

باکتری	۱۲ ساعت	۲۴ ساعت	۳۶ ساعت	۴۸ ساعت
1	1.7q-x	2.51lmn	3.56ghi	4.87b

2	0G	0G	0G	0G
3	0G	2.50lmn	3.42hi	3.37hi
5	1.89q-x	2.67jkl	3.67fg	4.10cde
6	2o-u	2.95j	3.61fghi	3.79efg
7	1.33B-F	2.83jkl	4.31c	5.72a
8	0G	1.25DEF	1.95t-y	2.28i
9	1.94j	2.90hij	3.91j	4.98b
10	2.00h-j	3.28i	3.93j	5.52a
11	1.73t-y	2.72i-l	3.38hi	4.08cde
12	1.38a-f	2.23n-q	3.38jkl	4.38c
13	1.47z-E	1.40v-y	1.65AB	2.32mno
14	1.61	1.86r-y	2.60l-o	2.79jkl
16	0Gv-A	0G	1.26E	1.59p-v
19	0G	1.11F	1.80r-y	2.27m-p
29	1.17EF	1.41A-E	1.51z-A	2.19n-r
37	1.22DFE	2.00o-t	2o-u	2.11q-r
51	0G	0G	1.58t-w	1.66v-B
61	2.06n-r	2.90hij	3.71fg	4.21cd
72	2.00h-j	3.28i	3.93j	5.52a
73	1.62v-B	2.95j	3.52jk	4.71b
79	0G	1.78ijk	2.83i	3.24hij
80	0G	1.72i-l	2.10nop	3.33hi
85	1.83r-y	2.86i	2.96i	3.63hi
86	0G	0G	1.56t-w	2.29jk
87	0G	0G	1.50t-w	1.71t-w
89	1.87q-t	3.11j	3.89h	4.10cde
96	0G	1.44ABC	1.56t-w	3.19j
101	1.24DEF	1.62v-C	2.74jk	2.76i-l
115	2.06o-t	2.81j	3.48hi	4.43c
116	1.50y-E	3.14j	3.28jkl	4.29c
118	0G	0G	1.80r-y	2.58l-o
120	1.83r-y	3.11j	3.38hi	3.92cd
121	1.24DEF	2.38mno	3.21hij	3.63hi
122	2.27m-p	3.67d	3.73h	3.81hi
153	1.78u-x	3.17j	3.78jkl	5.28a
157	1.44y-B	3.06jk	3.67gh	4.19cd
163	0G	1.38A-F	2.14mno	3.71hij
164	0G	1.89s-y	2.38mno	4.24cd

آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور

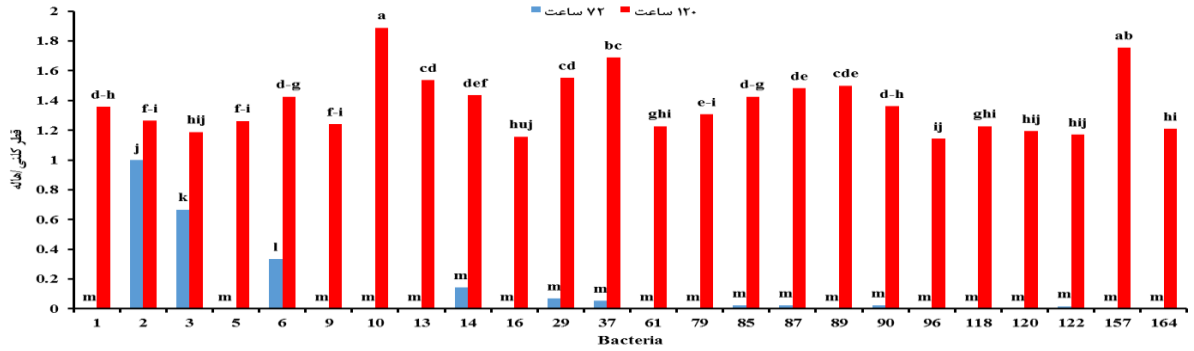
نتایج تجزیه واریانس توان تولید سیدروفور توسط جدایه در جدول ۴ آمده است. با توجه به جدول زیر اثر باکتری ها در سطح ۱ درصد معنی دار بود.

جدول ۴- جدول تجزیه واریانس توان تولید سیدروفور توسط سویه های جداسازی شده از دیم زارهای گندم

SOV	df	میانگین مربعات (MS)
باکتری	۲۳	۰/۱۳**
زمان	۱	۵۸/۷۱**
باکتری × زمان	۲۳	۰/۱۷**
خطا	۹۶	۰/۰۱
کل	۱۴۳	
CV(%): ۸/۵۳		

** معنی داری در سطح ۱ درصد را نشان می دهد.

بالاترین نسبت قطر هاله به کلنی در محیط CAS-agar در جدایه شماره ۱۰ بعد از ۱۲۰ ساعت برابر ۱/۸۵ مشاهده شد (شکل ۲). سیدروفورهای میکروبی می توانند با افزایش فراهمی آهن در خاک اطراف ریشه، رشد ریشه و جذب آهن را افزایش دهند (kloepper et al, 1980).



شکل ۲- مقایسه میانگین توان تولید سیدروفور توسط جدایه ها

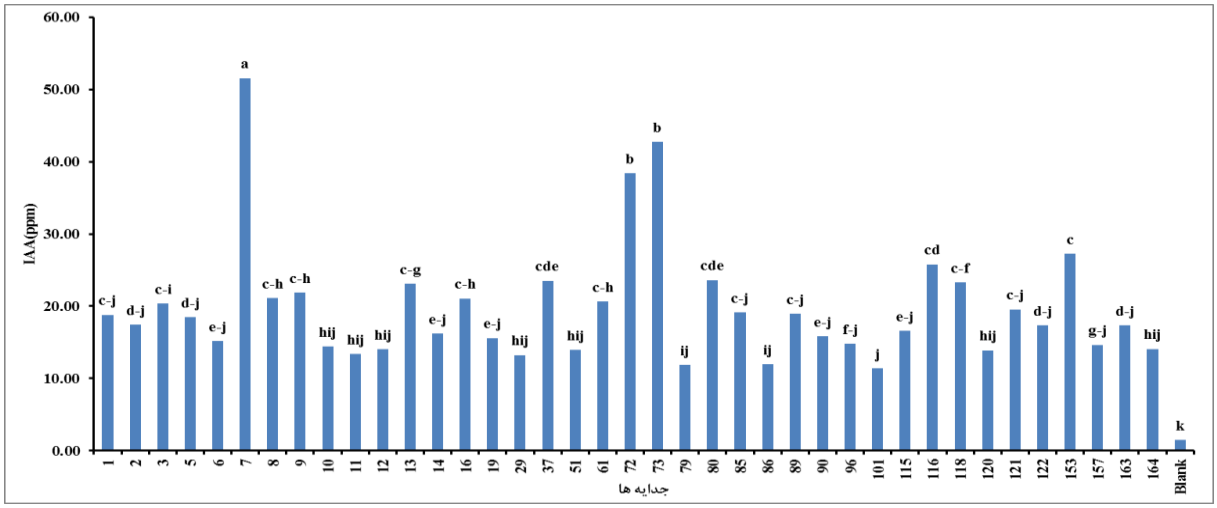
آزمون کمی توان تولید ایندول استیک اسید (IAA)

نتایج تجزیه واریانس توان تولید هورمون اکسین توسط جدایه در جدول ۵ آمده است. با توجه به جدول زیر اثر باکتری ها در سطح ۱ درصد معنی دار بود. نتایج مقایسه میانگین تولید هومون اکسین نشان می دهد که تمام باکتری های اختلاف معنی داری با شاهد نشان دادند. بالاترین مقدار تولید هورمون اکسین در جدایه شماره ۷ با ۵۱/۸ پی پی ام و کمترین مقدار در جدایه شماره ۱۰۱ با ۱۱/۴ پی پی ام مشاهده شد (شکل ۳). اکسین تولید شده توسط باکتری های خاک در دامنه بین ۵/۳۴ تا ۵۳/۲ پی پی ام می باشد (Ahmad et al,2005).

جدول ۵- جدول تجزیه واریانس توان تولید هورمون اکسین توسط سویه های جداسازی شده از دیم زارهای گندم

SOV	df	میانگین مربعات (MS)
باکتری	۳۸	۹۰۴/۰۸**
خطا	۷۸	۱۸/۵۵
کل	۱۱۶	۳۰۴/۶۴
CV(%): ۱۹/۹۹		

**** معنی داری در سطح ۱ درصد را نشان می دهد.**



شکل ۳- مقایسه میانگین توان تولید هورمون اکسین توسط جدایه ها

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده باکتری شماره ۷، ۷۲، ۷۳ و ۱۵۳ و ۱۰ علاوه بر داشتن توانایی انحلال فسفات های نامحلول معدنی بالا و متحمل به شوری و خشکی دارای برخی ویژگی های محرک رشد مانند تولید اکسین، انحلال فسفات های آلی و سیدروفور نیز بودند. این یافته ها نشان داد که این جدایه ها علاوه بر توانایی انحلال فسفات معدنی و افزایش حلالیت فسفر می توانند با تولید ایندول استیک اسید رشد ریشه را افزایش داده و بقای گیاه را در شرایط کمبود فسفر تضمین کنند. بنابراین در همین راستا سویه های برتر حل فسفات های نامحلول معدنی با توان تحریک رشد گیاه به منظور مطالعات درون شیشه ای و گلدانی در فاز بعدی تحقیق انتخاب شدند.

منابع

Ahmad, F., Ahmad, L. and Saghir. M. 2005. Indol acetic acid production by the indogenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of Tryptophan. Turkish Journal of Biology 29: 29-34.

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

Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N., and Antoun, H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. Plant and Soil. 287: 35-41.

Amara M.A.T., and Dahdoh M.S.A. 1997. Effect of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield and uptake of nutrients by wheat grown on sandy soils. Egypt. J. Soil Sci. 37: 467–484.

Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C. P. and Enebak, S. 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology 47: 793-800.

Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., and Chauhan, B. 2003. Microbial amylases: A biotechnological perspective. Proc. Biochem. 00: 1-18.

Kloepper, J., Leong, W. J., Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286: 885-886.

.Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1995. Influence of Plant Species on Disease Suppression by *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 with Enhanced Antibiotic Production. Plant Pathol. 44: 40-50.

Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro*conditions. Pakistan Journal of Biological Science 7: 187-196.

Shahab, S. and Ahmed, N. 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. African Journal of Biotechnology 7: 1543-1549.

Zhu.H. Yang.H., 2015.Isolation and Characterization of a Highly Siderophore Producing Bacillus subtilis Strain. Advances in Applied Biotechnology.Volume 332 of the series Lecture Notes in Electrical Engineering pp 83-92.

Assessment of certain Plant Growth Promoting indices of Bacteria Isolated from Wheat dry lands

L. Mohammadi[1], H. A. Alikhani[2], H. Eatsami[3], M. Beheshti[4]
Email: halikhan@ut.ac.ir
1- MSc student in University of Tehran **2-** Professor in University of Tehran **3-** Assistant Professor in University of Tehran **4-** PhD student in University of Tehran

Abstract

The results of this study showed that about 22% of isolated bacteria had the solubilizing capacity of inorganic insoluble phosphates with a halo diameter higher than 1.5 and tolerated by salinity and drought. The highest amount of halo diameter to colony diameter in organic phosphate solubilization was related to isolates No. 7, 153 and 72, respectively, with halo diameter to colony diameter of 5.72, 5.52 and 5.25 after 48 hours. Also, the highest rate of halo diameter to colony diameter in the CAS-agar medium was observed in isolate No. 10 after 120 hours equal to 1.85. The highest production of hormone auxin was found in isolate No. 7 with 51.8 ppm and the lowest in isolate No. 101 with 11.4 ppm. According to the results, Isolate 7, 73, 153, and 10, which had insoluble phosphate solubilization ability had high growth-promoting indices than other isolates and were chosen to be applied in vitro and pot studies in the next phase of research.

Key words: Plant Growth Promoting Rhizobacteria, auxin, sidrophore, solubilizing organic and inorganic phosphates.