بررسی توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن و اکسین در برخی از جدایه های *Azospirillum* بومی خاک های ایران

محمد حسین ارزانش[۱]، حسینعلی علیخانی[۲] ، کاظم خاوازی[۳] ، حشمت الله رحیمیان[۴]

[۱]استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، [۲]استادیار گروه مهندسی علوم خاک- دانشکده مهندسی آب و خاک - پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ، [۳]استادیار پژوهشی موسسه خاک و آب، [۴]استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات خاک و آب و استادگروه گیاهپزشکی – مجتمع آموزشی دانشگاه مازندران

مقدمه

تثبیت نیتروژن اولین مکانیسم پیشنهادی برای بیان رشد گیاهان تلقیح شده با ***Azospirillum*** بود. این نتیجه گیری براساس افزایش مقدار ترکیبات نیتروژنی و فعالیت نیتروژنازی در گیاهان تلقیح شده بود. چندین سال بعد مطالعات نشان دادند که سهم نیتروژن تثبیت شده توسط ***Azospirillum*** در افزایش رشدگیاه بین ۵ تا ۱۸ درصد از کل افزایش رشدگیاه است (**Bashan** و **Holguin** ، ۱۹۹۷). لذا در ادامه بررسی ها محققین تولید هورمون های گیاهی را عامل اصلی تحریک رشد گیاه توسط این باکتری دانستند. باکتری جنس ***Azospirillum*** قادر به تولید فیتوهورمون های متعددی است که باعث افزایش رشد ریشه ، بهبود جذب آب و عناصر معدنی و در نهایت تولید بیشتر محصول می شود (**Bashan** و همکاران ، ۱۹۹۷). تولید این هورمون های گیاهی توسط تعداد زیادی از محققین گزارش شده است. به طور مثال تولید اکسین ، جیبرلین و سیتوکنین در کشت های خالص ***A.brasilense*** توسط **Michiels** و همکاران (۱۹۸۹)گزارش گردید. لذا در این تحقیق این دو ویژگی جدایه های بومی با چهار گونه خارجی از شرکت **DSMZ** مقایسه شدند.

مواد وروش ها

برای تعیین توانایی تثبیت نیتروژن ملکولی جدایه های ***Azospirillum*** از روش **Turner** و**Gibson** (۱۹۸۰) استفاده گردید. در این آزمون میزان فعالیت نیتروژنازی جدایه های آزوسپیریلوم به روش احیای استیلن (**ARA**) توسط دستگاه **GC** (**Shimadzu GC-148**) مورد بررسی قرارگرفت. برای این منظور از لوله‌های کوچک شیشه‌ای به حجم **ml** ۱۵ دارای **ml** ۵ محلول **NFB** بعلاوهٔ نیم گرم در لیتر آگار استفاده شد. منحنی استاندارد اتیلن با تزریق گاز اتیلن خالص به دستگاه **GC** پس از قرادت و رسم ارتفاع و سطح زیر منحنی پیک اتیلن به وجود آمده در هر غلظت محاسبه گردید. برای تعیین غلظت اتیلن تولید شده توسط هر ایزوله ، مقدار ارتفاع یا سطح زیر منحنی قرائت شده توسط دستگاه **GC** ، پس از ۳/۶ دقیقه پس از تزریق ، یادداشت و با اتصال آن به منحنی، گاز اتیلن تولید شده محاسبه گردید.به منظور بررسی توان تولید اکسین از روش **Bric** و همکاران (۱۹۹۱) استفاده گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری از روش **Lin** و همکاران (۱۹۸۳)استفاده شد. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه های مختلف ***Azospirillum*** در آب مقطر با استفاده از پیپت به ارلن های حاوی محیط کشت **NB** و**NB** بعلاوه ۵۰ میلی گرم تریپتوفان در لیتر تلقیح شدند. ارلن های تلقیح شده را در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با دور ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بعد از این مدت ۱/۵ میلی لیتر از محتویات ارلن به داخل لوله های اپندرف ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. یک میلی لیتر از این محلول با ۲ میلی لیتر از معرف سالکوفسکی (شامل ۱۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ ، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی لیتر $FeCl_3.6H_2O$ نیم مولار) مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شدند. مقدار اکسین تولیدی با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

نتایج وبحث

نتایج آزمایشات نشان داد که بین گونه های مختلف ***Azospirillum*** از لحاظ میزان تثبیت نیتروژن ملکولی تفاوت وجود دارد.دربین جدایه های استاندارد بیشترین میزان تثبیت نیتروژن مربوط به گونه ***A.irakense(*****DSM 11586*****)*** و کمترین مقدار تثبیت نیتروژن مربوط به گونه ***A.halopraeferens*** تعلق داشت. بیشترین میزان نیتروژن تثبیت شده در بین جدایه های بومی مربوط به جدایه ***AZ25*** به میزان ۵۸/۷۷ نانومول اتیلن در ساعت انکوباسیون و بعد از آن جدایه های ***AZ11*** ، ***AZ45*** و ***AZ1*** به میزان ۴۵/۸۶ ، ۳۹/۰۰ و ۳۴/۲۴ نانومول اتیلن در ساعت قرار داشتند.در بین جدایه های مختلف ***Azospirillum*** در زمینه مقدار تولید اکسین تفاوت وجود داشت. اما، همه جدایه های انتخابی توانایی تولید اکسین را داشتند. بیشترین میزان تولید اکسین بین جدایه های خارجی و بومی مربوط به سویه استاندارد خارجی ***A.brasilense(*****DSM 1690*****)*** و سویه بومی **AZ40** بود. جدایه های بومی ***AZ50***، ***AZ47*** و***AZ35*** دارای بیشترین مقدار تولید اکسین بودند. که این مقدار تولید اکسین معادل ۶۰/۵، ۶۲/۶۳و ۶۰/۸۱ در صد مقدار اکسین تولید شده توسط سویه خارجی**DSM 1690** بود.

فهرست منابع

- Bric ,J.,Bostock ,R.M.,Silverstone,S.E.1991.Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane.Applied and Environmental Microbiology.57:535-538
- Turner ,G.L., Gibson, A.H. (1980). Measurements of Nitrogen Fixation by Indirect Means. In: *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, F.J. Bergerson (Ed.), John Wiley & Sons, New York pp. 111–138
- Bashan, Y., and Holguin, G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). Can. J. Microbiol. 43: 103–121.
- Michiels K, Vanderleyden J, Van Gool, A. (1989). *Azospirillum* plant root association: a review. Biol Fertil Soils 8 :356–368

- Lin,W.,Okon,Y.,Hardy, R.W.F(1983).Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense.*Applied and Environmental Microbiology 45(6):1775-1779