بررسی تأثیر تلقیح سویه‌های سودوموناس فلورسنت دارای توان تولید IAA و ACC دآمیناز بر رشد نهال‌های پسته

گلنارحسنی[۱]*، عبدالرضااخگر و احمدتاج‌آبادی‌پور

دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم خاک دانشگاه ولی‌عصررفسنجان؛ **golnar_hasani@yahoo.com**

استادیارگروه علوم خاک دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان؛ **arakhgar@yahoo.com**

دانشیارگروه علوم خاک دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان؛ **ahtajabadi@yahoo.com.au**

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی توان سویه‌های دارای توانایی تولید اکسین و ACC دآمیناز، در افزایش رشد نهال‌های پسته انجام گرفت. بدین منظور از ریزوسفر نهال‌های پسته، تعداد ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت جداسازی و خالص‌سازی گردید. شناسایی گونه این جدایه‌ها بر اساس نتایج آزمون‌های میکروسکوپی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی انجام شد و نتایج نشان داد که ۴۹ جدایه متعلق به گونه Pseudomonas fluorescens بودند و سه تا از جدایه‌ها به‌صورت Pseudomonas sp. گزارش گردیدند. سپس جدایه‌ها از نظر توان تولید IAA و ACC دآمیناز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس توانایی جدایه‌ها در تولید مقادیر مختلف IAA و ACC دآمیناز، تعداد ۶ جدایه از میان ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت انتخاب و در یک آزمون گلخانه‌ای تأثیر سویه‌ها بر مورفولوژی ریشه و شاخص‌های رشد نهال‌های پسته مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که کاربرد اکثر سویه‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد برگ، سطح برگ، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی نهال‌های پسته گردید.

واژه‌های کلیدی: اکسین، مورفولوژی ریشه، شاخص‌های رشد نهال‌های پسته

مقدمه

در دهه‌های اخیر، استفاده از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[۲] به‌منظور بهبود و افزایش رشد گیاهان در سطح وسیعی افزایش یافته است. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه گروهی از باکتری‌های ریزوسفری مفید می‌باشند که می‌توانند به طور مستقیم (تثبیت نیتروژن، حل‌کردن فسفات‌های نامحلول، تأمین آهن از طریق تولید سیدروفورها، تولید هورمون‌های گیاهی چون اکسین‌ها و ... و کاهش اتیلن تنشی) و یا غیرمستقیم (کاهش یا ممانعت از اثرات مضر عوامل بیمارگر گیاهی) موجب افزایش رشد گیاه شوند (گلیک، ۱۹۹۵). ترشح هورمون‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های تحریک‌کننده رشد گیاه است (زهیر و همکاران، ۲۰۰۴). هورمون‌های گیاهی به شدت بر رشد و توسعه‌ی گیاهان مؤثرند و از میان آنها اکسین‌ها از مهم‌ترین تنظیم کننده‌های رشد می‌باشند (استپانووا و همکاران، ۲۰۰۹). اکسین‌ها گروهی از هورمون‌های گیاهی هستند که معمول‌ترین و شناخته شده‌ترین آنها

---

[۱] نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، میدان ۲۲ بهمن، بلوار ولایت، دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان، گروه علوم خاک، صندوق پستی: ۵۱۸

* دریافت: آذر ۱۳۹۰ و پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۱

[2] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

Archive of SID

www.SID.ir

ایندول-۳-استیک‌اسید (IAA) است.

IAA از طریق متابولیسم ال- تریپتوفان[1] به‌عنوان پیش ماده توسط گیاهان و خیلی ازمیکروارگانیسم‌های خاک از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها تولید می‌شود (سارور و کرمر، ۱۹۹۵). از میان میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه که توانایی تولید IAA را دارند می‌توان به ازتوباکتر، سودوموناس، آزوسپریلوم، ریزوبیوم، باسیلوس، انتروباکتر و قارچ‌های مایکوریزی اشاره کرد(پتن و گلیک، ۱۹۹۶). غلظت‌های بالای اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت یک خصوصیت بارز برای اکثر این باکتری‌ها است (احمد و همکاران، ۲۰۰۵). پتن و گلیک (۲۰۰۲) با انجام یک آزمایش، مقایسه‌ای بین بذرهای کلزا تلقیح شده با باکتری *سودوموناس پوتیدا* GR12-2 قادر به تولید اکسین و بذرهای تلقیح شده با موتانتی که فاقد توانایی تولید اکسین بود مشاهده کردند که ریشه‌های اولیه حاصل از بذرهای تیمارشده با سویه‌ی وحشی GR12-2 به‌طور متوسط ۵۰-۳۵ درصد بلندتر از بذرهای تیمارشده با باکتری موتانت و تیمار تلقیح نشده (شاهد) بودند و طول ریشه‌های حاصل از بذرهای تلقیح شده با موتانت با طولریشه‌های حاصل از بذرهای شاهد تفاوتی نداشت. پیوندی و همکاران (۲۰۱۰) تشکیل ریشه و ساختار ریشه‌ی نهال‌های زیتون تلقیح شده یا نشده با دو سویه‌ی سودوموناس فلورسنت (P21،P19) را با اندازه‌گیری طول و تعداد ریشه‌های فرعی مورد ارزیابی قرار دادند. در این آزمایش جمعیت‌های متفاوتی از باکتری (۰و ۱۰۵و ۱۰۸ باکتری در میلی‌لیتر) به‌عنوان تیمار استفاده گردید و در تراکم جمعیت ۱۰۸باکتری در میلی‌لیتر تقریباً دو برابر افزایش در تعداد و طول ریشه‌ها نسبت به تراکم جمعیت ۱۰۵ باکتری در میلی‌لیتر مشاهده شد. عرب و همکاران (۱۳۸۷) مشاهده کردند کاربرد باکتری آزوسپریلوم دارای توان تولید اکسین به گیاه ذرت شیرین اثر معنی‌داری بر وزن تر و خشک ریشه، وزن اندام هوایی و نیز میزان جذب نیتروژن و فسفر داشت. در این تحقیق افزایش سطح و وزن خشک ریشه در مقایسه با شاهد و در نتیجه افزایش جذب مواد غذایی، یکی از دلایل افزایش عملکرد گیاهان تلقیح شده در نظر گرفته شد. کارنوال (۲۰۰۹) ۳۰ جدایه‌ی سودوموناس فلورسنت (۱۵جدایه *P. aeruginosa* و ۱۵ جدایه *P. fluorescens*) را از ریزوسفر گیاهان مختلف جداسازی کرد. در بین جدایه‌های مورد آزمایش، دو جدایه Pseudomonas fluorescens AK1 و Pseudomonas aeruginosa Ak2 بیشترین افزایش رشد گیاه را نشان دادند.

اتیلن در رشد و توسعه‌ی گیاه و رسیدگی میوه اهمیت زیادی دارد با این حال افزایش غلظت اتیلن باعث کاهش رشد ریشه و متعاقباً کاهش جذب آب و عناصر غذایی و در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه می‌گردد (ابلس و همکاران، ۱۹۹۲). باکتری‌های دارای آنزیم ACC دآمیناز از طریق کاهش سطح اتیلن موجب افزایش طول ریشه و رشد گیاه می‌شوند (احمد و همکاران، ۲۰۰۸). در خصوص توانایی سودوموناس‌های فلورسنت در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و به عبارت دیگر تولید آنزیم ACC دآمیناز گزارشات متعددی ارائه شده است (ونگ و همکاران، ۲۰۰۰؛ پنروز و گلیک، ۲۰۰۳).

جلیلی و همکاران (۱۳۸۸) سودوموناس‌های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی ارقام کلزا در سطوح مختلف شوری را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سویه‌ها متفاوت بود. هم‌چنین نتایج بررسی ارقام کلزای تلقیح شده با سویه‌های منتخب نشان داد که میزان جوانه-زنی در جدایه‌هایی که دارای فعالیت ACC دآمیناز بودند نسبت به شاهد و نیز نسبت به جدایه‌های فاقد این ویژگی در شرایط شور به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. شاهو همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که سویه‌های Entrobacter cloacae و Pseudomonas putida به دلیل داشتن آنزیم ACC دآمیناز و کاهش سطح اتیلن گیاهی، طول ریشه گیاه کلزا را افزایش دادند. تلقیح باکتری‌های ریزوسفری جداسازی شده از ریزوسفر گیاه نخود که قادر به مصرفACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن بودند باعث افزایش طول ریشه، تعداد و طول ریشه‌های فرعی و بیوماس ریشه گیاه نخود در مقایسه با شاهد شد (شاهزاد و همکاران، ۲۰۱۰). پال و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که از ۲۳۰ سویه دارای آنزیم ACC دآمیناز ۹ سویه توانستند طول ریشه بادام زمینی را در حد معنی‌داری افزایش دهند که در بین این ۹ سویه ۶ سویه متعلق به گروه سودوموناس‌های فلورسنت بود. با توجه به تحقیقات انجام شده که تماماً نقش مثبت باکتری‌های دارای توان تولید IAA و آنزیمACC deaminas را در افزایش رشد گیاه نشان می‌دهند و هم‌چنین لزوم استفاده از راهکارهای بیولوژیک به‌منظور جلوگیری از کاربرد بی‌رویه کودهای شیمیایی، برنامه این تحقیق طراحی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت

به‌منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری نهال-های پسته، تعداد ۱۰ نمونه خاک به‌صورت تصادفی از مناطق پسته‌خیز شهرستان رفسنجان از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری در محدوده‌ی سایه‌انداز درخت انتخاب گردید.

[1] L-Tryptophan

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌های خاک پس از هواخشک کردن، کوبیدن و الک کردن به ۱۰ گلدان ۳ کیلوگرمی منتقل گردیدند. بذرهای پسته (رقم بادامی زرندی) پس از جداسازی پوست سخت و ضدعفونی سطحی به مدت ۲۴ ساعت در یک لیتر آب مقطر استریل نگهداری شدند. برای جوانه‌دار کردن، بذرها بر روی واتر- آگار[1] در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و درون انکوباتورنگه‌داری شدند. در هر گلدان تعداد ۶ بذر جوانه-دارشده کشت و گلدان‌ها برای مدت دو ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت ریشه نهال‌های پسته از خاک خارج و ۱۰ گرم از خاک ریزوسفری به همراه ریشه به‌منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس‌فلورسنت به آزمایشگاه منتقل گردید. برای تشخیص و جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت پس از تهیه سری رقت، از هر یک از رقت‌ها درون پلیت-های حاوی King B پخش گردید. پلیت‌های حاوی کلنی-های رشدیافته در محیط کشت King B در معرض نور UV قرار داده شدند و از کلنی‌های دارای خاصیت فلورسنت در رقت‌های بالا و به‌طور تصادفی تعداد ۵۲ جدایه انتخاب و پس از اطمینان کامل از خلوص جدایه‌ها تا زمان استفاده، بر روی محیط کشت شیبدار و درون یخچال نگه‌داری شدند.

شناسایی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

در انتخاب باکتری‌های موردنظر از کلنی‌های دارای خاصیت فلورسنت تعداد ۵۲ کلنی باکتری از پلیت-های حاصل از رقت‌های بالای خاک ریزوسفری نهال‌های پسته به‌صورت تصادفی برداشته و خالص‌سازی شدند. به-منظور تعیین گونه این جدایه‌ها از آزمون‌های پیشنهاد شده توسط بوسیس و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. به‌این منظور بر روی تمامی جدایه‌ها، آزمون‌های گرم، تحرک جدایه‌ها، آرژینین دی‌هیدرولاز، اکسیداز، کاتالاز، رشد در دمای ۴ و ۴۱ درجه سلسیوس، ذوب ژلاتین، توان استفاده از قندهای ترهالوز و آرابینوز، تولید لوان و احیای نیترات انجام گرفت.

اندازه‌گیری میزان تولید IAA جدایه‌ها

بدین منظور از روش بنت و همکاران (۲۰۰۱) با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB[2](هر لیتر شامل ۱۷ گرم پپتون کازئین، ۳ گرم پپتون سویا، ۵ گرم NaCl، ۲/۵ گرم K2HPO4 و ۲/۵ گرم دکستروز) کشت داده شدند. سپس۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها مجدداً به ۲۰ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی۱-µgml۵۰ ال-تریپتوفان منتقل و برای ۷۲ ساعت تکان داده شد. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون‌های مذکور سانتریفیوژ گردیدند. سپس۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر 6H2O, FeCl3.0.5M) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه-ی جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت-های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و۳۰ میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

تعیین توانایی جدایه‌ها در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن

برای انتخاب جدایه‌های قادر به استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن از روش دل‌آمیکو و همکاران (۲۰۰۵) با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور ابتدا هر جدایه در محیط TSB کشت داده شد. پس از کشت مجدد هر جدایه درTSB مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه‌ی هر جدایه به۲۰ میلی‌لیتر از محیط حداقل DF، محیط DF حاوی ۳ میلی‌مولار ACC و محیط DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم منتقل و به مدت ۴۸ ساعت رویشیکر تکان داده شد. در آخر دانسیته نوری (OD) این محیط‌ها به عنوان معیاری از رشد باکتری در آن محیط، در طول موج ۴۰۵ نانومتر به‌وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

آزمون گلخانه‌ای

بر اساس توانایی جدایه‌ها در تولید مقادیر مختلف IAA و توان مصرف ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن، تعداد ۶ جدایه از میان ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت انتخاب و در یک آزمون گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی (با ۷سطح باکتری شامل ۶ تیمار باکتری و یک تیمار بدون باکتری به عنوان شاهد) در بستر شن شسته شده با اسید و استریل شده، درون تیوب‌هایی به قطر ۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵سانتی‌متر، در ۴ تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمون از بذر پسته رقم بادامی زرندی استفاده شد. بذرهای پسته پس از جداسازی پوست سخت، جهت ضدعفونی سطحی ۱۰ دقیقه در محلول۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم قرارداده شدند. به‌منظورحذف هیپوکلریت سدیم، بذرها ۸ تا ۱۰ بار با آب مقطر استریل شسته و به مدت ۲۴ ساعت در یک ظرف سربسته استریل خیسانده شدند. آنگاه بذرها جهت جوانه‌دارشدن بر روی واتر-آگار قرارداده و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به

1. Water Agar
2. Trypton Soya Bean

Archive of SID

www.SID.ir

مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور نگه‌داری شدند. در هر تیوب یک بذر پسته جوانه‌دارشده کشت شد. هنگام کاشت بذرها، هر بذر با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری موردنظر تلقیح گردید و سپس رطوبت خاک تیوب‌ها به حدظرفیت زراعی رسانده شدند. درطول دوره رشد از محلول غذایی هوگلند (هوگلند و آرنون، ۱۹۵۰). به‌منظور تأمین عناصر غذایی موردنیاز نهال‌های پسته استفاده گردید. پس از گذشت ۲۰ روز از کشت، ابتدا بخش هوایی نهال‌ها از محل طوقه قطع، سپس طول اندام هوایی و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. آنگاه برگ‌ها از ساقه جدا و وزن تر، تعداد و سطح برگ‌های نهال‌های پسته در هر تیوب اندازه‌گیری شد. پس از آن خاک هر تیوب به همراه ریشه‌ی داخل آن در ظرفی پر از آب به آرامی برگردانده و شن اطراف ریشه با دقت جدا گردید. سپس ضمن بررسی مورفولوژی ریشه-ها و عکس‌برداری، وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. در آخر هر یک از نمونه‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و برگ، ساقه و ریشه‌های خشک شده نهال‌ها به‌طور جداگانه توزین گردید.

تجزیه‌های آماری

تجزیه واریانس کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

شناسایی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

وجه تمایز سودوموناس‌های فلورسنت از سایر سودوموناس‌ها، تولید پیگمان‌هایی است که در برابر نور فرابنفش خاصیت فلورسنس دارند. با توجه به نتایج آزمون‌های تعیین گونه، همه‌ی جدایه‌ها به جزء جدایه‌های ۲۶، ۴۱ و ۴۶ در گونه Pseudomonas fluorescens قرار گرفتند. جدایه‌های مذکور به‌دلیل عدم تطابق نتایج با مندرجات کتاب Bergey، به‌صورت Pseudomonas sp. گزارش شدند.

اندازه‌گیری توانایی جدایه‌ها در تولید IAA و مصرف ACC

نتایج حاصل از آزمون تولید IAA جدایه‌های مورد مطالعه در محیط TSB حاوی۵۰ میکروگرم در میلی-لیتر ال- تریپتوفان نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید IAA بودند و در دامنه‌ای از ۰/۶۸ تا ۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر تغییر می‌کرد. بیشترین مقدار تولید IAA مربوط به جدایه‌های ۳۹ و ۴۰ با مقادیر به ترتیب ۷/۵ و ۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و کمترین آن مربوط به جدایه ۱۵ با مقدار ۰/۶۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. خاکی‌پور و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیقی۵۰ سویه‌ی سودوموناس فلورسنت را از نظر ترشح ترکیبات اکسین مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که ۷۸٪ سویه‌ها قادر به تولید IAA بودند. مقدار IAA تولید شده توسط سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* از ۰ تا ۳۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و مقدار تولید شده توسط *سودوموناس پوتیدا* از ۰ تا ۲۴/۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. نتایج بررسی جدایه‌ها از نظر توان مصرف ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن نشان داد که از میان ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت، تعداد ۳۲ جدایه (۶۸٪) قادر به استفاده از ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن بودند. بیشترین مقدار دانسیته نوری در سوسپانسیون‌های باکتریایی رشد کرده در محیط DF+ACC مربوط به جدایه‌های ۳۳، ۴۸، ۳۶، ۳۸، ۳۷، ۳۴، ۳۱، ۳۹، ۴۰ و ۴۲ بود و کمترین آن متعلق به سوسپانسیون جدایه‌های ۲۲، ۱۱، ۲۶، ۴۶ و ۲۴ بود. هم‌چنین هیچ‌کدام ازجدایه‌های مورد آزمایش قادر به رشد در محیطDF فاقد منبع نیتروژنی نبودند. جدایه‌های ۲۶ و ۴۶ نیز در محیط DF+(NH4)2SO4 با وجود منبع نیتروژن رشد نکردند. اخگر و همکاران (۱۳۸۷) گزارش کردند از میان ۱۰۵ جدایه جدا شده از خاک ریزوسفری کلزا، ۱۵ جدایه دارای توان تولید ACC دآمیناز بودند. شناسایی این جدایه‌ها نشان داد که تمامی جدایه‌ها در گروه سودوموناس‌های فلورسنت قرار می‌گرفتند و آزمون‌های مربوط به تعیین گونه نیز نشان داد که ۱۴ جدایه متعلق به گونه P. flurescens بودند. هم-چنین اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دآمیناز جدایه‌ها نشان داد که فعالیت این آنزیم در جدایه‌های مورد آزمایش متفاوت بوده و از ۱/۴۳ تا ۸/۱۷ میکرومول آلفاکتو بوتیرات بر میلی‌گرم در ساعت متغیر بود. عباس‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) ۴۰ سویه *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس پوتیدا* جداسازی شده از ریزوسفر گندم و کلزا را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی نشان داده شد که چهار سویه WP1، WP150، WP159 (Pseudomonas fluorescens) و CFU10 (Pseudomonas sp.) قادر به رشد در محیط DF حاوی ACC هستند.

مقادیر IAA و دانسیته نوری سوسپانسیون‌های حاصل از رشد جدایه‌های منتخب در سه محیط DF ، DF+ACC و DF+(NH4) 2SO4 در جدول ۱ ارائه شده‌است.

بررسی تأثیر سویه‌های دارای توان تولید IAA و مصرف ACC بر رشد نهال‌های پسته در شرایط استریل

تایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد اکثر سویه‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد برگ، سطح برگ، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی نهال‌های پسته گردید. همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شود تعداد برگ گیاهان تیمار شده با سویه‌های مورد آزمون نسبت به شاهد (B) افزایش نشان داده است و به جزء تیمار با سویهP21 بقیه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان می‌دهند. گیاهان تیمار شده با سویه‌های P50، P31 وP29 بیشترین افزایش را در تعداد برگ نسبت به شاهد نشان دادند و تعداد برگ نهال‌های پسته را به ترتیب به مقدار ۲۴٪، ۲۱٪ و ۲۱٪ نسبت به شاهد افزایش دادند. هم‌چنین نتایج نشان داد به جزء سویه P40، تمامی سویه‌ها به‌طور معنی‌داری سطح برگ نهال‌های پسته را تا ۷۱٪ نسبت به شاهد افزایش دادند (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، وزن تر اندام هوایی نهال‌های پسته در تیمار با تمامی سویه‌ها به جزء سویه P40 نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. سویه‌های باکتری وزن تر اندام هوایی نهال‌های پسته را تا ۴۲٪ نسبت به شاهد افزایش دادند. هم‌چنین سویه‌های مورد آزمایش وزن خشک اندام هوایی گیاهان تیمار شده را نسبت به شاهد افزایش دادند لیکن این افزایش برای اکثر تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار نبود و در بین سویه‌های مورد آزمایش تنها دو سویه P21 و P29 توانستند وزن خشک اندام هوایی را به‌طور معنی‌داری و به ترتیب به مقدار ۵۳٪ و ۵۰٪ نسبت به شاهد افزایش دهند (شکل۴).

همان‌طورکه ملاحظه می‌شود سویه P40 در تمام شاخص‌های رشد به جزء تعداد برگ اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد و کمترین تأثیر را بر شاخص‌های رشد نهال‌های پسته داشت. با توجه به اینکه سویه P40 دارای توانایی تولید مقدار زیاد IAA است به نظر می‌رسد که غلظت زیاد IAA باعث ایجاد اثرات متقابل بین اکسین و ACC شده و کاهش رشد گیاه را به‌دنبال داشته است. بین آنزیم ACC دآمیناز و هورمون گیاهی اکسین اثرات متقابلی وجود دارد، به این صورت که IAA سنتز شده توسط باکتری‌ها، در صورتی که باعث افزایش مقدار IAA درون بافت‌های ریشه به مقدار بهینه شود، قادر خواهد بود با افزایش تقسیم و تمایز سلولی رشد گیاه را افزایش دهد. اما چنانچه IAA باکتریایی مقدار IAA درون بافت‌های ریشه را به بیش از حد مورد نیاز خود افزایش دهد ممکن است با تحریک فعالیت آنزیم ACC سنتتاز و افزایش میزان ACC پس از جوانه‌زنی بذر، رشد و توسعه‌ی سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان را متوقف کند (گلیک و همکاران، ۱۹۹۸). هم‌چنین اگرچه بین وزن تر و خشک ریشه نهال‌های پسته تیمارشده با سویه‌های مورد آزمایش با شاهد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد لیکن بررسی مورفولوژی ریشه نهال‌های پسته نشان داد که اکثر سویه‌های مورد آزمایش توانستند طول ریشه‌ی اصلی و تراکم ریشه‌های جانبی نهال‌های پسته را افزایش دهند (شکل ۵).

افزایش رشد ریشه یکی از مهم‌ترین معیارها برای سنجش اثرات مفید باکتری‌های محرک رشد گیاه است. توسعه سریع ریشه‌ها چه از طریق افزایش طول ریشه‌های ابتدایی و چه با تکثیر ریشه‌های جانبی و نابجا، یک راه مناسب برای گیاهچه‌های جوان است که توانایی خود را برای استقرار در خاک و جذب مواد غذایی افزایش دهند (پتن و گلیک، ۲۰۰۲). آکان(۱۹۸۵) برای اولین بار اکسین را به‌عنوان عامل مؤثر افزایش تراکم تارهای کشنده و ریشه‌های جانبی گیاهان گزارش نمود. هم‌چنین نشان داده شده است که باکتری‌های PGPR دارای توانایی تولید IAA، باعث طویل شدن و تکثیر سلول‌های گیاهی می‌شوند (کلوپر، ۲۰۰۳).

پال و سارما (۲۰۰۶) اثر تلقیح ۵ سویه سودوموناس فلورسنس دارای توانایی تولیدهورمون‌های محرک رشد از قبیل IAA و GA را بر فلفل سیاه مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی نشان داده شد که کاربرد باکتری به‌طور معنی‌داری وزن خشک ریشه (۱۳۵–۳۰ درصد)، طول ریشه (۱۲۷–۱۲ درصد)، سطح ریشه (۲۰۰–۴۳ درصد) و تعداد ریشه (۱۳۷–۸۲ درصد) را افزایش داد. گراول و همکاران (۲۰۰۷) افزایش طول ریشه، وزن تر ریشه و اندام هوایی نهال‌های گوجه‌فرنگی را در اثر تلقیح با باکتری‌های *Pseudomonas putida* و *Trichoderma atrovirde*که دارای توانایی تولید IAA بودند را گزارش کردند. باکتری‌های دارای آنزیم ACC دآمیناز از طریق کاهش سطح اتیلن موجب افزایش طول ریشه و رشد گیاه می‌شوند (احمد و همکاران، ۲۰۰۸). اخگر و خاوازی (۱۳۸۸) به‌منظور بررسی نقش آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی در کاهش اثرات منفی شوری بر رشد کلزا، یک سویه *Pseudomonas fluorescens* P12 دارای توان تولید ACC دآمیناز را با سویه موتانت آن Pm12 مقایسه کردند. نتایج نشان داد که سویه تیپ وحشی توانست هم در شرایط شور و هم در شرایط غیرشور کلیه شاخص‌های رشد کلزا شامل وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، طول اندام هوایی و مقدار سبزینگی برگ را نسبت به سویه موتانت به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. در این آزمون با توجه به اینکه تمام سویه‌های مورد آزمایش توانایی مصرف ACC و تولید IAA را داشتند و از طرف دیگر تمامی سویه‌ها متعلق به گروه سودوموناس‌های فلورسنت و فاقد توانایی تثبیت نیتروژن بودند وهم‌چنین بستر نهال‌های پسته، شن شسته شده با اسید و فاقد هر گونه منبع نامحلول

Archive of SID

www.SID.ir

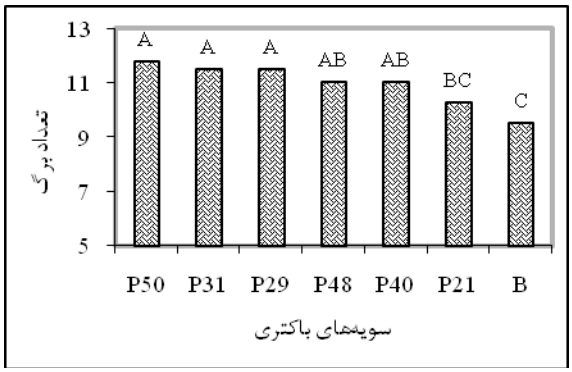
عناصر غذایی پرمصرف و کم مصرف بود. لذا افزایش رشد نهال‌های پسته را نمی‌توان به خصوصیاتی چون توانایی تولید سیدروفور و یا انحلال فسفات‌های معدنی که باعث افزایش حلالیت و قابلیت دسترسی عناصر غذایی به‌ویژه فسفر و آهن می‌شود نسبت داد. از این رو به نظر می‌رسد سویه‌های مورد آزمایش از طریق افزایش رشد ریشه به‌ویژه افزایش ریشه‌های جانبی و تارهای کشنده و در نتیجه افزایش سطح جذب باعث افزایش رشد نهال‌های پسته شده باشند.

نتیجه‌گیری کلی

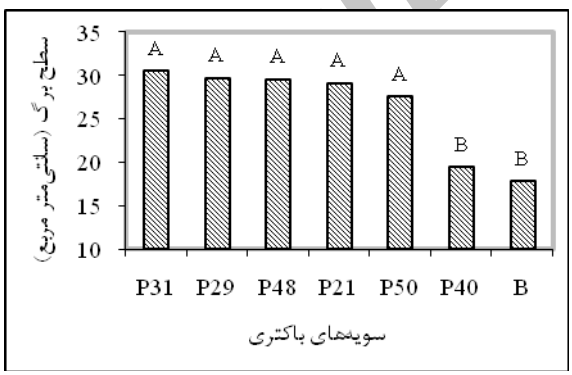
نتایج حاصل از شناسایی نشان داد که در بین باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر نهال‌های پسته، *Pseudomonas fluorescens* گونه غالب بود. هم‌چنین نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد که سویه‌های منتخب که از ویژگی توان تولید IAA و مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن برخوردار بودند، توانستند شاخص‌های رشد (اندام هوایی و ریشه) نهال‌های پسته را افزایش دهند. از آنجائیکه این سویه‌ها متعلق به گروه سودوموناس‌های فلورسنت هستند و به‌صورت غیراختصاصی عمل می‌کنند لذا امید است که با به‌کارگیری این سویه‌ها به شکل کود زیستی در گیاه پسته و سایر گیاهان به ویژه گیاهان زراعی بتوان شاهد افزایش رشد و محصول این‌گونه گیاهان نیز باشیم.

جدول۱- مقادیر IAA و دانسیته نوری سوسپانسیون‌های حاصل از رشد جدایه‌های منتخب در سه محیط DF، DF+ACC و DF+(NH4)2SO4

جدایه	DF	DF+ACC	DF+(NH4)2SO4	IAA (µg ml-1)
P21	۰/۱۱۵	۱/۵۳۳	۲/۲۷۳	۲/۱۲
P29	۰/۱۵۹	۱/۶۱۱	۲/۰۱۵	۵/۰۶
P31	۰/۱۳۴	۱/۸۱۸	۲/۳۳۰	۲/۷۰
P48	۰/۳۲۸	۱/۹۰۶	۱/۹۴۳	۳/۶۸
P50	۰/۳۳۱	۱/۶۹۰	۲/۲۳۴	۱/۴۲

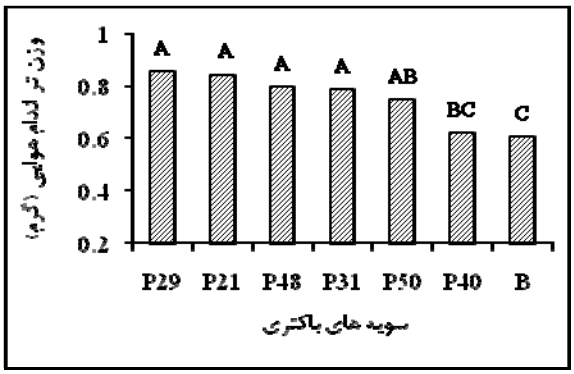


شکل ۱- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری برتعداد برگ

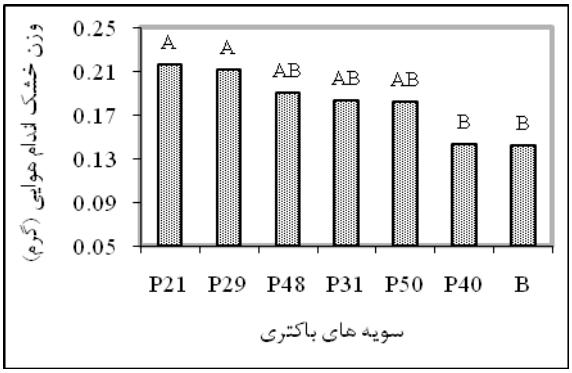


شکل ۲- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر سطح برگ

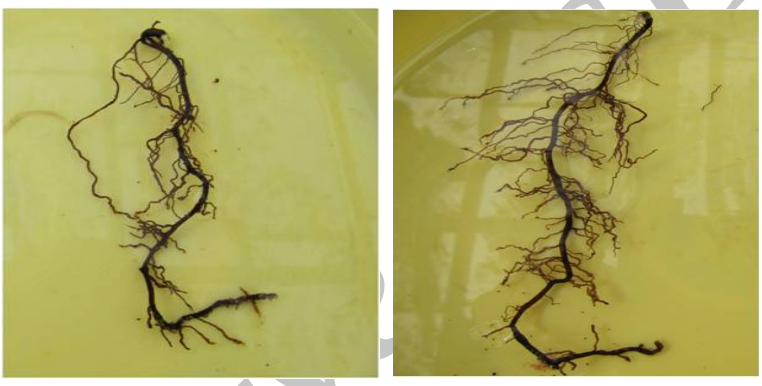
www.SID.ir



شکل ۳- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر وزن تر اندام هوایی



شکل ۴- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بروزن خشک اندام هوایی



Blank P21

شکل ۵- مورفولوژی ریشه پسته تیمار شده با باکتری P21 و شاهد بدون تلقیح

فهرست منابع:

۱. اخگر، ع. ر. و ک. خاوازی. ۱۳۸۸. نقش آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی در کاهش اثرات منفی شوری بر رشد کلزا. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). ۱۵۶-۱۵۴ :(۱)۲۴.

۲. اخگر، ع. ر.، ن. صالح راستین، ک. خاوازی و ع. ر. شعرای‌نجاتی. ۱۳۸۷. جداسازی، شناسایی و تعیین فعالیت آنزیم ACC Deaminaseباکتری‌های غالب ریزوسفر کلزا در خاک‌های شور. مجله علوم خاک و آب. ۸۱-۶۹ :(۱)۲۲.

۳. جلیلی، ف.، ک. خاوازی، ا. پذیرا، ع. ر. نجاتی و ه. اسدی‌رحمانی. ۱۳۸۸. تأثیر سودوموناس‌های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase درتعدیل اثرات مضر شوری بر کلزا در مرحله جوانه زنی. مجله پژوهشهای خاک (علوم خاک و آب).۱۰۶- ۹۱ :(۱)۲۳.

۴. عرب، س. م.، غ. اکبری، ح. علیخانی، م. ح. ارزانش و ا. ا. دادی. ۱۳۸۷. بررسی توانایی تولید اکسین توسط باکتری جداسازی شده بومی جنس آزوسپیریوم و ارزیابی اثرات محرک رشدی جدایه برتر بر گیاه ذرت شیرین. مجله پژوهشهای زراعی ایران. ۲۲۲-۲۱۷ :(۶)۲.

Archive of SID

www.SID.ir

5. Abbas- Zadeh, P., N. Saleh- Rastin, H. Asadi- Rahmani, K. Khavazi, A. Soltani, A. R. Shoary- Nejati, and M. Niransari. 2010. Plant growth, promoting activities of fluorescent Pseudomonads isolated from the Iranian soils. Actaphysoil.plant. 32: 281-288.
6. Abeles, F. B., D. W. Morgan, and M. E. Saltvit Jr. 1992.Ethylene in plant Biology.2nded, Acadmeic Press. New York.
7. Ahmad, F., I. Ahmad, and M. Sahir Khan. 2005. Indole acetic acid production by indigenous isolates of azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turk. J. Boil. 29:29-34.
8. Ahmad, F., I. Ahmad, and M. S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activities. Microbiol. Res. 163:173-181.
9. Benet, E., S. Tuzan, C. P. Chanway, and S. Enebak. 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 47:793-800.
10. Bossis, E., P. Lemenceau, X. Latour, and L. Gardan. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agron. J. 20:51-63.
11. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-Living bacteria.Can. J. Microbiol. 41:109-117.
12. Glick, B. R., D. M. Penrose and J. Li. 1998.A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth-promoting bacteria. J. Theor. Biol. 190:63-68.
13. Gravel, V., A. Hani, and R. J. Tewddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with Pseudomonas putidaorTrichodermaatroviride: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biol. Biochem. 39:1968-1977.
14. Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1950. The water–culture method for growing plants without soil. College of Agriculture, Univ of Cal Berkeley, Cal. Cicrcular 347.
15. Karnwal, A. 2009.Production of Indoleacetic acid by fluorescent Pseudomonas in the presence of L-tryptophan and rice-root exudates. J. Plant Pathol. 91:61-63.
16. Khakipour, N., K. Khavazi, H. Majallali, E. Pazira, and H. Asadirahmani. 2008. Production of Auxin Hormone by fluorescent Pseudomonas. American-Eurasion J. Agric. Environ. Sci. 4(6):678-692.
17. Kloepper, J. W. 2003. A review of mechanisms for plant growth promoting by PGPR.Aurburn University, Auburn, Alabama 36849. USA.
18. Okon, Y. 1985. Azospirillum as potential inoculant for agriculture.Trends Biotech. 3:223-228.
19. Pal, K. K., R. Dey, D. M. Bhatt, and S. M. Chauhan. 2001. National research center for groundnut, ivnagair road, PB. No 5, Junagadh-36, Gujarat, India.
20. Patten, C. L., and B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of IAA. Can. J. Microbiol. 42:207-220.
21. Patten, C. L., and B. R. Glick. 2002. Role of Pseudomonas putidaIndoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68:3795-3801.
22. Paul, D., and Y. R. Sarma. 2006. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-mediated root proliferation in black pepper (Piper nigrumL.) as evidenced through GS Root Software. Arch. Phytopathol. Plant Prot. 39:1-4.
23. Penrose, D. M., and B. R. Glick. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118:10-15.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Peyvandi, M., F. Farahani, M. HosseiniMazinani, Z. Noormohamadi, S. Ataii, and A. Asgharzade. 2010. Pseudomonas fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. J. Plant Prod. 4:63-66.
25. Sarwer, M., and R. J. Kremer. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. Lett. Appl. Microbiol. 147:282-285.
26. Shah, S., J. Li, B. A. Moffat, and B. R. Glick. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 44:833-843.
27. Shahzad, S. M., A. Khalid, M. Archad, J. Tahir, and T. Mahmood. 2010. Improving nodulation, growth and yield of Cicerarietinum L. through bacterial ACC- deaminase induced changes in root architecture. Europ. J. Soil Biol. 46:342-347.
28. Stepanova, A. N., J. Robertson-Hoyt, J. Yun, L. M. Benavente, D. Y. Xie, K. Dolezal, S. G. Jurgens, and J. M. Alonso. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell 133:177-191.
29. Wang, C., E. Knill, B. R. Glick, and G. Defago. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into Pseudomonas fluorescens strain CHAO and its gacA derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. Can. J. Microbiol. 46:898-907.
30. Zahir, Z. A., M. Arshad, and W. T. Frankenberger. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: Application and perspectives in agriculture. Adv. Agron. 81:97-167.

Archive of SID

www.SID.ir