

تلقیح جدایه های مختلف باکتری *Gluconacetobacter diazotrophicus*

بر روی سه رقم نیشکر تحت شرایط گلخانه ای

محسن علمائی^۱ و مهران الهامی فرد^۲

چکیده

با افزایش سطح زیر کشت نیشکر در استان خوزستان و مصرف بالای کودهای نیتروژن دار و به منظور تامین بخشی از نیاز نیتروژن گیاه نیشکر و کاهش آلودگی های زیست محیطی کود بیولوژیک تثبیت کننده نیتروژن مورد آزمایش قرار گرفت. با تلقیح جدایه های مختلف یک نوع باکتری همیار تثبیت کننده نیتروژن در نیشکر از گونه *Gluconacetobacter diazotrophicus* در طرحی گلخانه ای بر روی سه رقم تجاری نیشکر، مقدار رشد نی و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن بررسی شد. با اندازه گیری متوسط وزن خشک نی و نیتروژن کل جذب شده در بافت هوائی نیشکر تحت اثر تیمارهای باکتری و $N=100\text{kgN.ha}^{-1}$ و مقایسه آن با تیمار شاهد نشان داده شد که تیمارهای اعمال شده ۶۶-۲۹ درصد در وزن خشک گیاه و ۵۵-۲۹ درصد جذب نیتروژن کل گیاه افزایش یافته است.

کلید واژه ها: نیشکر، تلقیح، *Gluconacetobacter diazotrophicus*، تثبیت بیولوژیک نیتروژن

مقدمه

راشل^۳ (۵) از بافت نیشکر یک نوع باکتری همیار تثبیت کننده نیتروژن را جداسازی کرده و آن را *Beijerinckia fluminensis* نامگذاری نمودند. کاواکانت و دوبرینر^۴ (۴)، یک گونه اختصاصی *Acetobacter diazotrophicus* را برای نیشکر شناسایی نمودند. این گونه باکتری توسط یامادا و همکاران^۵ (۱۱) به *Gluconacetobacter diazotrophicus* تغییر نام یافت. این باکتری علاوه بر نیشکر، در سیب زمینی شیرین و سورگوم شیرین نیز یافت می شود و کاملاً درون بافتی بوده و در تمام قسمت های بافت گیاهی (ریشه، ساقه و برگ) وجود داشته و در محیط خاک زنده نمی ماند. این باکتری میله ای کوتاه، گرم منفی، هوازی اجباری و هتروتروف می باشد. درجه حرارت مطلوب برای رشد باکتری ۳۰-۲۵ درجه سانتی گراد و

نیشکر (*Saccharum officinarum*) جزء گیاهان C_4 بوده و در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت می شود و مانند سایر گیاهان چهار کربنه از انرژی نورانی و گرمایی خورشید حداکثر بهره را می برد. نیشکر در مقایسه با سایر محصولات کشاورزی از نقطه نظر راندمان تثبیت انرژی در واحد سطح در درجه اول اهمیت قرار دارد (۳). به منظور افزایش تولید و بالا بردن راندمان و حفظ محیط زیست می توان کود بیولوژیک را جایگزین بخشی از کود نیتروژن دار نمود (۱ و ۲). باکتری تثبیت کننده نیتروژن در نیشکر در صورت مهیا بودن فسفر، پتاسیم و دیگر عناصر ریزمغذی توانایی تامین ۳۰٪ از نیتروژن مورد نیاز گیاه را دارا می باشد و بیشترین مقدار تثبیت نیتروژن در نیشکر 150 kgN.ha^{-1} گزارش شده است (۶). اولین بار دوبرینر و

4- Cavalcante & Dobereiner

5- Yamada et al.

3- Dobereiner et al.

تاریخ دریافت: ۸۴/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۲/۲۱

۱- استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (olamaee_m@yahoo.com)

۲- کارشناس ارشد خاکشناسی مرکز تحقیقات نیشکر (شرکت توسعه نیشکر

و صنایع جانبی)، اهواز

روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰°C استفاده شد.

محیط کشت LGIP شامل مواد زیر می باشد (۸):

LGIP g.l⁻¹(K₂HPO₄ 0.2, KH₂PO₄ 0.6, MgSO₄. 2H₂O 0.2, CaCl₂ . 2H₂O 0.02, FeCl₃. 6H₂O 0.01, (NH₄)₂ SO₄ 1.0, Na₂MoO₄.2H₂O 0.002, Sucrose 100, Yeast extract 2.0), Bromothymol blue 5ml, pH=5,5 with acetic acid

بعد از ۴۸ ساعت جمعیت باکتری با اندازه گیری میزان کدورت در طول موج 630nm و با استفاده از منحنی رشد (cfu/ml) $1 \times 10^{+7}$ رسیده بود. قلمه های ریشه دار شده را بمدت ۱۰-۸ ساعت در سوسپانسیون باکتری غوطه ور نموده و سپس درون گلدان ها کشت شدند.

طرح آزمایشی به صورت بلوکهای کامل تصادفی در قالب فاکتوریل با ۳ رقم تجاری گیاه نیشکر در برابر ۴ تیمار باکتری، یک تیمار کود نیتروژن دار ($100 \text{ kg N} \cdot \text{ha}^{-1}$) معادل 11,0mM و یک تیمار شاهد (با حداقل کود نیتروژن $= 5 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$)، معادل 0,56mM در محیط کشت بعنوان Starter، با چهار تکرار، این مقدار حداقل در تیمارهای باکتری هم اعمال شد و طرح با جمعا ۷۲ گلدان در گلخانه مرکز تحقیقات نیشکر اهواز اجرا شد.

در طول رشد گلدانها با محیط غذایی عاری از نیتروژن Murashige and Skoog حاوی ترکیبات با مقادیر زیر تغذیه گردیدند(۹):

MgSO₄.7H₂O 1.5mM, H₃BO₃ 100μM, ZnSO₄.7H₂O 30 μM, CuSO₄.5H₂O 100pM, KI 5.3 μM, CoCl₂.6H₂O, 105pM, Na₂MoO₄.2H₂O 1.0 μM, MnSO₄.H₂O 100 μM, CaCl₂.2H₂O 3mM, Na₂EDTA 4.1mM, FeSO₄.7H₂O 6.7 mM, KH₂PO₄ 1.3mM, هر بار pH محلول غذایی با KOH بر روی

شش تنظیم می شد.

مناسب ترین واکنش pH= ۵/۵ (درون سلول گیاه) می باشد. این باکتری در pH > ۷ قادر به رشد نیست اما در pH کمتر از ۳ و در غلظت های بالای نیترات در محیط کشت (۲۵ mM)، هم می تواند تثبیت نیتروژن را انجام دهد. برخی از سویه های این باکتری توانائی تولید هورمون رشد اکسین-Indol (3- acetic acid) را دارند (۷). با توجه به نیاز سالانه نیشکر به $300-350 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ کود اوره در اراضی زیر کشت نیشکر خوزستان، می توان با جایگزینی بخشی از کود نیتروژنی مورد نیاز نیشکر توسط کود بیولوژیک قدم هایی در راستای کشاورزی پایدار و جلوگیری از آلودگی محیط زیست برداشت. این آزمایش به منظور بررسی سازگاری جدایه های مختلف باکتری و واریته های نیشکر و مقایسه مقدار محصول و نیتروژن تثبیت شده در گلدان صورت گرفت.

مواد و روش ها

برای اجرای طرح از گلدانهای پلاستیکی ۱۰ لیتری حاوی ۹ کیلوگرم ماسه کوارتز شسته شده با آب معمولی استفاده گردید. قلمه های نیشکر از رقمهای غالب منطقه ($V_1=CP69-1062$ ، $V_2=CP48-103$ ، $V_3=CP57-614$) که دارای یک جوانه سالم و وزن تقریبی 50 ± 2 گرم بودند تهیه و با محلول ۱٪ هیپوکلرید سدیم (وایتکس) بمدت ۵ دقیقه ضد عفونی و سپس سه مرتبه با آب مقطر شستشو گردیدند. قلمه ها در سینی چیده شده و به منظور جوانه زنی در مدت چهار روز در انکوباتور با دمای ۳۵°C قرار داده شدند.

چهار تیمار باکتری مورد آزمایش شامل: جدایه های B₁ و B₂ جدا شده از مزارع کشت و صنعت امیر کبیر و سویه های B₃=PALst ; B₄=UAP- 5560 از کشور مکزیک بودند. برای تکثیر انبوه باکتریها، از محیط کشت سترون مایع LGIP، بر

مولکولی از هوا توسط این باکتری‌ها می‌باشد. ستون جرم ماده خشک گیاه نیز نشان داد که وزن چهار تیمار باکتریایی به طور معنی داری بیشتر از دو تیمار کودی و شاهد می‌باشد.

جدول ۲ نشان می‌دهد درصد نیتروژن کل تثبیت شده و افزایش مقدار وزن ماده خشک گیاه توسط تیمار باکتری بیشتر از تیمار شاهد و کودی بوده است. جدایه باکتری شماره B₄ بالاترین درصد تثبیت نیتروژن و افزایش وزن ماده خشک گیاه را نشان داده است و سپس باکتری‌های شماره B₁ و B₃ و کمترین مقدار مربوط به باکتری شماره B₂ می‌باشد. تحلیل آماری در جدول ۳ نشان می‌دهد که نوع رقم تاثیری بر درصد نیتروژن، مقدار نیتروژن کل و مقدار وزن ماده خشک گیاه نداشته است. مقدار نیتروژن در چهار تیمار باکتری با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند و فقط تیمار شماره B₄ باکتری با سایر تیمارهای باکتریایی و شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت. بطور کلی مقدار نیتروژن موجود در تیمارهای باکتری بیشتر از تیمار شاهد بوده و مقدار کل نیتروژن موجود در بافت گیاه در تیمارها باکتریایی بیشتر از دو تیمار نیتروژن و شاهد بدست آمد، این افزایش نشان دهنده تثبیت نیتروژن مولکولی از هوا توسط این باکتری‌ها می‌باشد. ستون جرم ماده خشک گیاه نیز نشان داد که وزن چهار تیمار باکتریایی به طور معنی داری بیشتر از دو تیمار کودی و شاهد می‌باشد.

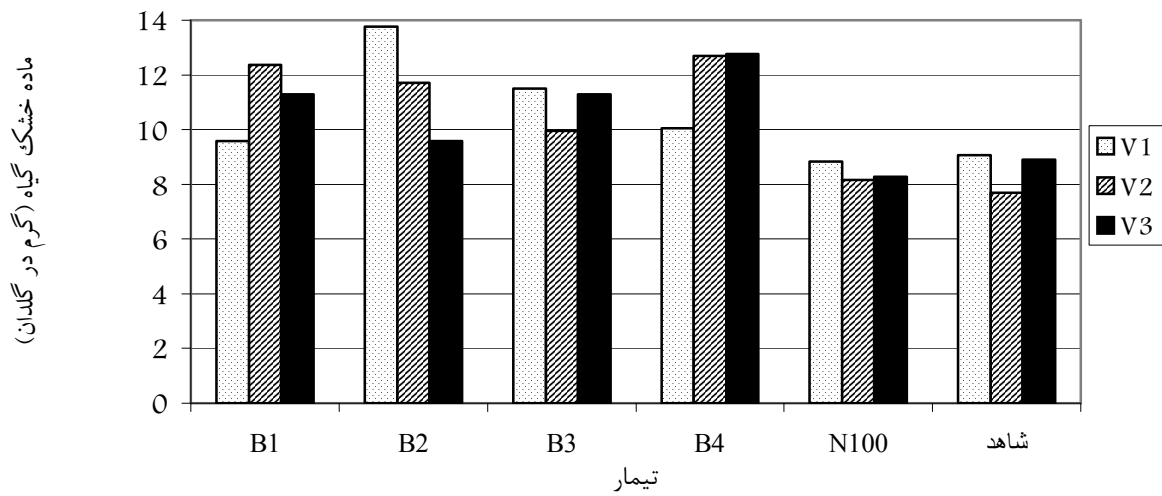
جدول ۲ نشان می‌دهد درصد نیتروژن کل تثبیت شده و افزایش مقدار وزن ماده خشک گیاه توسط تیمار باکتری بیشتر از تیمار شاهد و کودی بوده است. جدایه باکتری شماره B₄ بالاترین درصد تثبیت نیتروژن و افزایش وزن ماده خشک گیاه را نشان داده است و سپس باکتری‌های شماره B₁ و B₃ و کمترین مقدار مربوط به باکتری شماره B₂ می‌باشد. تحلیل آماری در جدول ۳ نشان می‌دهد که نوع رقم تاثیری بر درصد نیتروژن، مقدار

محلول غذایی هر هفته به میزان ۵۰ ml و کود نیتروژنه با غلظت ۰/۵۶ mM از ترکیب نترات آمونیوم هر دو هفته به میزان ۵۰ ml به همه گلدانها اضافه شد. برای تیمار کودی ۱۱ mM معادل ۱۰۰ kgN.ha⁻¹ ازت خالص از همین ترکیب استفاده گردید و در طول دوره رشد در چند مرحله به گلدانها اضافه شد. بعد از چهار ماه قسمت هوایی گیاه از محل طوقه برداشت و وزن تر و خشک آنها را بر حسب گرم در گلدان محاسبه آورده، درصد نیتروژن بافت گیاهی توسط دستگاه کجلدال تعیین و نیتروژن کل بافت بخش هوایی محاسبه گردید.

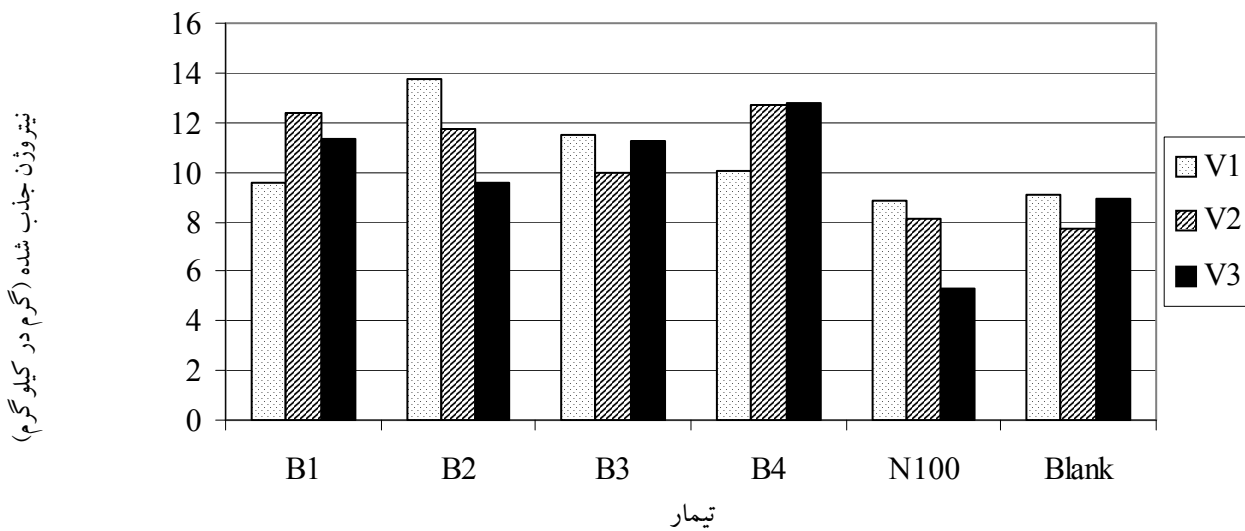
نتایج

نتایج تاثیر تیمارهای مختلف بر جرم ماده خشک و مقدار کل نیتروژن جذب شده در بخش هوایی نیشکر در نمودارهای ۱ و ۲ نشان داده شده است. با مشاهده نتایج بدست آمده در تمامی ۱۸ تیمار باکتری و ارقام مختلف نیشکر، وزن خشک تمامی تیمارهای باکتری از شاهد بیشتر بوده و همچنین کل نیتروژن جذب شده در بخش هوایی گیاه نیز افزایش یافته است (نمودار ۱ و ۲). بر اساس نمودار ۲ باکتری شماره B₄ نسبت به همه ارقام اثر افزایشی داشته است.

جدول ۱ نشان می‌دهد درصد نیتروژن در تیمار کودی به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود بقیه تیمارها به جز تیمار B₂ باکتری با شاهد از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشتند. مقدار نیتروژن در چهار تیمار باکتری با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند و فقط تیمار شماره B₄ باکتری با سایر تیمارهای باکتریایی و شاهد از نظر آماری اختلاف معنی‌داری داشت. بطور کلی مقدار نیتروژن موجود در تیمارهای باکتری بیشتر از تیمار شاهد بوده و مقدار کل نیتروژن موجود در بافت گیاه در تیمارها باکتریایی بیشتر از دو تیمار نیتروژن و شاهد بدست آمد، این افزایش نشان دهنده تثبیت نیتروژن



نمودار ۱- تاثیر تیمارهای مختلف باکتری بر وزن ماده خشک بخش هوایی نیشکر



نمودار ۲- تاثیر تیمارهای مختلف باکتری بر کل نیترژن جذب شده توسط بخش هوایی نیشکر

جدول ۱- تحلیل آماری اثر نوع باکتری و تیمار نیتروژن به روش دانکن

تیمار باکتری	نیتروژن %	نیتروژن کل گرم در گلدان	ماده خشک گرم در گلدان
B _۱	۱/۰۷ ^{BC}	۰/۱۲ ^{AB}	۱۰/۸ ^{AB}
B _۲	۰/۹۶ ^C	۰/۱۱ ^{AB}	۱۱/۲ ^{AB}
B _۳	۱/۰۵ ^{BC}	۰/۱۲ ^{AB}	۱۰/۹ ^{AB}
B _۴	۱/۰۹ ^B	۰/۱۴ ^A	۱۳/۰ ^A
N _{۱۰۰}	۱/۳۸ ^A	۰/۱۰ ^B	۸/۴۲ ^C
شاهد	۱/۰۶ ^{BC}	۰/۰۸ ^B	۸/۱ ^{BC}

جدول ۲- افزایش نسبی تیمارهای باکتری نسبت به تیمارهای شاهد و کودی در همه ارقام

تیمار باکتری	نیتروژن کل نسبت به تیمار شاهد (%)	ماده خشک نسبت به تیمار شاهد (%)	نیتروژن کل نسبت به تیمار کودی (%)
B _۱	۳۹	۲۹	۱۱
B _۲	۲۹	۳۳	۳
B _۳	۳۸	۳۰	۱۱
B _۴	۶۶	۵۵	۳۳

جدول ۳- تحلیل آماری اثر واریته به روش دانکن

تیمار واریته	نیتروژن کل %	نیتروژن کل گرم در گلدان	ماده خشک گرم در گلدان
V1	۱/۱۲ ^A	۰/۱۲ ^A	۱۰/۴ ^A
V2	۱/۱۱ ^A	۰/۱۲ ^A	۱۰/۹ ^A
V3	۱/۰۷ ^A	۰/۱۰ ^A	۹/۵ ^A

نیشکر به طور معنی داری شده‌اند و این امر می‌تواند علاوه بر تثبیت نیتروژن بدلیل ترشح هورمون رشد توسط این باکتریها باشد (۷). این باکتری می‌تواند به عنوان یک کود بیولوژیک موثر بخشی از نیتروژن مورد نیاز گیاه را فراهم کند و در جهت کاهش

نیتروژن کل و مقدار وزن ماده خشک گیاه نداشته است.

بحث و نتیجه گیری

نتایج این آزمایش نشان داد که تیمارهای دارای باکتری *G.diazotrophicus* موجب افزایش رشد

کنندگی مشترک این باکتریها در افزایش رشد گیاه نیشکر با قارچ های VAM^۱ توسط پولا و همکاران^۲ (۱۰) نشان داده شده است.

در این جهت پیشنهاد می شود باکتریهای *Herbaspirillum spp*, *Azospirillum spp* و قارچهای میکورایزا جداسازی، تا با مطالعه اثر متقابل آنها در شرایط گلخانه ای و در مراحل بعد در مزرعه، بهترین کود بیولوژیک جهت تامین نیتروژن مورد نیاز نیشکر معرفی گردد.

سیاسگزاری

از همکاری مسئولین مرکز تحقیقات نیشکر اهواز برای اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی به عمل می آید.

مصرف کود شیمیائی نیتروژنه بکار گرفته شود، همچنین می تواند با تولید هورمون رشد در جهت افزایش رشد موثر باشد (۷).

جدول ۱ نشان داده شده است هر چند درصد نیتروژن در بافت گیاه کمتر از تیمار کودی است اما بالا بودن جرم ماده خشک و نیتروژن کل جذب شده نسبت به دو تیمار شاهد و ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن نشان دهنده اینست که علاوه بر نیتروژن عامل دیگری که احتمالاً ترشح هورمون رشد توسط باکتری باعث رشد نیشکر شده است (۷).

افزایش نفوذ پذیری جمعیت باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن به داخل گیاه نیشکر با تلقیح همزمان و استفاده توأم این باکتری با دیگر باکتری های تثبیت کننده نیتروژن در نیشکر مانند باکتری *Herbaspirillum spp* می تواند ما را در کاهش مصرف کود شیمیائی کمک کند. اثر تحریک

منابع

۱. تهرانی، م. م. ۱۳۷۷. نیترات از دیدگاه کشاورزی و محیط زیست. مجله زیتون، ویژه نامه شماره ۶، صص ۴۸-۵۱.
۲. جبلی، ج. ۱۳۷۸. تاثیرات زیست محیطی مواد شیمیائی در توسعه پایدار منابع آب و خاک. فصلنامه شرکت مهندسی مشاور مهتاب قدس، جلد هشتم، صص ۲۲-۲۶.
3. Alexander, A. G. 1973. Sugarcane physiology. Elsevier Publ. Co. Amsterdam. 752 p.
4. Cavalcante, V.A., and Dobereiner, J. 1988. A new acid tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugarcane. Plant and Soil, 108:23-31
5. Dobereiner, J. and Ruschel, A. P. 1958. Uma nova especie *Beijerinckia fluminensis*. Rerista de Biologia, Rio de Juniro, pp:261-279.
6. Dobereiner, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics and economic contributions. Soils Biotechnology, 29 (56): 771-774.
7. Fuentes-Ramirez, L. E., Jimenz-Salgado, T, Abarce-Ocampo, I.R and Caballero-Mellado, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus* an indole acetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant and Soil, 154:145-150.

1- Visicular arbuscular mycorrhizal

2- Paula et al.

8. Luis, E., Ramirez, F., Mellado, J. C., Sepulveda, J., Romero, M. E., 1999. Colonization of sugar cane by *Acetobacter diazotrophicus* is inhibited by high N fertilization. *FEMS Microbiology Ecology*, 29: 117-128.
9. Murashige, T., and Skoog, F. 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
10. Paula, M. A., Reis, V. M., and Dobereiner, J. 1991. Interactions of *Glomus clarum* with *Acetobacter diazotrophicus* in infection of sweet potato (*Ipomoea batatas*), sugarcane (*Saccharum* spp), and sweet sorghum (*Sorghum vulgare*). *Soil Fertil and Fertilizer*, 11:111-115.
11. Yamada, Y., Hashimo, K., Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: The elevation of the subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61: 1244-1251.