

تولید گره تثبیت نیتروژن در ریشه های گندم تحت تأثیر عوامل مختلف تولید کننده گره و تلقیح با باکتری

عباس بیابانی^{۱*}

عضو هیئت علمی مجتمع دانشگاهی گنبد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان: abs346@yahoo.com

چکیده

در این پژوهش در مرحله اول، باکتریهای تولیدکننده پکتیناز (باکتریهای پکتینولیتیک) که توانایی تولید شبه گره در ریشه های گیاه زراعی گندم را داشتند و باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن از نمونه خاکهای انتخاب شده جداسازی گردیدند. سپس از بین آنها باکتریهای با توانایی بالای تولید آنزیم پکتیناز و تثبیت نیتروژن انتخاب شدند. برای مطالعه تشکیل گره های غیرحقیقی (Para nodule) و تثبیت نیتروژن از روش تیمار گیاهچه های گندم با D - ۴، به عنوان عامل غیر بیولوژیک تولیدکننده گره (Abiological agent=Aa) و یا تلقیح گیاهچه ها با باکتری پکتینولیتیک (*Bacillus polymyxa* Strain 43) به عنوان عامل بیولوژیک (Biological agent=Ba) و همچنین تلقیح آنها با باکتریهای دی ازوتروف انتخاب شده استفاده شد. اندازه گیری میزان تثبیت نیتروژن تحت شرایط آزمایشگاهی در فواصل ۸، ۱۰، ۱۴ و ۲۲ روز از دوره رشد گیاه انجام شد. آزمایش شامل ۹ تیمار به شرح ذیل بود: ۱) گیاه گندم (شاهد) ۲) گیاه گندم + Aa ۳) گیاه گندم + Ba ۴) گیاه گندم + (*Arthrobacter sp* +) ۵) گیاه گندم + (*Xanthomonas sp* 42) ۶) تیمار ۴ + Aa ۷) تیمار ۵ + Aa ۸) تیمار ۴ + Ba ۹) تیمار ۵ + Ba. تشکیل گره هایی با قطر حدود ۰/۱ میلی متر در روی ریشه ها در روزهای چهارم و پنجم دوره رشد گیاه قابل مشاهده بود. اختلافهای معنی داری بین تعداد گره های تشکیل شده و همچنین میزان تثبیت نیتروژن در بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شد. بیشترین میزان فعالیت نیتروژن در روز چهاردهم در تیماری که گیاهچه های گندم با مخلوط طبیعی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن (*Arthrobacter sp* +) و *Xanthomonas sp* تلقیح شده بودند اندازه گیری شد.

واژه های کلیدی: گره های غیرحقیقی، گندم، عوامل تولیدکننده گره، باکتری های پکتینولیتیک، تثبیت نیتروژن.

مقدمه

با باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن را ندارند. یکی از راه های موجود برای حل این مشکل، تولید گره های غیرواقعی (شبه گره) بطور مصنوعی با استفاده از عوامل مختلف تولیدکننده گره و تلقیح (مایه زنی) با باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن است (Glagoleva و همکاران، ۱۹۹۶؛ Kovalskaya و همکاران، ۲۰۰۱).

در شرایط فعلی برای تولید گره از مواد شیمیایی اکسینی

یکی از راههای تأمین نیتروژن برای گیاهان که فواید زیادی از نظر اقتصادی و اکولوژیکی دارد تأمین نیتروژن از طریق همزیستی گیاه با باکتری های تثبیت کننده نیتروژن و تشکیل گره در ریشه و ساقه گیاهان زراعی می باشد (Kennedy و Christiansen-Weniger، ۱۹۹۳؛ همکاران، ۱۹۹۷). در این راه، یکی از مشکلات اصلی این است. که بیشتر گیاهان زراعی توانایی برقراری همزیستی

۱- نویسنده مسئول: گنبد کاوس، مجتمع دانشگاهی گنبد کاوس - دانشکده کشاورزی گنبد - کد پستی - ۴۹۷۱۸

* دریافت: ۸۵/۱۲/۱۸ و پذیرش: ۸۶/۱۲/۲۲

از خاک و انتخاب باکتری هایی با توان بالای تولید پکتیناز و نیز باکتری هایی با توانایی بالای تثبیت نیتروژن و سپس مطالعه میزان فعالیت نیتروژن در ریشه گیاه زراعی گندم پس از تیمار گیاهچه های آن با عوامل غیر زنده تولید کننده گره (D-۴، ۲) و یا تلقیح با عوامل زنده تولید کننده گره (باکتری ها) همزمان با تلقیح باکتری های تثبیت کننده نیتروژن بود.

مواد و روشها

گیاه مورد مطالعه گیاه زراعی گندم زمستانه رقم پامیاتی مدنی^۱ (روسی) بود. عامل غیر زنده (شیمیایی) تولید کننده گره (Aa) = Abiological agent، D-۴، ۲ بود که در غلظت های زیاد به عنوان علف کش و در غلظت های کم به عنوان تحریک کننده رشد محسوب می شود. عامل زنده تولید کننده گره (Ba) = Biological agent باکتری خالص *Bacillus polymyxa* Strain 43 بود که توانایی بالای فعالیت پکتیناز و توان ضعیف تثبیت نیتروژن ($0.3 \text{ n.mol C}_2\text{H}_4/10^6 \text{ cell} \cdot \text{h}^{-1}$) را داشت و از نمونه خاک لومی رسی زیر کشت غلات جداسازی گردید. ترکیبات محیط کشت مورد استفاده برای جداسازی باکتری های تولید کننده پکتیناز بر مبنای گرم در لیتر عبارت بودند از $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2، KH_2PO_4 3، K_2HPO_4 4.5، پکتین 5، عصاره مخمر 1/5، 0/3 MgSO_4 و آگار 15 (Aceeba، 1991).

عامل تثبیت کننده نیتروژن، باکتری خالص *Bacillus polymyxa* Strain 42 و مخلوط دو باکتری (*Arthrobacter* sp + *Xanthomonas* sp) بود که هر دو آنها توانایی بالای تثبیت نیتروژن (به ترتیب 0.6 و $1.2 \text{ n.ml C}_2\text{H}_4/10^6 \text{ cell} \cdot \text{h}^{-1}$) و فعالیت ضعیف پکتینازی داشتند و هر دو به طور طبیعی نیز به حالت مخلوط با یکدیگر از نمونه خاکهای لومی رسی جداسازی شده بودند. محیط کشت مورد استفاده فدروکالین اسکایا^۲ بود (ترکیبات بر مبنای گرم در لیتر شامل: آگار 20؛ گلوکز 10؛ K_2HPO_4 1.8؛ $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3؛ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01؛ NaCl 0.5؛ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01) (Aceeba، 1991).

تشخیص باکتریها بر اساس مجموعه روشهای استاندارد انجام شد (Peter و همکاران، 1984). برای مطالعه گره های غیرحقیقی در گیاه زراعی گندم از محلول غذایی نیمه جامد گلی ری گلای^۳ با ترکیبات زیر بر مبنای گرم در لیتر: FeCl_3 0.024؛ KH_2PO_4 0.136؛ KCl 0.072؛

مانند: D-۴، ۲، ایندول استیک اسید و یا آنزیم هایی مانند سلولاز و پکتیناز استفاده می کنند (Glagoleva و همکاران، 1996؛ Patika، 1995؛ Douglas و Smith، 1987). مطالعات زیادی جهت تولید گره بوسیله D-۴، ۲ و غیره جهت تولید گره روی گیاهان زراعی گندم، ذرت، برنج و کلزا انجام شده است (Al-Mallah و Davey، 1989؛ Cocking، 1989؛ Chebotar، 1995؛ Christiansen، 1993؛ Weniger، 1993؛ Glagoleva و همکاران، 1996). برای تلقیح شبه گره ایجاد شده در گیاهان مذکور از باکتری های تثبیت کننده نیتروژن مانند *Azorhizobium caulinodans*، *Azospirillum brasilense*، *Klebsiella pneumoniae*، *Alcaligenes faecalis*، *Azotobacter chroococcum*، *Pseudomonas caryophylli* و یا تلفیقی از گونه های ریزوبیومی استفاده نموده اند. در این زمینه مطالعاتی بر روی گیاه زراعی کلزا انجام شده که نشان داده باکتری های پکتینازی استفاده شده مانند ماده شیمیایی D-۴، ۲ توان تولید گره های غیر حقیقی را دارند (Glagoleva و همکاران، 1997؛ Kovalskaya و همکاران، 2001).

Khammas و همکاران (1993) با مطالعه اثر تلقیح (مایه زنی) همزمان آزوسپیریوم (*Azospirillum* sp) و باسیلوس پلی میکسا (*Bacillus polymyxa*) بر روی برنج به این نتیجه دست یافتند که هنگامیکه آنها با هم استفاده شوند، میزان تثبیت نیتروژن در برنج بیشتر از زمانی است که جدا از هم استفاده شوند، زیرا در این همیاری باسیلوس (*Bacillus* sp) نقش تولید کننده آنزیم پکتیناز و آزوسپیریوم نقش تثبیت کننده نیتروژن را دارند. Zlotnikov و همکاران (1998) با مطالعه باکتری های *Bacillus firmus* و *Klebsiella terrigena* بر روی جو بهاره به این نتیجه رسیدند، زمانیکه این دو باکتری با همدیگر تلقیح شدند میزان نیتروژن دانه 12 درصد در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. همچنین مطالعات نشان داده است که تلقیح با این باکتریها نه تنها باعث افزایش عملکرد محصول بلکه سبب بهبود کیفیت محصول هم می شود. Patika (1995) و Chebotar (1995) به ترتیب با مطالعه بر روی گندم و سیب زمینی مشاهده کردند که در اثر تلقیح این گیاهان با باکتری های تثبیت کننده نیتروژن، علاوه بر اینکه عملکرد 15 تا 50 درصد افزایش پیدا کرد بلکه مقدار پروتئین دانه گندم و نشاسته سیب زمینی هم 10 تا 20 درصد افزایش یافت. Chebotar (1987) با مطالعه بر روی تثبیت نیتروژن گیاه سورگم دریافت که تلقیح این گیاه با باکتری های جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* موجب بیشترین میزان تثبیت می گردد.

هدف از این تحقیق در مرحله اول، جداسازی باکتری های تولید کننده آنزیم پکتیناز و تثبیت کننده نیتروژن

1- Pameiati mednea
2- fedrov-kalinskaya
3- Gelery-gela

تشکیل گره های غیرحقیقی در ریشه های گیاه زراعی گندم علاوه بر اینکه در تیمارهای ۲ (گیاه گندم + Aa) و ۳ (گیاه گندم + Ba) دیده شد، در تیمارهای تلقیح شده با باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن (تیمارهای ۴ و ۵) هم مشاهده شد (شکل های ۱ و ۲). محل تشکیل گره های غیر حقیقی در منطقه تارهای کشنده بود. Kovalskaya و همکاران (۲۰۰۱) در بررسی تشکیل گره های غیرحقیقی بر روی کلزا به نتیجه مشابهی دست یافتند. همچنین Katupitiya و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از باکتری *Azospirillum brasilense* sp7 روی گیاهچه های گندم، ده روز بعد از تلقیح گیاه با باکتری مذکور مشاهده نمودند.

در اکثر تیمارها گره های غیر حقیقی بطور متوسط ۵-۴ روز بعد از تلقیح مشاهده شدند و تعداد آنها در طی ۷ روز به ۶-۵ عدد گره (شکل ۱) رسید. قطر گره های تشکیل شده بطور متوسط یک میلی متر بود. یکی از موارد جالب توجه این بود که باکتریهای استفاده شده برای تثبیت نیتروژن نیز توانایی تولید گره را داشتند (تیمارهای ۴ و ۵). در این تیمارها نیز گره ها ۵-۴ روز بعد از تلقیح مشاهده شدند اما قطر گره در این تیمارها کمتر و تقریباً ۰/۵ میلی متر بود (شکل ۱). بیشترین تعداد گره ها در تیمار ۳ مشاهده شد (شکل ۳). در تیمارهای ۶ تا ۹ که همزمان عوامل تولید کننده گره (زنده و غیر زنده) و باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن نیز تلقیح شده بودند قطر گره ها و زمان تشکیل گره ها تقریباً یکسان بود اما تعداد گره های تولید شده در مقایسه با تیماری که فقط از باکتری تولید کننده پکتیناز (تیمار ۳) استفاده شده بود کمتر بودند.

مطالعه فعالیت نیتروژناز در ریشه های گیاه زراعی گندم نشان داد که بیشترین میزان تثبیت نیتروژن در گیاهان ۱۴- روزه بوده (شکل ۴) و بیشترین مقدار آن در تیمار ۴ یعنی زمانی که گیاهچه های گندم با مخلوط طبیعی *Arthrobacter* sp + *Xanthomonas* sp مشاهده شد (شکل ۵). Khammas و kaiser (۱۹۹۸) نیز با مطالعه تلقیح گیاه برنج دریافتند که استفاده از مخلوط باکتریهای دی ازوتروف سبب افزایش تثبیت ازت می شود. با افزودن عوامل تولید کننده گره به باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن طبق تیمارهای موجود (تیمارهای ۶ تا ۹) بطور عملی افزایشی در میزان تثبیت نیتروژن مشاهده نشد حتی در بعضی تیمارها میزان فعالیت نیتروژناز در مقایسه با زمانی که فقط با باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن (تیمارهای ۴ و ۵) تلقیح شده بودند کاهش نیز یافت (شکل ۴).

زمانیکه تعداد گره های غیرحقیقی تشکیل شده در تیماری که گیاهان فقط با عامل بیولوژیک تولید کننده

$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ 0.300 or $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.2; MgSO_4 0.06 agar 7، استفاده شد (Aceeba، ۱۹۹۱).

آزمایش با ۹ تیمار انجام شد: (۱) گیاه گندم (شاهد) (۲) گیاه گندم + Aa (۳) گیاه گندم + Ba (۴) گیاه گندم + *Arthrobacter* sp + *Xanthomonas* sp (۵) گیاه گندم + *Bacillus polymyxa* Strain 42 (۶) تیمار ۴ + Aa (۷) تیمار ۵ + Aa (۸) تیمار ۴ + Ba (۹) تیمار ۵ + Ba. بذور گندم با پراکسید هیدروژن با غلظت ۳۳ درصد به مدت ۲۰ دقیقه قبل از کشت ضد عفونی سطحی شده و با آب استریل شستشو شدند و سپس در محیط کشت فدروکالین اسکایا جهت تولید جوانه کشت شدند. ظروف پتری حاوی بذور در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳-۴ شبانه روز قرار داده شدند. برای کشت جوانه های گندم از لوله های آزمایشگاهی به حجم ۵۰ میلی لیتر که هر لوله آزمایشی محتوی ۱۵ میلی لیتر محلول گلی ری گلای بدون نیتروژن بود، استفاده شد. هر لوله آزمایش محتوی جوانه گندم با ۰/۵ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری تثبیت کننده نیتروژن یا تولید کننده پکتیناز با غلظت $10^8 \text{ cell ml}^{-1}$ طبق تیمار های آزمایشی تلقیح شد. برای تهیه سوسپانسیون باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن و یا تولید کننده پکتیناز از باکتریهای چهار روزه که در محیط کشت مایع فدروکالین اسکایا کشت شده بودند استفاده کردیم. از D-۴، ۲ نیز به عنوان عامل غیر زنده تولیدکننده گره با غلظت یک میکروگرم در میلی لیتر استفاده گردید. فعالیت تثبیت نیتروژن در ریشه های گیاه گندم در گیاهچه های ۸، ۱۰، ۱۴ و ۲۲ روزه با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل CHROM-4-1 c با سه تکرار اندازه گیری شد (لازم به ذکر است که سطح ریشه ها شستشو نشدند، فعالیت نیتروژناز مربوط به باکتریهای سطح ریشه + گره ها می باشد). برای تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودارها به ترتیب از SPSS و Excel استفاده شد.

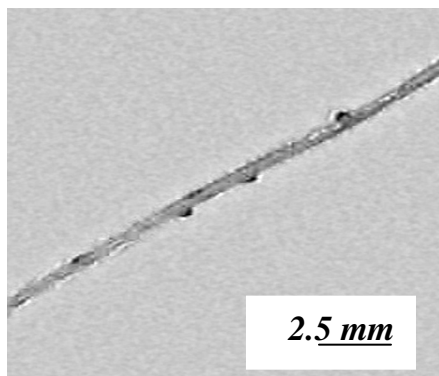
نتایج و بحث

ابتدا از نمونه خاکهای مورد نظر ۶۳ باکتری تولید کننده پکتیناز استخراج گردید که از بین آنها باکتری *Bacillus polymyxa* Strain 43 که بیشترین توان تولید گره های غیر حقیقی بر روی ریشه های گیاهچه گندم را داشت، انتخاب شد. همچنین ۴۲ باکتری تثبیت کننده نیتروژن استخراج گردید که از بین آنها باکتری های *Bacillus polymyxa* Strain 42 و باکتری مخلوط طبیعی (*Arthrobacter* sp + *Xanthomonas* sp) که بیشترین خاصیت تثبیت کنندگی نیتروژن را داشتند، انتخاب شدند.

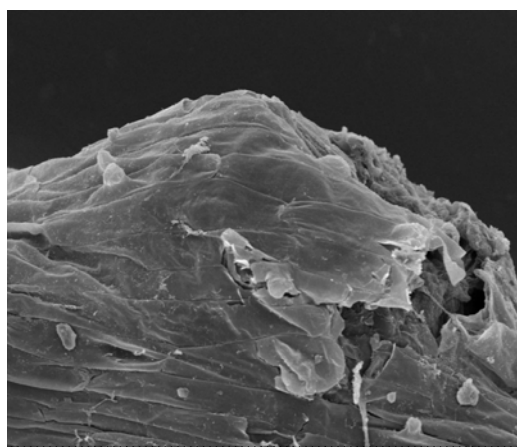
تثبیت نیتروژن، توانایی تولید گره های غیر حقیقی نیز وجود داشته باشد. همچنین با مقایسه شکل های ۳، ۴ و ۵ همبستگی مشخصی بین تعداد گره و مقدار تثبیت نیتروژن وجود ندارد، زیرا فعالیت نیتروژناز اندازه گیری شده مربوط به باکتریهای سطح ریشه + گره ها می باشد.

با توجه به نتایج گرفته شده از آزمایش می توان گفت که زمینه برای تحقیقات بیشتری در ارتباط با تثبیت نیتروژن در گیاهان غیر لگومینوز و عوامل تولید کننده گره در آنها به منظور ایجاد شرایط بهینه جهت تشکیل همزیستی در ریشه آنها وجود دارد.

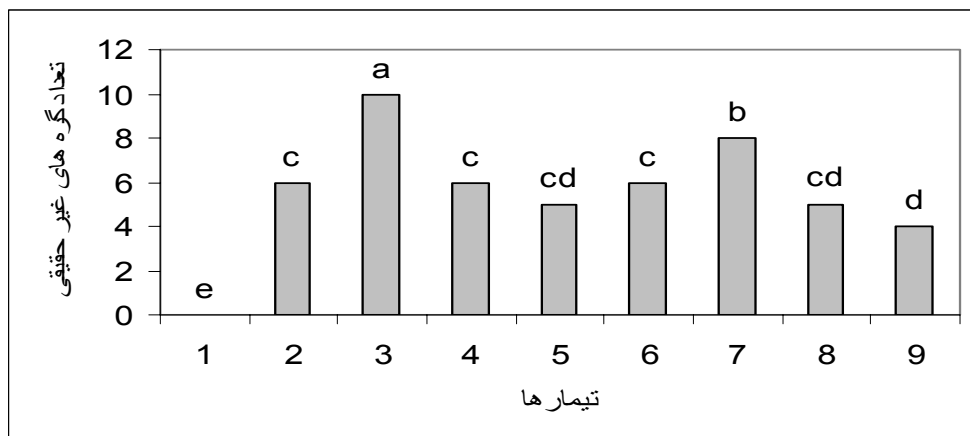
گره (تیمار ۳) و تیمارهایی که گیاهان با عامل بیولوژیک تولید کننده گره همراه با باکتریهای تثبیت کننده تلقیح شده بودند (تیمارهای ۸ و ۹) با همدیگر مقایسه شدند مشاهده شد که تعداد گره های غیر حقیقی تشکیل شده در تیمار ۳ تقریباً دو برابر تیمار ۸ و ۹ بود که احتمالاً می توان گفت کاهش تعداد گره های تشکیل شده و کاهش فعالیت آنزیم نیتروژناز در ارتباط با افزایش غلظت آنزیم پکتیناز است که بر روی ریشه گیاه گندم اثر منفی گذاشته است. Glagoleva و همکاران (۱۹۹۷) نیز طی مطالعه ای که انجام دادند به این نتیجه رسیدند که استفاده از D-2، ۴ با غلظت بالا (۱۰ میکرو گرم در میلی لیتر) نتیجه عکس داشته و فعالیت نیتروژناز را کاهش داده است. بنابراین نتایج نشان می دهد که افزایش تولید آنزیم پکتیناز برای ریشه گیاه مفید نیست. بهترین شرایط مساعد همانطور که مشاهده شد زمانی است که در باکتری با توانایی بالای



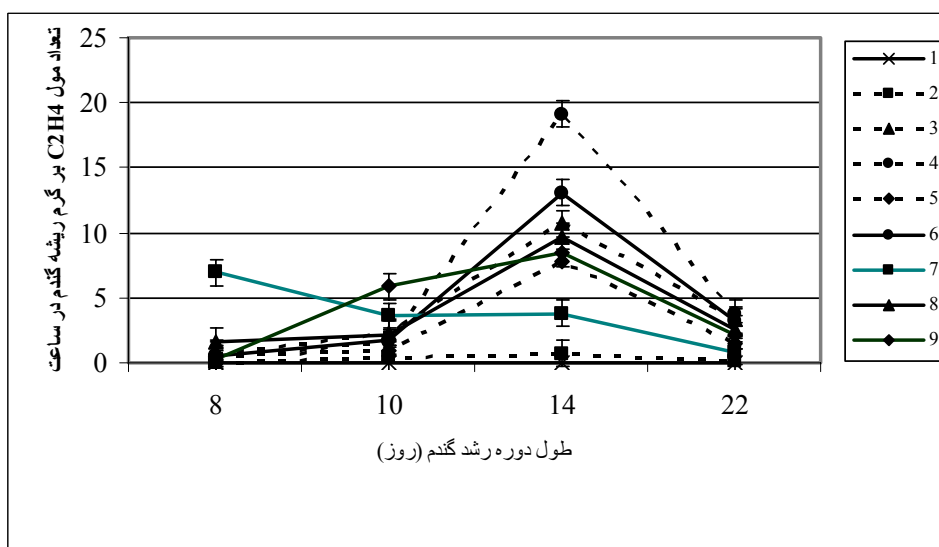
شکل ۱- تشکیل گره های غیر حقیقی بر روی ریشه های گندم (۱-تیمار ۲، ۲-تیمار ۴) (عکس با دوربین پاناسونیک VS 550)



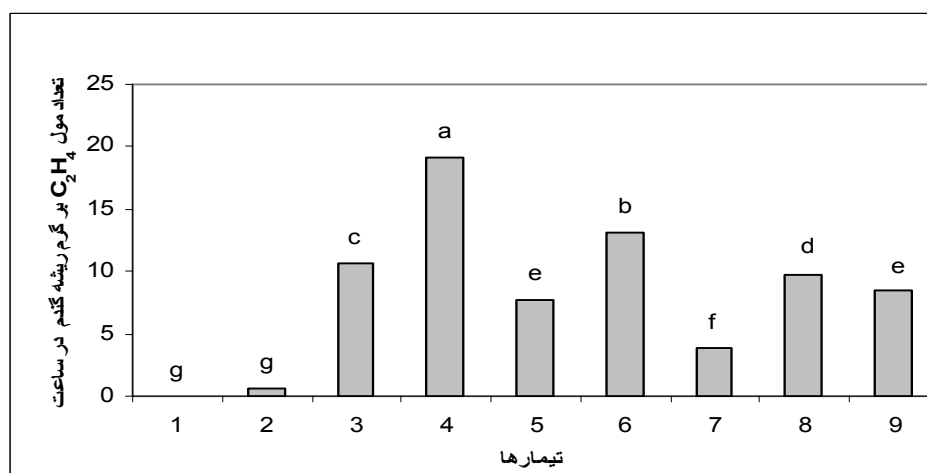
شکل ۲- گره غیر حقیقی تولید شده با عامل بیولوژیک بر روی ریشه گندم (عکس با میکروسکوپ الکترونی)



شکل ۳- تعداد گره های غیر حقیقی در ریشه های گیاه زراعی گندم ۲۰ روزه



شکل ۴- میزان تثبیت نیتروژن در ریشه های گیاه زراعی گندم در طول دوره رشد گیاه



شکل ۵- میزان تثبیت نیتروژن در ریشه های گیاه زراعی گندم در چهاردهمین روز رشد

فهرست منابع:

1. Aceeba, E.B., N.P. Babeva and B.A. Bizov. 1991. Methods of Soil Biochemistry and Microbiology. Moscow University.
2. Al-Mallah, M.K. and E.C. Davey Cocking. 1989. Formation of nodular structures on rice seedlings by *rhizobia*. J. Exper. Bot. 40: 473-478.
3. Boiko, L.I. 1989. The influence of associative N₂-fixers on cereals on Ukraina. Microorganisms-stimulators and inhibitors of plant and animal growths. Abst. conf., 3-5 October, Tashkent, P.46. (In Russian).
4. Chebotar, V.K. 1987. The associative diazotrophs in rhizosphere of sorghum and their influence on yield. The Ph.D thesis. Leningrad. (In Russian).
5. Chebotar, V.K. 1995. Some aspects of interactions of associative diazotrophs with non-legume plants. Abst. IX Confer. On Nitrogen Fixation. Moscow. P.72. (In Russian).
6. Christiansen-Weniger C. 1993. Establishment and nitrogen fixation of ammonium-excreting *Azospirillum* in auxine induced para-nodules of maize. Abst. 6th Int. Symposium on Nitrogen Fixation with Non-legumes. Ismailia (Egypt).
7. Glagoleva, O.B., N.U. Kovalskaya, I.I. Kireev, E. S. Lobakova, and M.M Umarov. 1997. Para nodulation of rape inoculated with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria, Microbiology, 66(4): 455-460.
8. Glagoleva, O.B., N.U. Kovalskaya and M.M. Umarov. 1996. Endosymbiosis formation between nitrogen-fixing bacteria *Pseudomonas caryophylli* and rape root cells. Endocytobiosis and Cell Res. 11 (2/3): 147-158.
9. Glagoleva, O.B, N.U. Kovalskaya, and M.M Umarov. 1998. The Formation of endosymbiosis between the rape roots and nitrogen-fixing rhizosphere bacteria, Dokl. Akad. Nauk, 362: 283-285.
10. Katupitiya, S. J. Millet, M. Vesk, L.Zeman, L. Zhao, C.Elmerich and R.Kennedy . 1995. A mutant of *Azospirillum brasilense* sp₇ impaired in flocculation with modified colonization and superior nitrogen fixation in association with wheat. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1987-1995
11. Kennedy, Iv. R., L. Pereg-Grek, C. Wood, R. Deaker K. Gilechrist and S.Katupitiya. 1997. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: Facilitating the evolution of an effective association between *Azospirillum* and Wheat. Plant and soil 194: 65-79.
12. Khammas, K. M., and P. Kaiser. 1998. Diazotrophic mixed cultures of *Azospirillum* and *Bacillus* species using pectin or rice plantlets as substrates. Proc. 11th Int. Congress on Nitrogen Fixation. Paris, P. 420.
13. Khammas, K. M., V.V. Tran and P. Kaiser. 1993. Nitrogen fixation in rice plant inoculated with pure or mixed cultures of *Azospirillum* species and *Bacillus polymyxa*. Abst. VI Int. Symp. On Nitrogen Fixation with Non-legumes. - Ismailia (Egypt), P. 43.
14. Kovalskaya, .N.U., E .S. Lobakova, and M.M. Umarov. 2001. Formation of artificial nitrogen-fixing symbiosis in rape plants (*Brassica napus*) in nonsterile soil. Microbiology 70: 701-708.
15. Patika, V.P. 1995. The mode of interactions of associative nitrogen-fixing bacteria with cereals. Abst. X Confer. On Nitrogen Fixation. Moscow. P.71. (In Russian).
16. Peter, H., A. Sneath, B. Williams and W. Baltand. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Vol. 1 and 2. P. 1120-1127.
17. Smith D.S. and A.E. Douglas. 1987. The Biology of Symbiosis. Edward Arnold Publishers London.
18. Zlotnikov, A.K., O.B. Glagoleva and M.M Umarov. 1998. Barley yield increase after inoculation with rhizosphere nitrogen fixing consortium *Klebsiella terrigena* + *Bacillus firmus* Proc. 11th Int. Congress on Nitrogen Fixation. Netherland, P. 413.