بررسی توان تولید HCN در سویه های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران و اثرات کاربرد سویه های برتر بر شاخص های رشد گیاه

حسینعلی علیخانی[1]* و محمدرضا قنادها

استادیار گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ Haalikani@yahoo.com

گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران؛ Mghanadha@yahoo.com

چکیده

توانایی تولید HCN توسط سویه های مختلف باکتری به اثبات رسیده است.روش غیر مستقیم کارکردHCN در باکتری های PGPR از طریق کنترل بیولوژیک عوامل بیماری زای گیاهی میباشد. اخیرا" مطالعات انجام شده توسط Pierik, و همکاران (1999) ثابت نمود که سیانید یک لیگاند ذاتی برای پیوند شدن با آهن در جایگاه فعال برخی از آنزیم های باکتری محسوب می شود.همچنین سیانید های تولید شده توسط باکتریها می توانند از طریق تشکیل کمپلکسهای خاص موجب افزایش تحرک برخی از عناصر فلزی از جمله Fe گردند. این پژوهش برای اولین بار در کشور، با هدف بررسی توانایی تولید HCN توسط سویه های ریزوبیومی بومی و ارزیابی اثرات کاربرد مایه تلقیح سویه های برتر بر شاخص های رشد برخی از گیاهان زراعی در دو مرحله آزمایشگاهی و گلخانه ای به اجرا درآمده است. ابتدا 454 جدایه (ریزوبیومی) انتخاب شده از بین جنسهای مختلف ریزوبیومی مورد بررسی های میکروسکوپی و بیوشیمیایی لازم قرار گرفتند. از کشت خالص و تازه تمامی جدایه های ریزوبیومی، سوسپانسیونی با جمعیت یکسان و معادل 5×10^{8} cfu ml-1 تهیه شد. تعیین توان تولید HCN با استفاده از روش پیشنهادی لورک (1948)، اصلاح شده توسط Alstrom (1989) انجام پذیرفت و طی آن سویه های ریزوبیومی در درجات مختلف سیانوژنی گروه بندی شدند. درآزمونهای گلخانه ای تأثیر کاربرد مایه تلقیح سویه های برتر سیانوژن در مقایسه با یک سویه ی برتر ریزوبیومی مولد سیدروفور و نیز شاهد منفی (فاقد باکتری) بر شاخص های رشد و عملکرد گیاهان یونجه و ذرت مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج حاصل اولاً ثابت می کند که باکتریهای ریزوبیومی در زمره باکتری های سیانوژن قرار دارند. از مجموع 454 جدایه ریزوبیومی تعداد 33 جدایه (7/26%) توان تولید HCN را نشان دادند. ثانیاً این توانایی در بین سویه های مختلف یکسان نمی‌باشد. بیشترین تعداد سویه های سیانوژن مشترکاً متعلق به دو گروه (*R.l.v*) *Rhizobium leguminosarum* bv *viciea* و *Sinorhizobium meliloti(S.m)* (مجموعاً حدود 80%) بود. در مقابل هیچیک از باکتریهای کند رشد ریزوبیومی (جنس *برادی ریزوبیوم*) توان تولید HCN نداشتند. اثر تیمار مایه تلقیح ریزوبیومی سیانوژن (تیمار$R.l.vB_4$) بر روی گیاهان یونجه و ذرت موجب تفاوت معنی داری در عملکرد بیولوژیک و اجزاء عملکرد گیاه نسبت به تیمار شاهد منفی (B_O) نگردید ولی در اثر این تیمار غلظت آهن در اندام هوایی گیاه ومقدار آهن قابل جذب در خاک افزایش یافت. بطور کلی و در مجموع HCN رفتاری شبیه سیدروفور از خود نشان داد.

واژه های کلیدی: باکتریهای ریزوبیومی، PGPR ، HCN، سیدروفور

1- نویسنده مسئول: کرج، چهار راه دانشکده، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی گروه مهندسی علوم خاک

* دریافت: 83/2/9 و پذیرش: 85/12/16

مقدمه

به عقیده Dartnall , Burns (1987) یکی از راههای ورود سیانید به بیوسفر، فعالیتهای بخش صنعت می‌باشد. تولید HCN در حاشیه صنایعی چون عکاسی، صنعت استیل و آبکاری الکتریکی فلزات[1]، ثابت شده است. Goel و همکاران (2002) همچنین Blumer و Hass (2000) همچنین Alstrom , Burns (1989) نشان دادند که فرآیندهای بیولوژیک نیز از دیگر راههایی هستند که طی آنها همواره مقادیر قابل توجهی HCN تولید می‌شود.

به اعتقاد Blumer و Hass (2000) توانایی تولید سیانید توسط سویه‌هایی از باکتری ها، همچنین قارچ‌ها و جلبک‌ها به اثبات رسیده است، هرچند نقش سیانیدهای با منشاء قارچی و جلبکی کاملاً مشخص نمی‌باشد. در مقابل، توانایی تولید HCN توسط باکتریها و نقش و اثرات متقابل این متابولیت در ریزوسفر تا حدود زیادی مطالعه شده است Gutierrez و همکاران (1996) ، Goel و همکاران (2002) , Gutierrez (1996).

مطالعات انجام شده توسط Castric (1977) و Wissing (1975) نشان داد می‌دهند که اسید آمینه ی گلیسین، سوبسترا یا پیش نیاز تولید HCN در پروتئوباکتریها می‌باشد. اکسیداسیون و حذف گروه کربوکسیل از گلیسین منجر به تولید CO_2 و HCN می‌گردد که مسئولیت کاتالیز این واکنش به عهده یک کمپلکس آنزیمی به نام HCN- سینتاز (Hydrogen Cyanide Syntase) می‌باشد. Askeland و Morrison (1983) نشان دادند که با استفاده از گلیسین نشان دار شده با کربن رادیو اکتیو، ثابت شده است که HCN از بخش متیلن کربن و گاز CO_2 از گروه‌کربوکسیل گلیسین‌حاصل می‌شود. آنزیم HCN- سینتاز یک فلاوپروتئین متصل به غشاء باکتری می‌باشد، که براساس گروه بندی رایج برای آنزیم‌ها نام گلیسین دهیدروژناز برای آن پیشنهاد شده است Wissing (1974) مدلی را برای تولید HCN در سلولهای باکتری پیشنهاد کرده است که براساس آن ماده گلیسین طی دو مرحله اکسیداسیون به HCN و CO_2 تبدیل می‌گردد. ماده حد واسط ناپایدار در این مدل ایمینواستیک اسید می‌باشد

$$\underset{\text{Glycin}}{H_2N-\underset{H}{CH}-COOH} \xrightarrow[-2H^+]{} \underset{\text{Imino acetic}}{[HN=C(H)-COOH]} \xrightarrow[-2H^+]{} \underset{\text{Hydrogen cyanid}}{H-C\equiv N} + CO_2$$

Lambers (1980) همچنین Milagres و همکاران (1986) گزارش کردند که مقادیر بسیار اندک و در حد چند میکرو مولار سیانید، بازدارندگی بسیار شدیدی بر فعالیت آنزیم سیتوکرم اکسیدازدارد. این آنزیم یکی از عوامل موثر در چرخه تنفسی (و تولید ATP) بسیاری از موجودات زنده بحساب می‌آید.

تحقیقات انجام شده توسط Kremer و (2001) Souissi نیز نشان داده که تقریباً 32% از یک مجموعه شامل 2000 جدایه باکتری، توانایی تولید سیانید داشته‌اند. گرچه توانایی تولید HCN عمدتاً در بین باکتری‌های سودوموناس متمرکز بوده ولی برخی از باکتریهای ریزوبیومی نیز توان تولید سیانید از خود نشان داده‌اند. اخیراً Antoun و همکاران (1998)، برخی از سویه‌های ریزوبیومی را نیز به عنوان باکتریهای PGPR مولد سیانید معرفی نموده‌اند. این باکتریها تولید HCN را در حالت غیرهمزیست و بصورت آزادزی انجام می‌دهند.

Bagnasco و همکاران (1998) ثابت نمودند که تولید HCN توسط ریزوباکتریها نقش مهمی در کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی دارد. طبق گزارش آنها HCN تولید شده، سیستم تنفسی قارچ‌های بیماریزا را مختل نموده و از این طریق موجب توقف رشد آنها می‌گردد. به عقیده آنها سویه‌های مولد HCN می‌توانند بطور مطمئن در کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای خاکزی مورد استفاده قرار گیرند، زیرا این سویه‌ها تأثیر سوء بر دیگر جوامع میکروبی خاک و یا بر رشد گیاهان ندارند.

مطالعات انجام شده توسطPierik و همکاران (1999) نیز ثابت نموده که سیانید یک لیگاند ذاتی برای پیوند شدن با Fe در جایگاه فعال آنزیم Nife – هیدروژناز، [Nife]-hydrogenase باکتریها محسوب می‌شود.

سیدروفورها نیز ترکیبهای آلی با وزن مولکولی کم (500 تا 2000 دالتون) و لیگاندهای شیمیایی با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند شدن با آهن III هستند Milagres, و همکاران (1999) بعلاوه Neilands (1986) نیز ریزوبیوم های مولد سیدروفورهای میکروبی را در زمره ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه، PGPR ، قرار داده‌اند و سیدروفورهای تولید شده توسط این باکتریها را عموماً ریزوباکتین نامیده‌اند.

این پژوهش برای اولین بار در کشور و با هدف بررسی توانایی تولید HCN توسط سویه های ریزوبیومی بومی و ارزیابی اثرات کاربرد مایه تلقیح یک سویه ی برتر سیانوژن در مقایسه با یک سویه ی برتر ریزوبیومی مولد سیدروفور و نیز شاهد منفی (فاقد باکتری) بر روی

1- Electroplating

شاخص های رشد گیاهان یونجه و ذرت، که در دو مرحله آزمایشگاهی و گلخانه ای به اجرا درآمده است.

مواد و روش‌ها

بررسی های میکروبیولوژیک و خالص‌سازی باکتریها

در این تحقیق تعداد 454 جدایه ریزوبیومی متعلق به جنس‌های *Bradyrhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium , Mesorhizobium*، مورد استفاده قرار گرفت. تعداد جدایه‌های هر جنس، با توجه به اهمیت گیاه لگوم همزیست آن جنس یا بیوار (سطح زیر کشت، ارزش غذایی و ...) انتخاب شدند.

ابتدا کلیه باکتریهای ریزوبیومی بر روی محیط Yeast extract Mannitol Agar (YMA)تجدید کشت و از نظر وجود آلودگی‌های احتمالی و کلنی‌های غیرمعمول مورد جستجو قرار گرفتند. در صورت مشاهده اندکی آلودگی در سطح پلیت مراحل خالص‌سازی آن نمونه از طریق بازکشت ادامه یافت. در Subculturing نهایت پلیت‌های عاری از هر گونه آلودگی ظاهری که واجد کلنی‌های تیپیک ریزوبیومی (از نظر اندازه، شکل و رنگ کلنی) بودند از نظر مشخصات میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرام و مشاهده شکل ظاهری باکتری) و نیز عکس‌العمل باکتری بر روی محیط کشت‌های YMA حاوی رنگ کنگورد و معرف بروموتیمول بلو مورد بررسی قرار گرفتند. پس از طی مراحل یاد شده، یک کلنی تیپیک از هر جدایه انتخاب و در داخل سه عددلوله درپیچ‌دار بر روی سطح مورب محیط استریل شده YMA کشت گردید. لوله‌های مایه زنی شده با هر جدایه ریزوبیومی به مدت 4 تا 7 روز (بسته به تند رشد یا کندرشد بودن باکتری) در دمای ^{o}C 28 نگهداری شدند. در صورت رشد کامل باکتری بر سطح شیب‌دار محیط کشت، درب لوله‌ها بخوبی محکم و توسط نوار پارافیلم، درزگیری شده و درون یخچال (دمای ^{o}C 4-2) نگهداری شدند.

آماده‌سازی مایه تلقیح ریزوبیومی

برای انجام هر یک از آزمون‌های یاد شده، مایه تلقیح تازهٔ هر جدایه باکتری به روش زیر تهیه گردید. درون ارلن‌های شیشه‌ای 100 میلی‌لیتری مقدار 15 ml محیط کشت YMB ریخته شد وارلن ها در دمای ^{o}C 121 به مدت 15 دقیقه درون اتوکلاو استریل شدند. پس از سرد شدن ارلن‌ها، محیط کشت مایع درون هر ظرف توسط یک لوپ از نمونه باکتری ریزوبیومی مایه زنی گردید و کشت‌ها به مدت 72 ساعت (باکتریهای تند رشد) تا 120 ساعت (انواع کند رشد) در دمای ^{o}C 28 بر روی بهم‌زن دورانی با سرعت چرخش 120 rpm هوادهی و نگهداری شدند.

پس از رشد کافی باکتری درون محیط کشت YMB، ابتدا دانسیته نوری (OD) سوسپانسیونهای ریزوبیومی با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل $Unico^{TM}$; 1100,USA) در طول موج 570 نانومتر قرائت و آنگاه با استفاده از نمودار رشد (OD – CFU) و براساس فاکتور رقت و از طریق افزودن مقادیر لازم آب مقطر استریل جمعیت باکتری در تمامی سوسپانسیونهای ریزوبیومی در حد 5×10^{8} cfu ml^{-1} تنظیم گردید. به این ترتیب امکان برداشت و کاربرد تعداد یکسان سلول ریزوبیومی زنده برای انجام هر یک از آزمون مورد نظر فراهم گردید.

آزمون کیفی توان تولید هیدرژن سیانید(HCN)

تعیین توان تولید HCN با استفاده از روش پیشنهادی Lork (1948) ، اصلاح شده توسط Alstrom (1989) انجام گردید. ابتدا برای هر جدایه سه ظرف پتری حاوی محیط کشت YMA آماده گردید. هرظرف پتری توسط 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری آماده شده طبق مرحله 2 در سه تکرار مایه زنی شد و سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف، شامل کربنات سدیم 10% و اسید پیکریک 1%، در قسمت درب پلیت قرار داده شد. ظروف پتری توسط نوار پارافیلم به دقت درزگیری شدند تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی شکل و از جمله HCN جلوگیری بعمل آید. آنگاه این ظروف بصورت واژگون در دمای ^{o}C 27، به مدت یک هفته درون انکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید HCN توسط باکتریهای رشد یافته بر روی سطح محیط کشت، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف که درون درب هر ظرف پتری تعبیه شده بود، از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ یافت. توان تولید HCN با توجه به میزان تغییر رنگ کاغذ معرف درون هر پتری مورد ارزیابی قرار گرفت. بطور معمول، رنگ کرم کاغذهای صافی مبین حداقل مقدار تولید HCN و رنگ آجری نشان‌دهنده حداکثر مقدار HCN تولید شده می‌باشد. براین اساس توان تولید HCN در چهار سطح مختلف (I, II, III,IV) بشرح زیر گروه‌بندی و سپس تعداد جدایه‌های ریزوبیومی سیانوژن متعلق به هر سطح، شمارش و ثبت گردید.

درجه‌بندی سطوح سیانوژنی	رنگ کاغذ معرف	توان تولید HCN
I	کرم	حداقل
II	قهوه‌ایی روشن	نسبتاً کم
III	قهوه‌ای تیره	نسبتاً زیاد
IV	آجری	حداکثر

آزمونهای گلخانه ای (یونجه و ذرت)

در آزمون های گلخانه ای با استفاده از گیاهان زراعی یونجه و ذرت، تأثیر کاربرد مایه تلقیح یک سویه ی برتر سیانوژن (تیمارB_4,*RLV*) در مقایسه با یک سویه ی برتر ریزوبیومی مولد سیدروفور(تیمارB_1,*RLV*) و نیز شاهد منفی (تیمار شاهد،B_0 ، فاقد باکتری) بر روی شاخص های رشد گیاهان ارزیابی شد.

ابتدا مایه تلقیح پودری هر کدام از سویه‌های ریزوبیومی مذکور تهیه شدند. کلیه مراحل تهیه مایه تلقیح‌ها در شرایط استریل انجام پذیرفت. برای این منظور مقدار کافی از سوسپانسیون باکتریهای ریزوبیومی مختلف در ارلن‌های حاوی محیط کشت YMB تهیه و پس از تنظیم جمعیت هر یک در حد 5×10^7 cfu ml^{-1}، حجم مشخصی از هر سویه به مقدار (وزن) دقیقی ازماده حامل (پرلیت) اضافه و بخوبی مخلوط و یکنواخت گردید. pH مایه تلقیح‌های پودری ریزوبیوم‌ها با افزودن مقادیر کافی $CaCO_3$ بر روی 7 تنظیم شد. مایه تلقیح‌های آماده شده درون پاکتهای پلی اتیلن استریل قرار گرفته و تا زمان کاشت گیاهان درون یخچال نگهداری شدند. در این دو آزمون از یونجه رقم همدانی و ذرت رقم متوسط رس SC647 استفاده شد. برای رفع نیاز گیاهان آزمایشی به عناصر غذایی، بر اساس نتایج آزمون خاک و توصیه های کودی، مقادیر کافی از کودهای شیمیایی پرمصرف و کم مصرف (بجز آهن) به گلدان ها اضافه گردید. گلدانهای کشت شده فاقد زهکش بودند وروزانه به صورت وزنی تا رسیدن به حدود 70% ظرفیت مزرعه آبیاری شدند.

آزمون های گلخانه ای (یونجه و ذرت) در 5 تکرار، در قالب دو طرح جداگانه بصورت بلوکهای کامل تصادفی، درون گلدانهای حاوی 5 کیلوگرم خاک مناسب (بافت لومی ـ شنی و فقیر از نظرآهن) به مدت چهار ماه در گلخانه به اجرا در آمدند. در پایان دوره رشد، برداشت گیاه و اندازه گیری شاخص های رشد و عملکرد و همچنین تجریه های شیمیایی خاک و گیاه انجام شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SAS v6.12 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج و بحث

Leggett و همکاران (2001) کار بر روی یک مجموعه بزرگ به منظور یافتن سویه های برتر محرک رشد گیاه را انتظاری کاملاً منطقی دانسته اند. طبق پیش‌بینی آنها از هر یکصد نمونه استفاده شده در عملیات غربالگری معمولاً یک نمونه عالی یافت می‌شود که می‌توان آنرا بعنوان سویه های برتر معرفی نمود. لذا در این تحقیق به منظور دستیابی به نتایج بهتر از یک مجموعه ی کلکسیونی بزرگ باکتریهای ریزوبیومی استفاده شد.

نتایج حاصل از این تحقیق که در دو مرحله ی آزمایشگاهی (آزمون نیمه کمی توان تولید هیدرژن سیانید) و آزمون های گلخانه‌ای (تأثیر کاربرد سویه های برتر بر شاخص های رشد گیاهان یونجه و ذرت) طراحی و اجرا شده است بشرح زیر می‌باشد:

آزمون نیمه کمی توان تولید هیدرژن سیانید (HCN)

نتایج حاصل از آزمون نیمه کمی توان تولید هیدرژن سیانید اندازه‌گیری شده در 454 سویه ریزوبیومی، اولاً ثابت می‌کند که برخی از باکتریهای ریزوبیومی توان تولید HCN را دارند، لذا می‌توان آنها را در لیست باکتریهای سیانوژنیک قرارداد. مشابه این نتایج اولین بار توسط Antoun و همکاران (1998) گزارش شده است. ثانیاً توان تولید این متابولیت (HCN) در بین سویه‌های ریزوبیومی سیانوژن یکسان نیست.

جدول شماره 1 فراوانی (تعداد / درصد) سویه‌های ریزوبیومی را نشان می‌دهد. طبق نتایج حاصل، از بین 454 سویه ریزوبیومی تعداد 33 سویه یعنی معادل 7/27 درصد آنها سیانوژنیک هستند. نتایج مطالعات Antoun و همکاران (1998) نشان داده است که حدود 3 درصد از سویه‌های ریزوبیومی توان تولید HCN را دارند. تعداد سویه‌های متعلق به سطوح مختلف سیانوژنی یعنی درجات I, II, III و IV نیز یکسان نبوده و به ترتیب برابر ۶،۱۰،۱۱ و 6 سویه ریزوبیومی می باشد.

نتایج همچنین نشان می‌دهد که از بین 60 سویه *ریزوبیوم لگومینوساروم* بیووار *ویسیه* (*Rlv*) تعداد 13 سویه (21/7%) دارای توان تولید HCN بودند در صورتیکه از بین 87 سویه *مزوریزوبیوم سیسری* (*Mc*) تنها تعداد 3 سویه

(3/45%) توان تولید HCN را نشان دادند که بدین ترتیب می‌توان حداکثر و حداقل فراوانی سیانوژن‌ها را در بین باکتریهای ریزوبیومی معرفی نمود. از طرف دیگر هیچکدام از سویه‌های ریزوبیومی کند رشد، اعم از برادی *ریزوبیوم ژاپنیکوم* (*Bj*) و یا سویه‌های برادی ریزوبیوم همزیست بادام زمینی (*B*sp) توانایی تولید HCN نداشتند. در مقابل از مجموع 168 سویه *سینوریزوبیوم ملیلوتی*، تعداد 13 سویه معادل 7/74 درصد سویه‌ها توانایی تولید HCN از خود نشان دادند که این فراوانی نزدیک به رقم بدست آمده مربوط به درصد کل ریزوبیوم‌های سیانوژن یعنی 7/23% (تعداد 33 سویه از 454 سویه ریزوبیومی) می‌باشد.

بعلاوه اینکه حدود 80% از مجموع 33 سویه ریزوبیومی سیانوژن شناسایی شده متعلق به جدایه های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (13 سویه = 39/4%) و *ریزوبیوم لگومینوساروم* بیووار *ویسیه* (13 سویه = 39/4%) می‌باشد و حدود 20% سویه‌های باقی مانده نیز به گروههای *ریزوبیوم لگومینوساروم* بیووار *فاسئولی و تریفولی* (*Rlp*و *Rlt*) و *مزوریزوبیوم سیسری* (*Mc*) تعلق دارند.

آزمون های گلخانه‌ای

طبق نتایج حاصل از هر دو طرح گلخانه ای، بین سویه برتر مولد HCN (تیمارB_4 ,*Rlv*) با سویه برتر ریزوبیومی مولد سیدروفور (تیمارB_1 ,*Rlv*)، و تیمار شاهد منفی (B_0)، جز در مقدار آهن گیاه و خاک، در مورد هیچیک از شاخص های رشد و عملکرد گیاهان یونجه و ذرت شامل: عملکرد بیولوژیک، ارتفاع بوته و نیز وزن خشک بلال ها تفاوت معنی داری مشاهده نشده است.

براساس تجزیه واریانس داده ها (جدول2)، مایه زنی گیاه با سویه های ریزوبیومی (تیمارهای B_4 ,B_1 در مقایسه با تیمار شاهد B_0)، بر روی غلظت آهن در اندام هوایی گیاهان یونجه و ذرت و نیز بر مقدار کل جذب آهن در این گیاهان، اثر معنی دار داشته است. همچنین در مورد گیاه ذرت، تأثیر این تیمارها بر مقدار آهن قابل جذب در خاک گلدان، در سطح یک درصد معنی دار شده است. مقایسه میانگین داده ها به روش آزمون چند دامنه دانکن (در سطح 5%) نیز در شکل های 1و2 نشان داده شده است.بر طبق نتایج حاصل، گرچه بالاترین غلظت آهن در اندام هوایی هر دو گیاه یونجه و ذرت، مربوط به تیمارمایه زنی گیاهان با سویه ریزوبیومی تولید کننده سیدروفور (B_1) است، با اینحال سویه مولد HCN نیز نسبت به شاهد بدون باکتری (B_0)، غلظت آهن را در هر دو گیاه، بطور معنی داری افزایش داده است (شکل1). مقدار آهن قابل جذب، در خاک گلدانهای زیر کشت ذرت نیز در نتیجه استفاده از سویه های ریزوبیومی، افزایش معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داده و در آن مورد سویه مولد HCN (B_4)، حتی بر سویه مولدسیدروفور برتری یافته است (شکل2). در آزمون مربوط به یونجه نیز مقدار آهن قابل جذب در خاک گلدانهای مایه زنی شده با سویه مولد سیدروفور (B_1)، افزایش قابل توجه داشته است، هر چند تفاوت بین تیمارها به لحاظ آماری معنی دار نشده است (شکل 2). براساس تجزیه واریانس داده ها (جدول2)، مایه زنی گیاه با سویه های ریزوبیومی (تیمارهای B_1 و B_4 در مقایسه با تیمار شاهدB_0)، بر روی غلظت آهن در اندام هوایی گیاهان یونجه و ذرت و نیز بر مقدار کل جذب آهن در این گیاهان، اثر معنی دار داشته است همچنین در مورد گیاه ذرت، تأثیر این تیمارها بر مقدار آهن قابل جذب در خاک گلدان، در سطح یک درصد معنی دار شده است. مقایسه میانگین داده ها به روش آزمون چند دامنه دانکن (در سطح 5%) نیز در شکل های 1و2 نشان داده شده است.بر طبق نتایج حاصل، گرچه بالاترین غلظت آهن در اندام هوایی هر دو گیاه یونجه و ذرت، مربوط به تیمارمایه زنی گیاهان با سویه ریزوبیومی تولید کننده سیدروفور (B_1) است، با اینحال سویه مولد HCN نیز نسبت به شاهد بدون باکتری (B_0)، غلظت آهن را در هر دو گیاه، بطور معنی داری افزایش داده است (شکل1). مقدار آهن قابل جذب، در خاک گلدانهای زیر کشت ذرت نیز در نتیجه استفاده از سویه های ریزوبیومی، افزایش معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داده و در آن مورد سویه مولد HCN (B_4)، حتی بر سویه مولدسیدروفور برتری یافته است (شکل2). در آزمون مربوط به یونجه نیز مقدار آهن قابل جذب در خاک گلدانهای مایه زنی شده با سویه مولد سیدروفور (B_1)، افزایش قابل توجه داشته است، هر چند تفاوت بین تیمارها به لحاظ آماری معنی دار نشده است (شکل2).

به طور کلی بر اساس نتایج آزمون های گلخانه ای این تحقیق، HCN به دلیل افزایش جذب آهن توسط گیاه و نیز افزایش مقدار آهن قابل جذب در خاک، رفتاری مشابه سیدروفور از خود نشان داده است. Bakker و Schippers (1986) نیز نشان دادند که در محیط کشت باکتریهای سودوموناس رشد یافته در شرایط کمبود آهن، مخلوطی از کمپلکس‌های آهن ـ سیانید یافت شده است که وظیفه فیزیولوژیک این ترکیبات به طور دقیق مشخص نشده ولی در مجموع رفتاری مشابه یک سیدروفور به آنها نسبت داده اند.

سپاسگزاری

این پژوهش از محل اعتبارات مربوط به طرح مطالعات و تحقیقات بین دانشگاهی(دانشگاه تهران و دانشگاه وی عصر"عج" رفسنجان) به شماره طرح

31313371 کـد پـروژه 016 انجـام گرفتـه اسـت.لـذا از همکاری و مساعدت معاونتهای دو دانشگاه مـذکور کمـال تشکر را داریم.همچنین لازم است از زحمات سرکار خانم محمدی قدر دانی به عمل آید.

جدول 1ـ فراوانی باکتریهای ریزوبیومی در سطوح مختلف سیانوژنی

گروههای مختلف ریزوبیومی		تعداد سویه	فراوانی ریزوبیوم‌های سیانوژن					درصد در گروههای‌مختلف ریزوبیومی	
نام گروه (جنس، گونه و بیووار)			تعدادباکتری‌درسطوح مختلف‌سیانوژنی*					A	B
			I	II	III	IV	جمع		
R.leguminosarum	bv.*phaseoli*	58	0	3	0	0	3	9/1	5/2
	bv.*viciae*	60	2	1	7	3	13	39/4	21/7
	bv.*trifolii*	9	0	0	1	0	1	3	11/1
جمع		127	2	4	8	3	17	51/5	13/4
Sinorhizobium meliloti		168	7	1	2	3	13	39/4	7/74
Mesorhizobium ciceri (& M. mediterraneum)		87	1	1	1	0	3	9/1	3/45
Bradyrhizobium japonicum *B.* spp(groundnut)		72	0	0	0	0	0	0	0
جمع کل		454	10	6	11	6	33	100	-
درصد در سطوح‌مختلف سیانوژنی	A		30/3	18/2	33/3	18/2	100		
	C		2/2	1/32	2/43	1/32	/27 7		

A = درصد فراوانی نسبت به 33 سویه ریزوبیومی سیانوژن

B = درصد فراوانی نسبت به سویه‌های ریزوبیومی متعلق به هر گروه

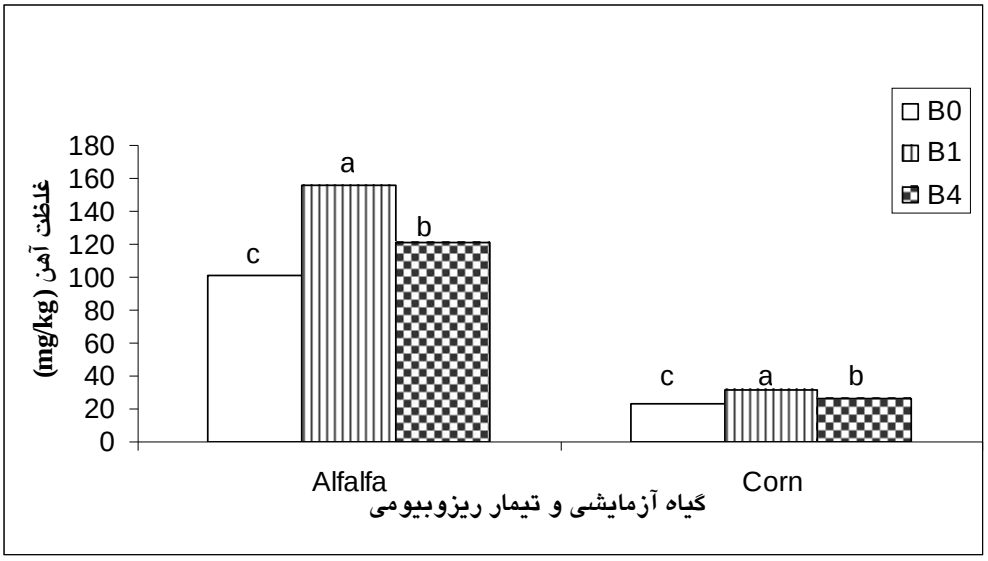
C = درصد فراوانی نسبت به کل سویه‌های ریزوبیومی (454 سویه)

* = IV, III, II, I به ترتیب حداقل، نسبتا"کم، نسبتا"زیاد و حداکثرتوان تولید HCN

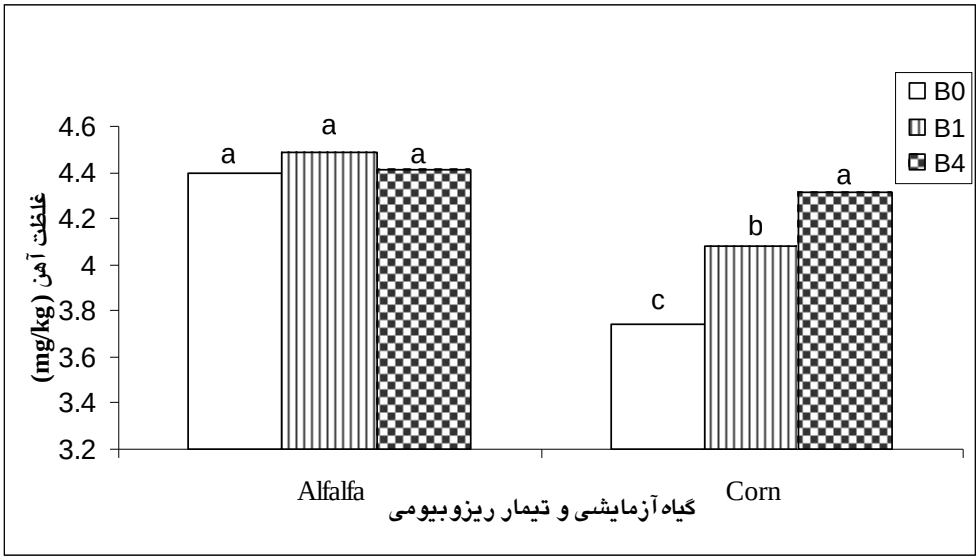
جدول 2- تجزیه واریانس مقدار آهن قابل جذب، مقدار کل جذب آهن و غلظت آهن در اندام هوایی گیاهان یونجه و ذرت مایه زنی شده با سویه های ریزوبیومی مولد HCN و سیدروفور

منابع تغییرات (SOV)	درجه آزادی (DF)	میانگین مربعات (MS)					
		غلظت آهن در اندام هوایی گیاه (mg/kg)		مقدار کل جذب آهن در گیاه (mg/pot)		مقدار آهن قابل جذب در خاک (mg/kg)	
		یونجه	ذرت	یونجه	ذرت	یونجه	ذرت
بلوک	3	1789/52	5/83	0/043	0/011	0/0132	0/0017
تیمار	2	3082/06^{+}	29/41*	0/183^{+}	0/052*	0/0104	0/328**
خطا	6	920/69	3/54	0/047	0/006	0/0134	0/0119
C.V	-	14/06	6/64	18/58	6/99	2/61	2/70

** ، * ، $^{+}$ به ترتیب معنی دار در سطح 1 ، 5 و 10 درصد



شکل 1- مقایسه میانگین غلظت آهن در اندام هوایی گیاهان مایه زنی شده با سویه های ریزوبیومی مولدHCN و سیدروفور به روش آزمون چند دامنه ای دانکن (در سطح 5%)



شکل 2- مقایسه میانگین مقدار آهن قابل جذب در خاک گلدانهای حاوی گیاهان مایه زنی شده با سویه های ریزوبیومی مولد HCN و سیدروفوربه روش آزمون چند دامنه ای دانکن (در سطح 5%)

فهرست منابع:

1. Alstrom, S. and R.G. Burns, (1989) Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition.Biol.Fertil.Soils.7:232-238.
2. Antoun, H., Beauchamp, C.J., Goussard, N., Chabot, R. and Lalande,R. (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes(*Raphanus sativus* L.).Plant and soil, 204: 57-67.
3. Askeland, R.A., Morrison, S.M. (1983) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol.45: 1802-1807.
4. Bagnasco, P., De La Fuente, L., Gualtieri, G., Noya, F., Anas, A. (1998) Fluorescent *pseudomonas* spp. as biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi.Soil.Biol.Biochem.30:1317-1322.
5. Bakker, A.W. and Schippers, B. (1986) Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas* spp-mediated plant growth-stimulation. Role of cyanide in yield reduction: soil.Biol.Fertil Soils, 6: 451-453.
6. Blumer, C. and Hass, D. (2000) Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Arch. Microbiol. 173(3):170-177.
7. Castric, P.A. (1977) Glycine metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: hydrogen cyanide biosynthesis. J. Bacteriol.130: 826-831.
8. Dartnall, A.M. and Burns, R.G. (1987) A sensitive method for measuring cyanide and cyanogenic glucosides in sand culture and soil.Biol.Fertil Soils, 5:141-147.
9. Goel, A., Sindhu, S. and Dadarwal, K. (2002) Stimulation of nodulation and plant growth of chickpea (*Cicer arietinum* L.) by *Pseudomonas* spp.antagonistic to fungal pathogens. Biol. Fertil.Soils, 36(6): 391-396.
10. Gutierrez Manero, F. J., Acero, N., Lucas, A. and Probanza, A. (1996) The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn.)growth. Plant and Soil, 182: 67-74.
11. Kremer, R.J. and Souissi, T. (2001) Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Curr. Microbiol. 43(3): 182-186.
12. Lambers, H. (1980) The physiological significance of cyanide-resistant respiration in higher plant. Plant Cell and Environment, 3:293-302.
13. Leggett, M.E., Gleddie, S., Holloway, G. (2001) Phosphate solubilizing microorganisms and their use. Philom. Bios. INC. Saskatoon, Saskatchwan, Canada.
14. Milagres, A.M.F., Machuca, A. and Napoleao, D. (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay .J. Microbiol. Methods, 37:1-6.
15. Neilands, J.B. and Leong, S.A. (1986) Siderophores in relation to plant growth and disease. Ann. Rev. Plant. Physiol.37:187-208.
16. Pierik, A.J., Rosenboom, W., Happe, R.P., Bagley, K.A., Albracht, S.P.(1999) Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [Nife]-hydrogenases. J.Biol.Chem.274:3331-3337.
17. Wissing, F. (1974) Cyanide formation from oxidation of glycine by a *Pseudomonas* species.J.Bacteriol.117:1289-1294.
18. Wissing, F. (1975) Cyanide production from glycine by a homogenate from a *Pseudomonas* species. J. Bacteriol.121: 695-699.