بررسی تحمل به کمبود آهن در دانهال‌های بِه با کاربرد باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد

ساره رحیمی[۱*]، بهرام بانی نسب[۲]، مجید طالبی[۳]، حسین شریعتمداری[۴]، مهدی زارعی[۵]، مهدیه غلامی[۶]

[۱*] دانشجوی دکتری،گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

[۲] دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

[۳] دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

[۴] استاد، گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

[۵] دانشیار، بخش خاکشناسی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

[۶] استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

[*] نویسنده مسئول: sareh.rahimi@ag.iut.ac.ir

چکیده

درخت بِه از جمله درختان میوه دانه‌دار بومی ایران است که به دلیل حساسیت به کلروز ناشی از کمبود آهن با کاهش کمیت و کیفیت محصول مواجه می‌باشد. در این مطالعه اثر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر برخی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی دانهال‌های بِه رقم اصفهان در شرایط کمبود آهن مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور و سه تکرار اجرا شد. فاکتورها شامل باکتری در چهار سطح (بدون باکتری، *Pseudomonas flourescens* و *Micrococcus yunnanensis* و ترکیب آن‌ها) و تیمار آهن در دو سطح (۵ و ۵۰ میکرومولار) بود. در پایان آزمایش نتایج نشان داد که تیمارهای باکتری اثر قابل توجهی بر محتوای کلروفیل برگ، وزن خشک ریشه، اندام هوایی و فنل کل ریشه در شرایط کمبود آهن داشته است. بالاترین سطح کلروفیل کل در تیمار *Micrococcus yunnanensis* و نیز ترکیب هر دو باکتری مشاهده شد. در غلظت ۵ میکرومولار آهن بیش‌ترین میزان وزن خشک ریشه و اندام هوایی مربوط به باکتری *Micrococcus yunnanensis* بود. میزان فنل کل ریشه با کاهش غلظت آهن افزایش معنی‌داری در تیمار *Micrococcus yunnanensis* نشان داد. به طور کلی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در بین تیمارها، باکتری *Micrococcus yunnanensis* می‌تواند تحمل به کلروز ناشی از کمبود آهن را در دانهال‌های به افزایش دهد.

کلمات کلیدی: فنل کل، کلروفیل، *Micrococcus yunnanensis*، *Pseudomonas flourescens*

مقدمه

میوه بِه به دلیل مصارف مختلف از جمله تازه‌خوری، فرآوری، مصارف صنعتی، زینتی و دارویی از نظر اقتصادی میوه با اهمیتی به‌شمار می‌رود. حساسیت به کلروز ناشی از کمبود آهن از جمله مشکلات اساسی این درخت در مناطق مختلف کشت آن به حساب می‌آید. کلروز علاوه بر تحت تأثیر قرار دادن باغ‌های بِه موجب ضررهای اقتصادی برای ارقام گلابی پیوند شده روی این پایه‌ها نیز می‌گردد. کمبود آهن در فیزیولوژی و بیوشیمی قسمت‌های مختلف گیاه منعکس می‌شود زیرا آهن کوفاکتور مهمی برای بسیاری از آنزیم‌ها می‌باشد که در مسیر بیوسنتزی کلروفیل و نیز هورمون‌های گیاهی مشارکت می‌کند (Rouphael *et al*., 2010). یکی از راهکارهای تأمین عناصر معدنی مورد نیاز گیاه و تولید بیش‌تر محصولات کشاورزی در واحد سطح استفاده از نهادها از جمله انواع کودهای شیمیایی و زیستی می‌باشد. کودهای شیمیایی علاوه بر پرهزینه بودن موجب آلودگی‌های زیست محیطی نیز می‌گردند. به همین علت پژوهش‌گران در سراسر جهان سعی می‌کنند با یافتن سایر منابع جایگزین که کارآمد بوده و محیط زیست را نیز حفاظت نماید بر این شرایط غلبه کنند. بدین منظور امروزه سعی بر آن است تا از پتانسیل ریزموجودات خاک به منظور حداکثر تولید و حفظ کیفیت منابع آب و خاک استفاده گردد، به طوری‌که اغلب پژوهشگران بر این باورند که استفاده از کودهای زیستی به ویژه همزیستی ریزوبیوم و قارچها با گیاه می‌تواند یک منبع جایگزین مناسب برای کودهای شیمیایی و یک تکنولوژی امید بخش برای تغذیه گیاه باشد (Wang *et al*., 2011). زمانی که

IrHC2019

گیاه از کمبود آهن رنج می‌برد میکروارگانیسم‌های ریزوسفری ترکیبات آلی با وزن مولکولی پایین مانند سیدروفورها، اسیدهای آلی و نیز پروتون به محیط ریزوسفر ترشح می‌کنند که موجب افزایش دسترسی آهن توسط ریشه‌های گیاه می‌گردد (Jin *et al*., 2014). مطالعات حاصل از بررسی نقش ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه حاکی از افزایش عملکرد و رشد گیاه در مرکبات، سیب، زردآلو و ... می‌باشد (Esitken *et al*., 2003; Karlidag *et al*., 2007).

اکثر مطالعات صورت گرفته در زمینه نقش باکتری‌ها بر جذب عناصری مانند فسفر می‌باشد در حالی‌که اطلاعات موجود بر نقش آن‌ها در جذب ریزمغذی‌هایی مانند آهن محدود است. بنابراین مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه بر برخی ویژگی‌های مورفوفیزیولوژیکی دانهال‌های بِه رقم اصفهان در شرایط کمبود آهن انجام شد.

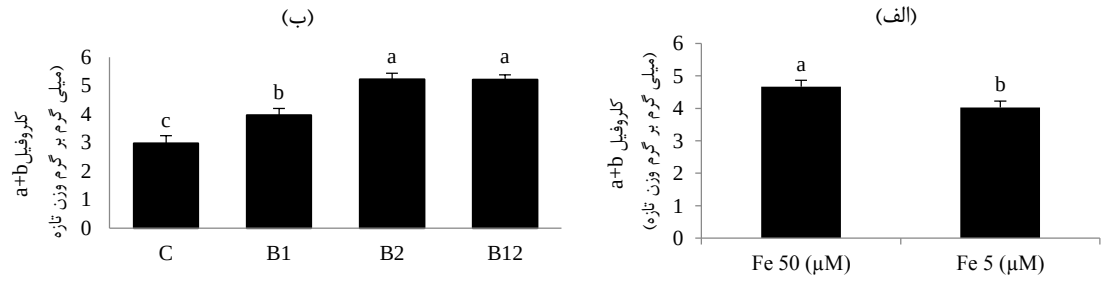
مواد و روش‌ها

این آزمایش بر روی دانهال‌های بِه رقم اصفهان در گلخانه گروه علوم باغبانی دانشگاه صنعتی اصفهان و به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ی کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. فاکتور اول شامل کاربرد دو گونه باکتری *Pseudomonas flourescens*، *Micrococcus yunnanensis* و ترکیب آن‌ها و فاکتور دوم دربرگیرنده‌ی تیمار آهن در دو سطح ۵ و ۵۰ میکرومولار بود. به منظور انجام آزمایش پس از رفع نیاز سرمایی بذرها در گلدان‌های پلاستیکی ۲/۵ لیتری حاوی محیط کشت شن و پرلایت (به نسبت حجمی ۱ به ۱) استریل شده کشت شدند. برای تلقیح بذر توسط باکتری‌ها در هر حفره کاشت به ازای هر بذر ۲ میلی‌لیتر مایه تلقیح حاوی 10^8 سلول باکتری زنده و فعال در هر میلی‌لیتر استفاده گردید. تیمارهای باکتریایی هر ماه یک مرتبه همراه با آب آبیاری تکرار شد. از زمان کاشت بذرها تا استقرار کامل دانهال‌ها و شروع تیمارهای آهن، تمامی گلدان‌ها ۲ مرتبه در طول هفته (به مدت ۳ ماه) با ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند (pH ۶±۰/۱) تغذیه شدند. سه ماه پس از کاشت بذرها تیمار آهن با دو سطح ۵ میکرومولار (شرایط کمبود) و ۵۰ میکرومولار (حد بهینه) اعمال شد و با مشاهده علائم کمبود آهن در برگ‌ها جهت اندازه‌گیری پارامترهای مورد نظر نمونه‌گیری از برگ و ریشه صورت گرفت و فاکتورهایی مانند محتوای کلروفیل کل، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و میزان ترکیبات فنلی کل ریشه اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

محتوای کلروفیل کل

نتایج حاصل از اندازه‌گیری کلروفیل کل برگ نشان داد که با کاهش غلظت آهن میزان کلروفیل کاهش یافته است «شکل ۱-الف». بیش‌ترین میزان کلروفیل مربوط به تیمار *Micrococcus yunnanensis* و نیز تیمار ترکیبی هر دو گونه باکتری بود «شکل ۱-ب». آهن نقش اساسی در ساختمان کلروفیل دارد در این راستا نشان داده شده که بالاتر بودن میزان کلروفیل برگ در شرایط تنش در تیمارهای باکتریایی به دلیل اثر آن‌ها بر افزایش کارایی جذب عناصر غذایی از جمله آهن می‌باشد (Stefan *et al*., 2013).

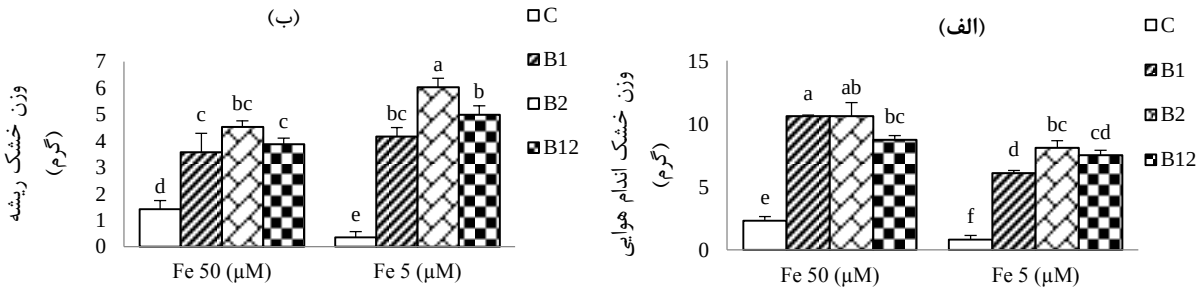


شکل ۱-اثر سطوح آهن (الف) و تیمارهای باکتری بر میزان کلروفیل برگ (ب): (C: شاهد، B1: *Pseudomonas flourescens*، B2: *Micrococcus yunnanensis*، B12: ترکیب دو باکتری)

IrHC2019

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

بررسی مقایسه میانگین‌های وزن خشک اندام هوایی دانهال‌ها مشخص کرد که با محدود شدن منبع آهن میزان وزن خشک تیمار شاهد و باکتری *Pseudomonas flourescens* کاهش معنی‌داری نشان داده‌اند. اما به طور کلی در غلظت ۵ میکرومولار آهن تمامی تیمارهای باکتری به صورت قابل توجهی در مقایسه با شاهد وزن خشک بیش‌تری داشتند «شکل ۲-الف». گزارش شده است طی کمبود آهن سرعت تجزیه کربوهیدرات‌ها افزایش و رشد و نمو گیاه کاهش می‌یابد. در مقابل باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق بهبود جذب عناصر غذایی، اثر بر هورمون‌های گیاهی و نیز القاء فعالیت ACC دآمیناز (که منجر به کاهش سطح اتیلن می‌گردد) موجب رشد رویشی قوی‌تر می‌گردند (Nadeem *et al*., 2014).



شکل ۲- برهمکنش تیمار آهن و باکتری بر وزن خشک اندام هوایی (الف) و وزن خشک ریشه (ب)

(C: شاهد، B1: *Pseudomonas flourescens*، B2: *Micrococcus yunnanensis*، B12: ترکیب دو باکتری)

در شرایط کمبود آهن (غلظت ۵ میکرومولار) برخلاف تیمار شاهد که کاهش معنی‌داری در وزن خشک ریشه نشان داد تیمارهای باکتریایی موجب افزایش وزن خشک ریشه شدند و این افزایش در تیمار *Micrococcus yunnanensis* و ترکیب هر دوگونه باکتری معنی‌دار بود «شکل ۲-ب».

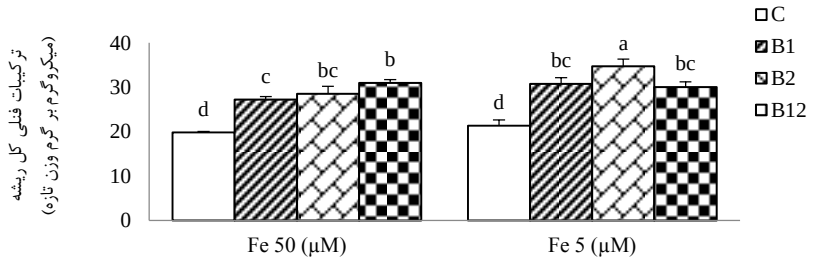
برخلاف توانایی برخی از گیاهان در گسترش سیستم ریشه‌ای خود تحت شرایط کمبود آهن، دانینی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش داده‌اند که درختان بِه در شرایط کمبود آهن رشد ریشه خود را کاهش می‌دهند که این امر می‌تواند به تغذیه معدنی گیاه آسیب رسانده و موجب بروز کلروز ناشی از کمبود آهن گردد. در مقابل اثبات شده است که تلقیح گیاهان با باکتری‌های محرک رشد با اثر بر سنتز هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و سیتوکینین می‌تواند بر نمو ریشه، وزن ریشه و افزایش راندمان جذب اثر مثبت داشته باشند (Jin *et al*., 2014). اثر مثبت باکتری‌ها بر سنتز هورمون‌های گیاهی و سیدروفور و اثر این ترکیبات بر رشد ونمو ریشه در گیاهانی مانند زردآلو و نارنج سه برگ و توت‌فرنگی اثبات شده است (Ipek *et al*., 2014; Wang *et al*., 2016; Esitken *et al*., 2003). بنابراین به دنبال افزایش تعداد ریشه به عنوان نتیجه‌ای از تلقیح باکتری، مکان ترشح پروتون‌ها و سیدروفورها در شرایط کمبود آهن افزایش می‌یابد که درنهایت منجر به جذب بیش‌تر آهن از ریزوسفر می‌گردد.

محتوای فنل کل ریشه

IrHC2019

با کاهش غلظت آهن میزان فنل کل افزایش یافت و این افزایش در تیمار *Micrococcus yunnanensis* معنی‌دار بود. اگرچه در غلظت ۵ میکرومولار آهن هر دو گونه باکتری و نیز ترکیب آن‌ها مقادیر بالاتری از فنل کل را در مقایسه با شاهد نشان دادند «شکل ۳».

در این رابطه اثبات شده است که ترکیبات فنلی ترشح شده از ریشه و میکروارگانیسم‌های خاک از طریق کلات‌سازی و یا احیاء آهن غیرقابل حل موجب در دسترس قرار گرفتن آن برای جذب توسط سلول‌های ریشه و انتقال به شاخه می‌گردد (Masalha *et al*., 2000).



شکل ۳- برهمکنش تیمار آهن و باکتری بر ترکیبات فنلی کل ریشه

(C: شاهد، B1: *Pseudomonas flourescens*، B2: *Micrococcus yunnanensis*، B12: ترکیب دو باکتری)

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان عنوان نمود که تیمارهای باکتری به ویژه *Micrococcus yunnanensis* با اثر بر رشد ریشه و ترشح بیش‌تر ترکیبات فنلی در مقایسه با شاهد موجب بهبود جذب آهن و در نتیجه سنتز بیش‌تر کلروفیل، رشد رویشی قوی‌تر و در نهایت افزایش تحمل به کمبود آهن می‌گردند.

منابع

Esitken, A., Karlidag, H., Ercisli, S., Turan, M. and Sahin, F. 2003. The effect of spraying a growth promoting bacterium on the yield, growth and nutrient element composition of leaves of apricot (*Prunus armeniaca* L. cv. Haci-haliloglu). Australian Journal of Agricultural Research, 54: 377–380.

Ipek, M., Pirlak, L., Esitken, A., Donmez, M. F., Turan, M. and Sahin, F. 2014. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Increase Yield, Growth and Nutrition of Strawberry Under High-Calcareous Soil Conditions. Journal of Plant Nutrition, 37: 990–1001.

Jin, C. W., Ye, Y. Q. and Zheng, S. J. 2014. An underground tale: contribution of microbial activity to plant iron acquisition via ecological processes. Annals of Botany, 113: 7–18.

Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M. and Sahin, F. 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PG on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. Scientia Horticulturae, 114: 16–20.

Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O. and Mengel K. 2000. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. Biology and Fertility of Soils, 30: 433-9.

IrHC2019

Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A. and Ashraf, M. 2014. The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. Biotechnology Advances, 32: 429–448.

Rouphael, Y., Cardarelli, M., Mattia, E. D., Tullio, M., Rea, E. and Colla, G. 2010. Enhancement of alkalinity tolerance in two cucumber genotypes inoculated with an arbuscular mycorrhizal biofertilizer containing *Glomus intraradices*. Biology and Fertility of Soils, 46: 499–509.

Stefan, M., Munteanu, N., Stoleru, V. and Mihasan, N. 2013. Effects of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on photosynthesis, antioxidant status and yield of runner bean. Romanian Biotechnological Letters, 18: 8132-8143.

Wang, p., Wu, S. H., Wen, M. X., Wang, Y. and Wu, Q. S. 2016. Effects of combined inoculation with Rhizophagus intraradices and Paenibacillus mucilaginosus on plant growth, root morphology, and physiological status of trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.) seedlings under different levels of phosphorus. Scientia Horticulturae, 205: 97–105.

Wang, X., Pan, F., Chen, X. Y. and Liao, H. 2011. Effects of co inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. Mycorrhiza, 21: 173-181.

Zhang, H., Sun, Y., Xie, X., Kim, M. S., Dowd, S. E. and Pare, P. W. 2009. A soil bacterium regulates plant acquisition of iron via deficiency-inducible mechanisms. The Plant Journal, 58: 568–577.

Investigation of iron deficiency tolerance in quince seedlings by application of plant growth promoting rhizobacteria

Sareh Rahimi[1*], Bahram Baninasab[2], Majid Talebi[3], Hossein Shariatmadari[4], Mehdi Zarei[5], Mahdiyeh Gholami[6]

[1*] Ph. D Student, Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
[2]Associate Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
[3]Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
[4]Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, University of Technology
[5]Associate Professor, Department of Soil Science, College of Agriculture, Shiraz University
[6]Assistant Professor, Department of Horticulture, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
[*]*Corresponding Author*: sareh.rahimi@ag.iut.ac.ir

Abstract

Quince is native to Iran and because of it's sensitivity to iron deficiency the quantity and quality of fruits have decreased. In this study, was investigated the effects of plant growth promoting rhizobacteria on morpho-physiological characteristics of quince. Greenhouse experiment was conducted with factorial arrangement in a completely randomized design with three factors and four replications. Factors consisted of four levels of bacteria (without bacteria inoculation, inoculation with *Pseudomonas flourescens*, *Micrococcus yunnanensis* and combine them) and two iron levels (5 and 50 µM). At the end of the experiment, the results showed that bacterial treatments had a significant effect on root and shoot dry weight, chlorophyll content and total phenolic compounds in iron deficiency conditions. Co-application of bacterial and also *Micrococcus yunnanensis* showed the highest chlorophyll content. At 5 µM iron concentration, the highest root and shoot dry weight were related to *Micrococcus yunnanensis*. Total phenolic content showed a significant increase in *Micrococcus yunnanensis* at 5 µM iron concentration. It seems between bacterial treatments the *Micrococcus yunnanensis* can increase the tolerance to iron chlorosis in the quince seedlings.

***Keywords*:** Total phenolic, Clorophyll, *Micrococcus yunnanensis, Pseudomonas flourescens*

IrHC2019