جداسازی *باسیلوس*های محرک رشد گیاهی از رایزوسفر صیفی‌جات گلخانه‌ای (خیار، گوجه‌فرنگی و فلفل دلمه‌ای)

رقیه زارع[۱]، اکرم صادقی*[۲]، مهروز دزفولیان[۱]
[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج
[۲] گروه بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
*نویسنده مسئول: aksadeghi@abrii.ac.ir

چکیده

مطالعه میکرو فلور بومی شامل گونه‌های باکتری مفید جهت شناسایی و حفظ ذخایر ژنتیکی کشور ضروری است. در زمینه جداسازی و خصوصیت‌یابی گونه‌های *باسیلوس* محرک رشد گیاهی ایران تحقیق کافی صورت نگرفته است. تهیه منابع میکروبی جهت استفاده در برنامه‌های تولید کود و سم زیستی به‌عنوان جایگزین مواد شیمیایی یک اقدام مثبت در راه رسیدن به تولید محصولات کشاورزی سالم و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی است. در این مطالعه *باسیلوس*ها از خاک ریزوسفر گلخانه‌های صیفی‌جات استان‌های یزد و اصفهان که از قطب‌های کشت این محصولات هستند جداسازی و شناسایی شد. *باسیلوس*های جدا شده بر اساس تعدادی از مهم‌ترین صفات محرک رشدی شامل تولید سیدروفور، تولید ACC- دآمیناز، تولید متابولیت‌های فرار و بیوکنترل فرم مخصوص قارچ بیمارگر *فوزاریوم اکسیسپوروم* (*Fusarium oxysporum*) انتخاب شدند. از میان جدایه‌های منتخب ۳ باکتری جدا شده از خیار، ۲ باکتری جدا شده از گوجه‌فرنگی و ۲ باکتری جدا شده از فلفل دلمه‌ای که واجد بیش از ۳ مورد از صفات محرک رشدی و بیوکنترلی بودند برای بررسی گلخانه‌ای استفاده شدند. بررسی تأثیر کشت این جدایه‌ها بر روی رشد و عملکرد گیاه و کنترل پژمردگی و پوسیدگی ریشه در شرایط گلخانه و ارزیابی‌های مولکولی بر اساس 16S-rRNA در دست انجام است.

کلمات کلیدی: **باسیلوس، بیوکنترل، سم زیستی، فوزاریوم، کود زیستی**

مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاهی با محلول کردن فسفات، تولید هورمون، تثبیت ازت، افزایش جذب آب و املاح، بهبود توسعه و گسترش سیستم ریشه و بالا بردن فعالیت آنزیمی گیاه به افزایش مقاومت و سلامت گیاهان کمک می‌کنند. یکی دیگر از خصوصیات کودهای زیستی مهار بیمارگرهای قارچی در فضای رایزوسفری است. کودهای زیستی که به‌عنوان مهم‌ترین گزینه جایگزین و یا کمکی برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی معرفی می‌شود حاوی مقادیر مناسبی از یک یا چند نوع از باکتری‌های محرک رشد گیاهی هستند. باکتری‌های موجود در کودهای زیستی قادرند یک یا چند عنصر غذایی را از شکل بلا استفاده به شکل قابل استفاده برای گیاه تبدیل کنند. این تبدیل معمولاً در طی یک فرآیند زیستی انجام می‌گیرد (۱). هزینه تولید کودهای زیستی نسبتاً کم بوده و تولید و مصرف آن‌ها موجب آلودگی اکوسیستم نمی‌شود. باکتری‌های موجود در یک کود زیستی ممکن است در خاک ریزوسفری، روی سطح ریشه، در داخل ریشه و حتی در ساقه و برگ گیاه به حالت اندوفیت ایجاد کلنی کنند. به‌طور طبیعی در خاک‌های کشاورزی چنین میکروارگانیسم‌هایی وجود دارند اما به دلیل برخی شرایط حاکم در خاک از شمار آن‌ها در طول زمان کاسته شده و کارایی آن‌ها کم می‌شود. جداسازی باکتری‌های مفید از فضاهای یاد شده موجب انتخاب باکتری‌های محرک رشد و تولید کودهای زیستی تجاری شده است (۲). *باسیلوس*ها یکی از جنس‌های فراوان رایزوسفر است. برخی از گونه‌های *باسیلوس* به‌عنوان کود و یا سم زیستی معرفی شده‌اند استفاده از این باکتری‌ها تأثیر خوبی بر عملکرد و سلامت محصولات کشاورزی دارد (۳).

مواد و روش

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری از ۶ گلخانه خیار از دو استان یزد و اصفهان، ۶ گلخانه گوجه‌فرنگی و ۶ گلخانه فلفل دلمه‌ای از این دو استان در بازه زمانی تیر تا دی‌ماه سال ۹۵ انجام شد. برای تهیه نمونه، خاک اطراف ریشه بوته‌های شاداب و پر محصول به میزان ۱۰۰ گرم از عمق ۱۵-۱۰ سانتیمتری در کیسه‌های پلاستیکی ریخته و به آزمایشگاه واقع در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران منتقل شد.

جداسازی باکتری‌های *باسیلوس*

ده گرم از خاک ریزوسفری همراه با ریشه به ارلن‌های حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول بافر استریل (کلرید سدیم ٪ ۰/۹) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه شیک شد. به‌منظور کاهش سایر باکتری‌های حساس به حرارت و بدون اسپور نمونه‌های خاک به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از آن با تهیه سری رقت از خاک و محیط کشت NA (نوترینت آگار) *باسیلوس*ها جداسازی شدند. برای تأیید *باسیلوس*های گرم مثبت از تست KOH و برای تشخیص اسپور از رنگ‌آمیزی اسپور استفاده شد. در نهایت جدایه‌های انتخاب شده از نظر خصوصیات محرک رشدی مختلف بررسی شدند.

آزمون سیدروفور

برای بررسی توان تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت NB کشت شد. در این روش برای تشخیص نیمه کمی توان تولید سیدروفور، ۱۵ میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری با روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط جامد CAS قرار داده شد (۴).

آزمون ACC -deaminase

اندازه‌گیری آنزیم ACC د- آمیناز به روش Onofre-Lemus و همکاران (۵) با کمی تغییرات انجام شد. به‌منظور بررسی باکتری‌های مورد مطالعه در استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن، باکتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت NB کشت شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به ۲۰ میلی‌لیتر محیط DF حاوی ۳ میلی‌مولار ACC، محیط DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم و محیط DF فاقد ACC و سولفات آمونیوم تلقیح شد. بعد از ۴۸ ساعت با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در ۴۰۵ نانومتر برای هر سه محیط قرائت شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی بر بیمارگرهای گیاهی

در این مطالعه از روش کشت دو طرفه یوآن و کراوفورد (۶) استفاده شد. جدایه‌های باکتریایی به‌صورت یک نوار باریک و یا لکه در یک طرف پلیت حاوی محیط PDA کشت شدند. به‌طور همزمان یک بلوک از بیمارگر گیاهی *فوزاریوم اکسیسپوروم* (جدا شده از خیار بیمار) در وسط هر پلیت حاوی باکتری قرار داده شد و پلیت به مدت ۳ روز در حرارت مناسب برای عامل بیمارگر نگهداری شد. از هر جدایه بیمارگر یک بلوک نیز بر روی محیط بدون کشت باکتری در همان شرایط به‌عنوان کنترل یا شاهد قرار داده شد. میزان بازدارندگی به‌صورت تفاضل شعاع رشد بیمارگر در پلیت شاهد (از مرکز به‌طرف کناره پلیت) از شعاع رشد بیمارگر در پلیت‌های حاوی باکتری و بیمارگر انجام شد.

نتایج و بحث

از میان ۳۵ *باسیلوس* جدا شده از رایزوسفر خیار، گوجه و فلفل دلمه‌ای هفت باکتری توانایی مهار قارچ بیمارگر را داشتند. درصد بازدارندگی مواد فرار تمام جدایه‌ها بیشتر از مواد محلول بود. جدایه P6BI-27 با توانایی به ترتیب ۴۰ و ۲۵ درصد مهار قارچ در تست مواد فرار و مواد محلول بیشترین درصد بازدارندگی از رشد قارچ را نشان داد. این جدایه از رایزوسفر فلفل جدا شده بود. کمترین توان بازدارندگی مربوط به دو *باسیلوس* جدا شده از رایزوسفر خیار با کدهای C1BY-3 و C2BY-39 بود. پنج جدایه از هفت جدایه آنتاگونیست از گلخانه‌های یزد و دو جدایه از گلخانه‌های اصفهان جدا شد. پنج جدایه قادر به تولید سیدروفور بود. جدایه برتر با حداکثر توان مهار بیمارگر و دو جدایه با کمترین توان مهار قارچ قادر به تولید

سیدروفور بودند. به نظر می‌رسد تولید سیدروفور تنها مکانیسم پاسخگو در رابطه با مهار قارچ توسط این جدایه‌ها نیست و سایر مکانیسم‌های شناخته شده بیوکنترل نیز در مهار رشد قارچ توسط این جدایه‌ها مؤثر هستند (۷). از میان هفت جدایه آنتاگونیست تنها دو جدایه بدست آمده از رایزوسفر خیار قادر به تولید ACC دامیناز بودند. تعداد بسیار کم جدایه‌های آنتاگونیست در خاک رایزوسفری محصولات گلخانه‌ای نشان دهنده ضعف روش‌های کشت و مراقبت از این محصولات است. استفاده بیش از حد کود و سموم شیمیایی به‌شدت بر فلور خاک گلخانه تأثیر دارد و موجب از بین رفتن باکتری‌های مفید در این ناحیه می‌شود. قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* یکی از خسارت‌زاترین بیمارگرهای صیفی‌جات به‌ویژه خیار در گلخانه‌های کشور است (۸). در حال حاضر هیچ محصول تجاری زیستی بومی برای کنترل آن در دسترس نیست و متأسفانه برای پیشگیری از آن از سموم شیمیایی به مقدار زیاد و بیش از حد استاندارد استفاده می‌شود. استفاده از باکتری‌های اسپور دار مقاوم به شرایط محیطی مانند *باسیلوس*ها که توانایی مهار بیمارگرها را داشته باشند و به‌واسطه خصوصیات محرک رشدی جایگزین قسمتی از کودهای شیمیایی شوند گام مؤثری در جهت کاهش استفاده از قارچ‌کش‌ها و کودهای شیمیایی است. ارزیابی باکتری‌های جدا شد در شرایط گلخانه در حال انجام است.

کد باکتری	گیاه	محل جداسازی	درصد بازدارندگی (مواد محلول)	درصد بازدارندگی (مواد فرار)	تولید سیدروفور	ACC دامیناز
C1BY-1	خیار	یزد	٪۱۸	٪۳۵	۰	۱
C1BY-3	خیار	یزد	٪۹	٪۲۵	۱	۱
C2BY-39	خیار	یزد	٪۹	٪۲۵	۱	۰
T1BY-34	گوجه‌فرنگی	یزد	٪۹	٪۲۵	۰	۰
T1BY-36	گوجه‌فرنگی	یزد	٪۱۸	٪۳۵	۱	۰
P6BI-27	فلفل دلمه	اصفهان	٪۲۵	٪۴۰	۱	۰
P4BI-22	فلفل دلمه	اصفهان	٪۱۵	٪۲۵	۱	۰

مثبت یا منفی بودن واکنش به ترتیب با یک و صفر نشان داده شده است

منابع

Lugtenberg, B. and Kamilova, F. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology; 63:541–556.

Berg, G. 2009. Plant microbe interactions promoting plant growth and health: Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. Appllied Microbiology and Biotechnology; 84:11-18.

Li, L., Ma, J., Li, Y., Wang, Z., Gao, T. and Wang, Q. 2012. Screening and partial characterization of Bacillus with potential applications in biocontrol of cucumber Fusarium wilt. Crop Protection; 35: 29-35.

Alexander, M. 1977. Introduction to soil microbiology. 467 pp.

Onofre-Lemus, J., Hernandez-Lucas, I., Girard, L. and Caballero-Mellado, J. 2009. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and Its growth-promoting effect on tomato plants. Journal of Applied Environmental Microbiology; 75: 6581–6590.

Yuan, W.M. and Crawford, D.L. 1995. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots. Applied and Environmental Microbiology. 61: 3119–3123.

Spadoro, D. and Gullino, M.L. 2005. Improving the efficacy of biocontrol agents against soilborne pathogens. Crop Protection; 24: 601-613.

Hatami, N., Zamani Zadeh, H.R., Aminaee, M.M. and Zohdi, H. 2012. Fusarium rot in cucumber greenhouses of Jiroft region. Archives of Phytopathology and Plant Protection; 45: 325-338.

Isolation of Plant Growth Promoting *Bacillus* from Greenhouse Vegetables (Cucumber, Tomato and Bell Pepper) Rhizosphere

Roghayeh Zare*[1], Akram Sadeghi[2], Mahrooz Dezfolian[1]
[1] Microbiology group, Azad university, Karaj, Iran
[2] Microbiological Biotechnology group, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
*Corresponding Author: aksadeghi@abrii.ac.ir

Abstract

Isolation and identification of native microbiome includes beneficial bacteria in order to protecting them as genetic resources is necessary. There is no adequate information about soil microflora and plant growth promoting *Bacillus* spp. bacteria in Iran. Additionally, providing of microbial resources in production of bio-fertilizers and pesticides rather than chemical products, is a promising way to achieve healthy agricultural crops and reduce environmental pollutions. In this study *Bacillus* bacteria were isolated from soil samples of greenhouses vegetables in Yazd and Isfahan, as two major vegetables growing provinces. *Bacillus* bacteria were selected based on *in vitro* growth promoting assays such as production of siderophore, ACC deaminase and volatile metabolites as well as biocontrol ability against *Fusarium oxysporum*. Among the all selected isolates, three strains isolated from cucumber, two strains isolated from tomato and two strains isolated from pepper, which have more than three growth promoting characters, were selected for greenhouse assessments. Evaluation of effect of the selected strains on plant growth, biocontrol of wilt and root rot caused by *F. oxysporum* in greenhouse and molecular identification of the strains by 16s-rRNA are in progress.

Keywords: *Bacillus*, Biocontrol, Bio-fertilizer, Bio-pesticide, *Fusarium*