مجلهٔ جنگل ایران، انجمن جنگلبانی ایران
سال نهم، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۶
ص ۳۹۹-۴۰۹

جداسازی، شناسایی و بررسی تأثیر باکتری‌های بومی بر رشد نهال‌های بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.)

کامبیز رضایی[۱]، رقیه ذوالفقاری[۲]* و رضا نقیها[۳]

[۱] کارشناس ارشد جنگلداری، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج، یاسوج
[۲] دانشیار جنگلداری، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج، یاسوج
[۳] استادیار علوم دام، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یاسوج، یاسوج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۶/۹)

چکیده

باکتری‌هایی که بر رشد و عملکرد گیاه اثرات مثبت دارند و به آنها ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) می‌گویند، می‌توانند در احیای نهال‌های جنگلی کمک شایانی کنند. در این تحقیق ابتدا باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات از خاک جنگلی یاسوج استخراج شد. از ۵ نمونه خاک، ۱۰ جدایهٔ حل‌کنندهٔ فسفات جداسازی شد؛ از این میان ۲ جدایه که بیشترین توانایی را در انحلال فسفات داشتند، انتخاب و پس از خالص‌سازی با استفاده از روش‌های رنگ‌آمیزی و آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند که شامل باکتری‌های *Microbacterium aurantiacum* و *Streptomyces cinereorectus* بودند. سپس به‌منظور بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد بر عملکرد نهال‌های بلوط ایرانی، آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در گلخانهٔ دانشگاه یاسوج انجام گرفت. تیمار آزمایش شامل باکتری‌های محرک رشد در چهار سطح (عدم تلقیح (کنترل)، باکتری *M. aurantiacum*، باکتری *S. cinereorectus* و ترکیب این دو باکتری) بود. نتایج تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر نهال‌ها نشان داد که کلیهٔ صفات رویشی به‌جز ارتفاع نهال و نسبت وزن اندام هوایی به زمینی تحت اثر سادهٔ فاکتور باکتری معنی‌دار بودند. رویش و عملکرد نهال‌های بلوط ایرانی تلقیح‌شده با کلیهٔ تیمارهای باکتری (*M. aurantiacum*، *S. cinereorectus* و ترکیب دو باکتری *M. aurantiacum* × *S. cinereorectus*) از نهال‌های شاهد بیشتر بود؛ اما تأثیر ترکیب دو باکتری بر وزنِ تر ساقه و برگ به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار با هر یک از باکتری‌ها بود. به‌طور کلی می‌توان گفت استفاده از کودهای بیولوژیک به‌خصوص باکتری *M. aurantiacum* به رشد بیشتر نهال‌ها در سال‌های اول استقرار و در نتیجه موفقیت بیشتر جنگلکاری‌ها کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: باکتری محرک رشد، تلقیح، زاگرس، کود زیستی، نهال.

مقدمه

ریزوسفر مکانی است که اثرهای متقابل بین خاک، گیاهان و ریزموجودات در آن به وقوع می‌پیوندد. باکتری‌های منطقهٔ ریزوسفر را در اصطلاح ریزوباکتری می‌نامند. انواع ریزوباکتری را که بر رشد و عملکرد گیاه اثر مثبت دارند ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) می‌نامند (Antoun & Kloepper, 2001). استفاده از باکتری‌های محرک رشد که مقاومت زیادی در برابر شرایط سخت محیطی دارند، سبب تسریع و تحریک‌کنندگی رشد گیاه (Glick, 1995) و تولید

* نویسندهٔ مسئول شماره تماس: ۹۱۱۳۳۸۴۰۷۵+ ایمیل: zolfaghari@yu.ac.ir

نهال‌هایی مقاوم‌تر در برابر شرایط سخت محیطی می‌شود (Bagnasco, 1998; Brooks et al., 1994; Tripathi et al., 2002). همچنین این میکروارگانیسم‌ها با تولید متابولیت‌های اولیه و ترشح در خاک قادرند بر ترکیب‌های آلی و معدنی فسفاته اثر بگذارند و موجب آزاد شدن فسفر و حل شدن آن در خاک شوند (Dadrawal, 1977). در واقع میکروب‌های حل‌کنندهٔ فسفات، تأثیر مهمی در تغذیهٔ گیاه از طریق افزایش جذب فسفات و استفاده از آنها به‌عنوان کودهای بیولوژیک دارند (Dastager & Damare, 2013; Mahajan et al., 2016).

پژوهشی در زمینهٔ جمعیت باکتری‌ها و قارچ‌های محلول‌کنندهٔ فسفات در خاک‌های کشت‌شده و کشت‌نشده در آلبرتا نشان داد که بین مقدار فسفر کل خاک و جمعیت میکروارگانیسم‌های محلول‌کنندهٔ فسفات رابطه معنی‌داری وجود دارد و آنها حدود ۱ درصد از کل جمعیت باکتری‌ها و قارچ‌های خاک را تشکیل می‌دهند (Kucey, 1983). در پژوهشی دیگر که با استفاده از محیط کشت پیکوواسکای برای جداسازی باکتری از خاک کشاورزی انجام گرفت، ۳۷ جدایه باکتریایی وجود داشت که از بین آنها ۸ جدایه بیشترین انحلال فسفر را نشان دادند. در بین این هشت جدایه، چهار جنس بیشترین انحلال فسفر را در محیط آگار داشتند که متعلق به جنس‌های *Pseudomonas, Bacillus, Azotobacter* و *Rhizobium* بودند و *Enterobacter* بعد از *Acinetobacter* بیشترین انحلال فسفر را نشان داد (Karpagam & Nagalakshmi, 2014). از طرف دیگر تحقیق در زمینهٔ تأثیر تلقیح باکتری‌های محرک رشد مانند *Bacillus licheniformis* و *B. pumilus* بر رشد نهال‌های *Pinus pinea* نشان داد که هر دو گونهٔ باسیلوس رشد نهال‌های گونهٔ *P. pinea* را با تولید جیبرلین افزایش می‌دهند (Probanza et al., 2002). Domenech et al. (2003) نیز در تحقیق خود با عنوان تأثیر تلقیح باکتری‌های محرک رشد جنس *Bacillus* و قارچ میکوریزا *Pisolithus tinctorius* بر رشد، ساختار جامعه میکروبی و بیماری قارچی گونهٔ بلوط همیشه‌سبز *Quercus ilex* بیان کردند که فقط گونهٔ *B. licheniformis* رشد نهال‌های گونهٔ بلوط همیشه‌سبز را افزایش می‌دهد، درحالی که تلقیح سویهٔ باکتری با قارچ اکتومیکوریزی *P. tinctorius* اثر منفی در رشد گیاه دارد. گذشته از این معلوم شد که سویهٔ *B. licheniformis* مانع رشد قارچ‌های بیماری‌زا می‌شود. Rincón et al. (2005) هم در تحقیقی در مادرید اسپانیا، تأثیر میکروارگانیسم‌های خاک بومی و تلقیح باکتری‌های محرک رشد بر دو گونهٔ درختی مدیترانه‌ای *Pinus halepensis* و *Quercus coccifera* را در پاسخ به استرس کم‌آبی مطالعه کردند. آنها دریافتند که میکروارگانیسم‌های خاک مانند باکتری‌های محرک رشد اهمیت حیاتی در رشد گیاه دارند. حداکثر بهره‌وری فتوشیمیایی از فتوسیستم دو و نرخ انتقال الکترون تا حد زیادی از باکتری‌های محرک رشد و میکروارگانیسم‌های بومی تأثیر گرفتند. در *P. halepensis* نرخ انتقال الکترون توسط باکتری‌های محرک رشد و میکروارگانیسم‌های بومی تحت شرایط آبیاری خوب تقویت شدند، اما این باکتری‌ها بر پتانسیل آب ساقه و هدایت روزنه‌ای در یک دورهٔ خشکی اثر منفی در این گونه داشتند. در گونهٔ بلوط این باکتری‌ها بر فتوسیستم دو و نرخ انتقال الکترون تأثیری نداشتند. درحالی که پتانسیل آب ساقه و هدایت روزنه‌ای توسط باکتری‌های محرک رشد در یک دورهٔ استرس کم‌آبی افزایش پیدا کرد. همچنین نتایج نشان داد که همکاری میکروبی ریشه می‌تواند تأثیر زیادی در پاسخ نهال درخت در استرس خشکی داشته باشد. تحقیقی دیگر بر روی نهال‌های بلوط مدیترانه‌ای و کاج در اسپانیا نیز نشان داد که تلقیح این باکتری‌ها سبب افزایش پارامترهای رویشی می‌شود (Lucas García et al., 2004). Sarcheshmehpour et al. (2013) نیز مشاهده کردند که مایه‌زنی دانهال‌های پسته با باکتری‌های محرک

رشد، سبب افزایش معنی‌دار میانگین ارتفاع در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود.

جنگل‌های زاگرس با مساحت پنج میلیون هکتاری، ۴۰ درصد از کل جنگل‌های ایران را در بر گرفته‌اند. این جنگل‌ها بیشترین تأثیر را در تأمین آب، حفظ خاک، تعدیل آب‌وهوا و تعادل اقتصادی-اجتماعی در کل کشور دارند (Talebi et al., 2006). بنابراین حفاظت، احیا و توسعهٔ گونه‌های بومی از قبیل بلوط که حدود ۶۰ درصد از تیپ خالص این جنگل‌ها را تشکیل می‌دهند، اهمیت ویژه‌ای دارد (Jazirehi & Ebrahimi Rostaghi, 2003) جنگل‌های بلوط زاگرس جزو جنگل‌های خشک محسوب می‌شوند و استقرار زادآوری طبیعی در آنها به‌دلیل مشکلات متعدد به‌سختی امکان‌پذیر است. از طرفی عملیات جنگلکاری و احیا در این مناطق به‌طور عمده با استفاده از بذر صورت می‌گیرد و براساس نظر کارشناسان سازمان جنگل‌ها و مراتع نیز این جنگلکاری‌ها چندان موفقیت‌آمیز نبوده است و اغلب ناشی از شرایط خشک منطقه است. بنابراین با توجه به پژوهش‌ها، استفاده از کودهای زیستی مانند باکتری‌های تثبیت‌کنندهٔ نیتروژن و میکروارگانیسم‌های مفید خاک، در تولید نهال‌های قوی‌تر و مقاومت بیشتر به تنش‌های محیطی مانند خشکی، کمبود عناصر غذایی و... بسیار مؤثر است (Stefan et al., 2008; Teimouri et al., 2003). این پژوهش سعی دارد ابتدا باکتری‌های محرک رشد بومی منطقه را برای اولین بار شناسایی کرده و سپس تأثیر آنها بر نهال‌های گونهٔ بلوط ایرانی را مشخص کند تا شاید بتوان از نتایج این تحقیق در جهت احیای جنگل‌ها و مدیریت بهتر و صحیح‌تر این مناطق بهره جست.

مواد و روش‌ها

شیوه اجرای پژوهش

-جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد

ابتدا پس از جنگل‌گردشی در جنگل‌های بلوط یاسوج، در چندین نقطه مقداری خاک برداشت شد و برای جداسازی باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات به آزمایشگاه آورده شدند. برای بررسی کیفی توانایی باکتری‌ها در انحلال فسفر، از محیط‌کشت جامد پایه پیکوواسکای استفاده شد (Dastager & Damare, 2013). سپس برای جداسازی باکتری‌ها از سطح ذرات خاک نیز ۱۰ گرم خاک به ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی سترون افزوده شد. سوسپانسیون به‌مدت ۲۰ دقیقه روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. رقت‌های سریالی برپایهٔ ۱۰ در حجم نهایی ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون ساخته شده و در سه تکرار روی محیط کشت پیکوواسکای پخش شد و در انکوباتور در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد (Omar, 1998). نمونه‌ها بعد از شش روز گرمخانه‌گذاری، هالهٔ شفاف تشکیل دادند که نشان‌دهندهٔ انحلال فسفر در محیط کشت پیکوواسکای بود و سپس دسته‌بندی آنها انجام گرفت (Xiao et al., 2008). آنهایی که هالهٔ قوی‌تری داشتند در محیط کشت پیکوواسکای از نو کشت داده شدند. برای شناسایی باکتری‌ها ابتدا رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت و پس از آن آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل آزمون‌های کاتالاز، پراکسیداز، آزمون حرکت، منیتول سالت آگار، اوره براث، متیل رد و ورسپروسکار، محیط SIM، تجزیهٔ قندهای مختلف (فروکتوز، زایلوس، منیتول، لاکتوز، گلوکز، ترالوز، رافینوز، رامنوز و آروبینوز) و تولید اسید، احیای نیترات، تجزیهٔ ژلاتین، استفاده از سیمون سیترات به‌عنوان منبع کربن، کربوکسیله کردن اسیدهای آمینه (اورنیتین، آرژینین و لیزین)، تولید ایندول و تجزیه نشاسته برای شناسایی باکتری‌ها استفاده شد (Dastager & Damare, 2013; Jang, 1993).

-تلقیح باکترهای جداسازی‌شده روی نهال‌ها

ابتدا نهال‌های بلوط ایرانی یکساله که در گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک جنگلی منطقهٔ زاگرس کاشته شده بودند به چهار دسته تقسیم شدند. سپس نهال‌ها با استفاده از دو سویه

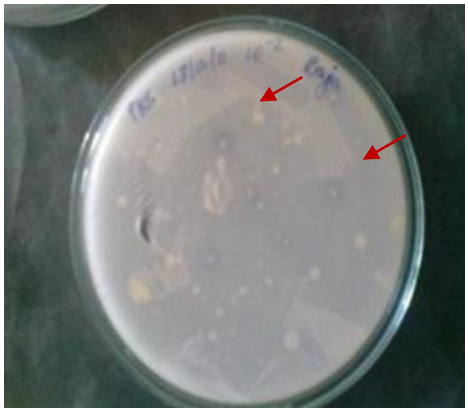
باکتری‌های محرک رشد که دارای هالهٔ بزرگ‌تری بودند جداگانه و نیز در ترکیب با یکدیگر تلقیح شدند. تلقیح هر گلدان با ۱۰ میلی‌لیتر محلول حاوی 10^{11} باکتری به‌وسیلهٔ اسپری اطراف ریشه‌های مویین انجام گرفت. نمونه‌های شاهد با محلول کلرید سدیم ۰/۱درصد محلول‌پاشی شد تا شرایط همهٔ نمونه‌ها یکسان باشد (Probanza et al., 2002). بعد از گذشت ۹۰ روز که باکتری‌ها استقرار یافته بودند و تأثیر خود را روی نهال‌ها گذاشتند، نهال‌ها برداشت شدند. پارامترهای مختلف رویشی اعم از وزن تر و خشک برگ، ساقه، ریشه با استفاده از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم و سطح برگ با استفاده از نرم‌افزار Image j۱,۴۳ اندازه‌گیری شدند. ارتفاع نهال (از محل یقه تا جوانه انتهایی) و طول کل ریشه نیز با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. در نهایت نسبت وزن تر اندام هوایی به زمینی (وزن اندام هوایی ساقه و برگ/اندام زمینی ریشه) و نیز بیوماس تر (مجموع وزن برگ، ریشه و ساقه) محاسبه شد.

-روش تحلیل

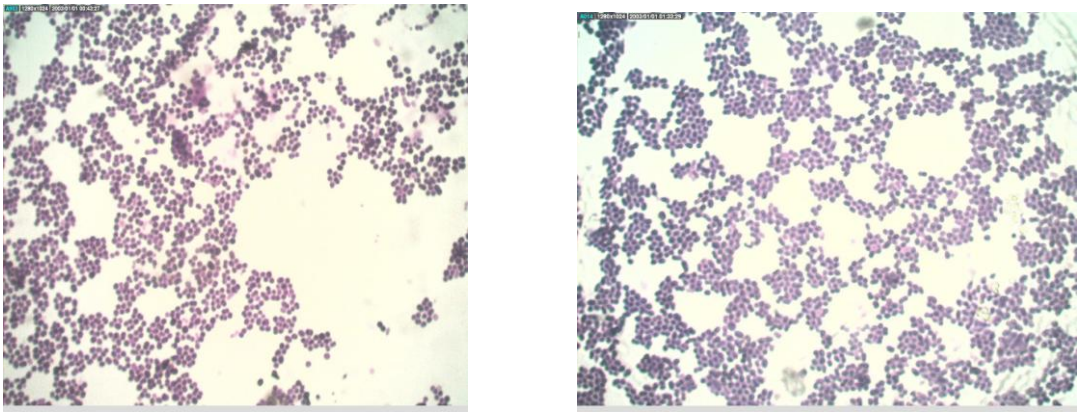
کلیهٔ تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار ۱۹ SPSS انجام گرفت. ابتدا توزیع نرمال داده‌ها با آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. سپس از آنالیز واریانس یکطرفه و مقایسهٔ میانگین دانکن با حدود اطمینان ۹۵ درصد بین تیمارهای مختلف باکتری (چهار سطح شاهد (عدم تلقیح)، باکتری میکروباکتریوم (*S. cinereorectus*)، باکتری استرپتومایسس (*S. cinereorectus*) و ترکیب دو باکتری با هم (*M. aurantiacum* × *S. cinereorectus*) برای کلیهٔ صفات مورد اندازه‌گیری استفاده شد.

نتایج

نتایج جداسازی باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفر نشان داد که تمام نمونه‌های خاک بررسی‌شده، دارای باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفر بودند. تعداد کل جدایه‌های باکتری حل‌کنندهٔ فسفر از پنج نمونه خاک جمع‌آوری‌شده، ۱۰ نوع جدایه بود. سپس از این تعداد، دو جدایه که هالهٔ بزرگ‌تری داشتند، انتخاب، خالص‌سازی و در محیط مایع پیکوواسکای تکثیر شدند. نتایج حاصل از رنگ‌آمیزی باکتری‌های جداسازی‌شده در زیر میکروسکوپ و همچنین برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی باکترهای جداسازی‌شده در جدول ۱ آورده شده است. براساس روش‌های رنگ‌آمیزی و بیوشیمیایی دو گونه باکتری *S. cinereorectus* و *M. aurantiacum* شناسایی شد. تصویر تشکیل هاله در شکل ۱ و شکل زیر میکروسکوپ هر یک از باکتری‌ها در شکل ۲ آورده شده است؛ در این تصویر دو جدایه که هالهٔ شفافی در اطراف پرگنه تشکیل داده بودند با نشانگر قرمز نشان داده شدند.



شکل ۱- تشکیل هاله (با فلش قرمز در تصویر مشخص شده است) در محیط کشت پیکوواسکای



شکل ۲- تصویر زیر میکروسکوپ از باکتری *M. aurantiacum* و باکتری *S. cinereorectus* (به‌ترتیب راست و چپ)

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی و زیر میکروسکوپ دو باکتری جداسازی‌شده از خاک

آزمایش بیوشیمیایی	*M. aurantiacum*	*S. cinereorectus*
گرم	+	+
لیزین دکربوکسیلاز (LD)	+	+
اپتیمم دما (°C)	۳۷	۳۷
متیل رد (MR)	+	+
وژسپروسکار (VP)	–	–
محیط سه قندی آهن‌دار (TSI)	گلوکز، لاکتوز یا سوکروز تخمیر شدند و اسید و گاز تولید کردند. H_2S تولید نشد.	گلوکز، لاکتوز یا سوکروز تخمیر شدند و اسید و گاز تولید کردند. H_2S تولید نشد.
محیط SIM	–	–
کاتالاز	–	–
اکسیداز	+	–
ایندول	–	–
سیمون سیترات	–	–
اوره براث	–	–
منیتول سالت آگار	–	–
ژلاتین	–	–
فروکتوز	+	+
زایلوز	–	–
منیتول	+	+
لاکتوز	+	+
گلوکز	+	+
تراهالوز	+	+
رافینوز	+	+
رامنوز	+	+
آروبینوز	+	+
خصوصیات میکروسکوپی	کوکسی ریز	کوکسی (کوکوباسیل)

تأثیر باکتری‌های تلقیح‌شده بر نهال‌های بلوط ایرانی نشان داد که کلیهٔ صفات رویشی به‌جز ارتفاع ساقه و نسبت وزنِ تر اندام هوایی به زمینی تحت اثر ساده فاکتور باکتری معنی‌دار بودند (جدول ۲). مقایسهٔ میانگین نشان داد که طول ریشه در تیمارهای باکتری میکروباکتریوم و استرپتومایسس از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد (عدم تلقیح) و ترکیب دو باکتری داشت (جدول ۳). به‌طوری که باکتری‌های میکروباکتریوم و استرپتومایسس به‌ترتیب سبب ۶۴ و ۶۲ درصد افزایش طول ریشه شدند، اما دو تیمار شاهد و ترکیب دو باکتری تفاوتی نداشتند. همچنین نتایج نشان داد که باکتری‌های میکروباکتریوم و استرپتومایسس بیشترین تعداد برگ را داشت، به‌طوری که ۵۷ و ۵۵ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت؛ اما ترکیب دو باکتری سبب افزایش ۳۸ درصدی تعداد برگ شد که نسبت به شاهد و باکتری‌های میکروباکتریوم و استرپتومایسس تفاوت معنی‌دار داشت. همچنین نتایج نشان داد که مجموع سطح برگ در تیمارهای باکتری میکروباکتریوم و ترکیب دو باکتری از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد و باکتری استرپتومایسس داشت؛ به‌طوری که باکتری میکروباکتریوم و ترکیب دو باکتری به‌ترتیب موجب افزایش ۸۰ و ۷۸ درصدی مجموع سطح برگ شدند. باکتری استرپتومایسس نیز نسبت به شاهد سبب افزایش سطح برگ شد، اما از تیمارهای باکتری میکروباکتریوم و ترکیب دو باکتری از نظر آماری کمتر بود.

جدول ۲- نتایج تجزیهٔ واریانس (میانگین مربعات) صفات رویشی و مورفولوژیک بررسی‌شده

پارامترها	تیمار باکتری	خطا
طول ریشه (cm)	۲۶۷۱/۸۵*	۴۵/۴
طول ساقه (cm)	۹۴/۰۹ns	۳۵/۴
تعداد برگ	۴/۹۸**	۰/۲۰۱
مجموع سطح برگ (cm^2)	۳/۰۵۶**	۸۴۸۷۳۳۴
وزن کل ریشه (gr)	۷۲/۱۵**	۳/۱۹
وزن کل ساقه (gr)	۳۵/۶**	۱/۱
وزن کل برگ (gr)	۷/۹*	۰/۱۷۵
بیوماس کل (gr)	۱۹۵/۷**	۶/۳۸
وزن تر اندام هوایی به زمینی	۰/۵۵۸ns	۰/۳۴

* خطای ۵ درصد، ** خطای ۱ درصد، ns نبود تفاوت معنی‌دار

همچنین نتایج نشان داد که باکتری میکروباکتریوم بیشترین مقدار وزن کل ریشه را داشت، به‌طوری که ۶۵ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت؛ اما باکتری استرپتومایسس و ترکیب دو باکتری به‌ترتیب سبب افزایش ۶۰ و ۵۸ درصدی مقدار وزن کل ریشه شد که نسبت به باکتری میکروباکتریوم تفاوت معنی‌داری نداشت. بیشترین مقدار وزن کل ساقه را نیز باکتری‌های میکروباکتریوم

و استرپتومایسس نشان دادند، به‌طوری که ۵۵ و ۵۲ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داشتند. اما تیمار ترکیب دو باکتری سبب افزایش ۳۸ درصد مقدار وزن کل ساقه شد که نسبت به شاهد و باکتری میکروباکتریوم و استرپتومایسس تفاوت معنی‌داری داشت. برای وزن کل برگ نیز مانند طول ریشه بیشترین مقدار را باکتری میکروباکتریوم و استرپتومایسس داشت، به‌طوری که ۸۶ و ۸۳ درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. اما ترکیب دو باکتری سبب افزایش ۷۹ درصدی مقدار وزن کل برگ شد که نسبت به باکتری میکروباکتریوم و استرپتومایسس تفاوت معنی‌داری نداشت. همچنین نتایج نشان داد که زی‌تودهٔ کل در تیمارهای باکتری میکروباکتریوم و استرپتومایسس از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با شاهد و تیمار ترکیب دو باکتری داشت و باکتری‌های میکروباکتریوم و استرپتومایسس سبب افزایش ۵۴ درصدی بیوماس شدند. ترکیب دو باکتری نیز نسبت به شاهد موجب افزایش زی‌توده شد، اما از تیمار باکتری‌های میکروباکتریوم و استرپتومایسس از نظر آماری کمتر بود (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسهٔ میانگین صفات رویشی و مورفولوژیک در تیمارهای مختلف باکتری

پارامترها	شاهد (تلقیح نکردن باکتری)	تلقیح باکتری *M. aurantiacum*	تلقیح باکتری *S. cinereorectus*	تلقیح ترکیب دو باکتری
طول ریشه (cm)	۱۱/۶±۰/۴۷c	۳۱/۶۳±۱/۵۷a	۳۱/۳±۱/۵۲a	۲۷/۱±۱/۰۵b
طول ساقه (cm)	۲۴/۵۳±۰/۸۹b	۲۸/۲۳±۱/۲۵a	۲۸/۳۳±۱/۰۶a	۲۶/۸±۱/۳۵ab
تعداد برگ	۱/۶۱±۰/۲۳۸c	۲/۴۲±۰/۴۵۲a	۲/۵±۰/۳۷۳a	۲/۰۳±۰/۴۹۴b
مجموع سطح برگ (cm^2)	۱۸/۵±۱/۲c	۹۵/۱±۶/۴a	۷۱/۲±۵/۸b	۹۱/۵±۸/۵a
وزن کل ریشه (gr)	۱/۹۴±۰/۱۹۶b	۵/۴±۰/۴۱۳a	۴/۸۵±۰/۲۶۴a	۴/۷۱±۰/۵a
وزن کل ساقه (gr)	۱/۹۷±۰/۰۹۶c	۴/۱۵±۰/۲۲a	۴/۳۵±۰/۲۱۷a	۳/۱۴±۰/۲۷۳b
وزن کل برگ (gr)	۰/۵۱۷±۰/۰۵c	۳/۴۷±۰/۳۷a	۳/۲±۰/۳۳a	۲/۵۳±۰/۱۵b
زی‌تودهٔ کل (gr)	۵/۵±۰/۱۶c	۱۱/۰۲±۰/۵۸a	۱۰/۸±۰/۴۲a	۹/۱±۰/۷۶b
وزنِ تر اندام هوایی به زمینی	۱/۶±۰/۱۵a	۱/۴±۰/۰۶a	۱/۵±۰/۱a	۱/۳±۰/۰۸a

حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهندهٔ نبود تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف باکتری است. اعداد پس از ± اشتباه معیارند.

بحث

نتایج جداسازی و شناسایی خاک جنگلی یاسوج نشان داد که دو گونه باکتری *Streptomyces cinereorectus* و *Microbacterium aurantiacum* که از خانوادهٔ اکتینومیست‌ها هستند، بیشترین توانایی را در حل فسفات خاک دارند. برپایهٔ بسیاری از پژوهش‌های صورت‌گرفته، گزینش اولیه روی پرگنه‌ها با بررسی قطر هاله انجام گرفت؛ یعنی پرگنه‌هایی که هالهٔ قطورتری داشتند، برای مراحل بعدی آزمون انتخاب شدند؛ از آن جمله می‌توان تحقیق Seshadri et al. (2002) را نام برد؛ آنها وجود منطقهٔ شفاف در محیط کشت را نشانهٔ آزاد شدن اسیدهای آلی توسط میکروب‌ها می‌دانستند. Mahajan et al. (2016) در تحقیقی بر روی جمعیت میکروبی خاک جنگلی گونهٔ *Pinus roxburghii* نشان دادند که باکتری‌های خانوادهٔ اکتینومیست از جمله

گونهٔ *Microbacterium sp.* جزء جمعیت میکروبی غالب در این خاک جنگلی هستند. همچنین این محققان بیان کردند که این باکتری‌ها نقش مهمی در تجزیهٔ لاشبرگ نسبت به قارچ‌ها دارند. یافته‌های Dastager & Damare (2013) برای شناسایی باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات نامحلول نیز نشان داد که از بین ۲۰۰ جدایه باکتریایی جداسازی‌شده که دارای انحلال فسفات در محیط کشت اختصاصی پیکوواسکای بودند، سیزده جدایهٔ مختلف بیشترین هاله را داشتند و در بین آنها باکتری *Microbacterium sp.* بیشترین انحلال فسفر را نشان داد. در واقع شش جنس باکتری *Isoptericola, Angustibacter, Microbacterium, Kocuria, Streptomyce* بیشترین تأثیر را در حل فسفات و توانایی زیادی به شرایط محیطی مختلف مثل دما، شوری و اسیدیتهٔ خاک داشتند. در این تحقیق نیز گونه‌های باکتری جداسازی‌شده از خاک زاگرس که بیشترین توانایی حل فسفات را داشتند نیز متعلق به خانوادهٔ اکتینومیست‌ها بودند؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد که آنها در مقایسه با دیگر باکتری‌ها می‌توانند شرایط زیستی سخت جنگل‌های زاگرس (اعم از عمق کم خاک، خشکسالی و ...) را تحمل کنند و تأثیر بیشتری در حل شدن فسفات خاک داشته باشند.

نتایج تأثیر این باکتری‌ها بر پارامترهای رویشی نهال‌های یکساله نیز نشان داد که تیمارهای تلقیح‌شده با باکتری نسبت به نهال‌های شاهد (تلقیح‌نشده) دارای مقادیر بیشتری از پارامترهای رویشی مورد اندازه‌گیری بودند. پژوهش Lucas García et al. (2004) دربارهٔ رشد نهال‌های جنگلی *P. pinea* و *Q. ilex* تلقیح‌شده با ریزوباکتری‌های (*Enterobacter intermedius, P. fluorescens, Chryseobacterium balustinu*) *نیز* نشان داد که برخی از پارامترهای بررسی‌شده از جمله طول ساقه، قطر یقه و وزن خشک ساقه توسط همهٔ سویه‌های باکتری تلقیح‌شده افزایش زیادی یافت. در واقع افزایش رویش نهال‌های تلقیح‌شده با باکتری به‌دلیل تولید هورمون‌های تنظیم‌کنندهٔ رشد از جمله افزایش اکسین و کاهش اتیلن است (Glick, 1995).

از طرف دیگر نتایج نشان داد که شدت تأثیر مثبت تیمارهای مختلف باکتری به یک اندازه نبود، به‌طوری که اکثر پارامترهای رویشی اندازه‌گیری‌شده در نهال‌های تلقیح‌شده با باکتری میکروباکتریوم (*Microbacterium aurantiaucm*) بیشتر از دو تیمار باکتریایی دیگر بود که این پدیده می‌تواند احتمالاً به‌دلیل توانایی بیشتر این باکتری در حل فسفر غیرمحلول خاک باشد که در مطالعات دیگر نیز اشاره شده است و در نتیجه افزایش فسفر خاک سبب افزایش رشد نهال‌ها می‌شود (Mahajan et al., 2016؛ Dastager & Damare, 2013). همچنین طول ریشه، تعداد برگ، وزن ساقه، برگ و بیوماس کل در نهال‌های تلقیح‌شده با هر دو باکتری نسبت به نهال‌های تلقیح‌شده با هر یک از باکتری‌ها به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری کمتر بود. در تحقیقی در زمینهٔ تأثیر تلقیح باکتری‌های محرک رشد دو گونهٔ *Bacillus licheniformis* و *B. pumilus* بر رشد نهال‌های *Pinus pinea*، مشاهده شد که هر دو گونهٔ باسیلوس رشد نهال‌های کاج را با تولید جیبرلین افزایش دادند، اما این اثر بیولوژیکی در ترکیب دو سویهٔ باکتری با هم پیدا نشد (Probanza et al., 2002) که نتایج آنها همسو با نتیجهٔ حاضر است.

همان‌طور که نتایج این تحقیق نشان داد، استفاده از باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفر جمع‌آوری‌شده از منطقهٔ تحقیق، می‌تواند با تأثیر بر افزایش رشد نهال به‌ویژه رشد طولی ریشه، موجب شود که نهال‌های سازگارتر به کمبود آب تولید شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود از این باکتری‌ها به‌خصوص از جدایه میکروباکتریوم به‌عنوان کود بیولوژیک در کمک به استقرار نهال‌های بلوط بهره گرفته شود. به‌جز یک مورد گزارش از باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفر در

جنگل‌های شمال کشور (Teimouri et al., 2003)، این تحقیق اولین مورد از وجود باکتری‌های محرک رشد در جنگل‌های زاگرس است؛ بنابراین تحقیقات بیشتر به‌منظور مطالعهٔ فراوانی و تنوع باکتری‌های محرک رشد در منطقهٔ زاگرس می‌تواند نتایج مفیدی را در پی داشته باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود تأثیر این نهال‌ها در شرایط متفاوت مثل تنش خشکی یا عوامل بیماری‌زا بررسی شود، زیرا تحقیقات نشان داده است که این باکتری‌ها می‌توانند در این شرایط به مقاومت نهال‌ها کمک کنند (Tripathi et al., 2002). برای مثال باکتری‌های PGPR با تولید سیانید می‌توانند به‌عنوان کنترل بیولوژیک استفاده شوند (Bagnasco, 1998) و در مطالعه‌ای نیز تأثیر مثبت این باکتری‌ها بر خشکیدگی درختان بلوط مشخص شده است (Brooks et al., 1994).

References

Antoun, H.J., & Kloepper, W. (2001). *Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)*. In: Encyclopedia of Genetics. Academic, P. 110.

Bagnasco, P. (1998). Fluorescent pseudomonas spp. As biocontrol agents against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Microbiology Biochemical, 30*, 131- 132.

Brooks, D.S., Gonzalez, C.F., Appel D.N., & Filer, T.J. (1994). Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. *Journal of Biological Control, 4*, 373–381.

Dadrawal, K.R. (1977). *Biotechnological approaches in soil microorganisms for sustainable crop production.* Scientific Publisher jodhpour, India.

Dastager, S., & Damare, S. (2013). Marine Actinobacteria showing Phosphate solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa. *Current Microbiology, 66*(5), 421-427.

Domenech, J., Ramos-Solano, B., & Probanza, A. (2003). Bacillus spp. and Pisolithus tinctorius effects on Quercus ilex ssp. ballota: a study on tree growth, rhizosphere community structure and mycorrhizal infection. *Forest Ecology and Management*, 194, 293–303.

Glick, B.R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteri. *Canadian Journal of Microbiology, 41*, 199-117.

Jang, S.S. (1993). Diagnosis Guide of Veterinary Clinical Bacteriology and Mycological. University of California press, Davis.

Jazirehi, M.H., & Ebrahimi Rostaghi, M. (2003). *Silviculture in Zagros*. University of Tehran Press.

Karpagam, T., & Nagalakshmi, P.K. (2014). Isolation and characterization of Phosphate Solubilizing Microbes from Agricultural soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied, 3*(3), 601-614.

Kucey, R.M.N. (1983). Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science, 63*, 671-678.

Lucas García, J.A., Domenech, J., Santamaría, C., Camacho, M., Daza, A., & Gutiérrez Mañero, F.J. (2004). Growth of forest plants (pine and holm-oak) inoculated with rhizobacteria: relationship with microbial community structure and biological activity of its rhizosphere. *Environmental and Experimental Botany, 52*, 239–251.

Mahajan, R., Nikitina, A. Litti, Y., Nozhevnikova, A., & Goel, G. (2016). Autochthonous microbial community associated with pine needle forest litterfall influences its degradation under natural environmental conditions. *Environmental Monitoring and Assessment, 188*(7), 417.

Omar, S.A. (1998). The role of rock-phosphate-solubilizing fungi and vesicular-arbuscular-mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. *Microbiology Biotechnology, 14*, 211-218.

Probanza, A., Lucas, J.A. Acero, N., & Gutiérrez Mañero, F.J. (2002). The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. I. Characterization of growth promoting and growth inhibiting bacterial strains. *Plant and Soil, 182*, 59–66.

Rincón, A., Ruíz-Diez, B., García-Fraile, S., Fernández-Pascual, M., Lucas-García, J.A., & de Ştefan, M.R., Mihasan, M., & Dunca, S. (2008). Plant growth promoting Rhizobacteria can inhibit the in vitro germination of Glycine Max L seeds. Scientific Annals of University "Alexandru Ioan Cuza" Iasi. *Genetics and Molecular Biology, 3*, 105-110.

Sarcheshmehpour, M., Savaghebi, G.R., Siadat, H., & Alikhani, H.A. (2013). Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on Improvement of Nutrition and Growth of Pistachio Seedling under Drought Stress. *Iranian Journal of Soil Research, 27*(1), 107-119. (In Persian)

Seshadri, S., Ignacimuthu, S., & Lakshminarsimhan, C. (2002). Variations of heterotrophic and Phosphate solubilizing bacteria from Chennai, southeast coast of India. *Indian Journal of Marine Science, 31*(1), 69-72.

Talebi, M., Sagheb-Talebi, Kh., & Jahanbazi, H. (2006). Site demands and some quantitative and qualitative characteristics of Persian Oak (*Quercus brantii* Lindl.) in Chaharmahal & Bakhtiari Province (western Iran). *Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 14*, 67-79. (In Persian)

Teimouri, M., Korori, S.A.A., Matinizadeh, M. & Khoshnevis, M. (2003). Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Vaz forest soil. *Pajouhesh & Sazandegi, 65*, 57-64.

Tripathi, A.K., Nagarajan, T., Verma, S.C., & Rudulier, D. (2002). Inhibition of biosynthesis and activity of nitrogenase in Azospirillum brasilense Sp. under salinity stress. *Current Microbiology, 44* (5), 363–367.

Xiao, C.Q., Chi, R.A., Huang, X.H., Zhang, W.X., Qiu, G.Z., & Wang, D.Z. (2008). Optimization for rock phosphate solubilization by phosphate – solubilizing fungi isolated from phosphate mines. *Ecological Engineering, 33*, 187-193.

Iranian Journal of Forest
Vol. 9, No. 3, Autumn 2017
pp. 399-409

Isolation, characterization, and influence of native rhizobacteria on growth of Brant's Oak (*Quercus brantii* Lindl.) seedlings

K. Rezaee[1], R. Zolfaghari[2*], and R. Naghiha[3]

[1]M.Sc., Department of forestry, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yasouj University, Yasuj, I. R. Iran
[2]Associate Prof., Department of forestry, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yasouj University, Yasuj, I. R. Iran
[3]Assistant Prof., Department of forestry, Faculty of Agriculture & Natural Resources, Yasouj University, Yasuj, I. R. Iran

(Received: 27 June 2016, Accepted: 31August 2017)

Abstract

The bacteria species that have positive effects on plant growth and performance, which is called plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs), can help or play a crucial role in reforestation programs. For this purpose, phosphate solubilizing bacteria were isolated from soil of Yasuj forests, Iran in this study. Ten isolates of phosphate solubilizing were extracted from five soil samples. Two out of ten bacteria strains with highest phosphate solubilizing activity were selected. The results of gram staining and other biochemical tests illustrated that those bacteria were identified as *Microbacterium aurantiacum* and *Streptomyces cinereorectus*. In order to study the effect of PGPR bacteria on growth performance of Brant's oak seedlings, an experiment as completely randomized block design was done in greenhouse conditions. Treatments consist of four seedlings groups of non-inoculated (control), inoculated by *M. aurantiacum*, inoculated by *S. cinereorectus* and inoculated by a mixture of both strains. The results of analysis of variance of the effect of PGPR bacteria strains on growth performance of oak seedlings revealed that all studied traits with exception of stem length and shoot to root ratio were significantly affected by bacterial treatment. So that, inoculated plants showed better growth performance compared to the control treatment, but plants treated with both strains had lower stem and leaf fresh weights in comparison with pure inoculated plants. It can be concluded that the application of biofertilizers especially *M. aurantiacum* might be conducted to increase the growth and subsequent establishment of seedlings in the first year resulted in successful reforestation.

Keywords: Biofertilizer, Inoculation, Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), Seedling, Zagros

*Corresponding author Tel: +989113384075 Email: zolfaghari@yu.ac.ir