کنترل بیولوژیک تاج خروس و جووحشی توسط باکتری‌های سیانوژن خاک‌زی

شیرین‌حیدری[۱]، پرویز رضوانی‌مقدم[۱]، محمدرضا خزائی[۱]، حسینعلی علیخانی[۲]، حسن محمد علیزاده[۲] و سیدمهدی عرب[۳]

[۱] دانشگاه فردوسی مشهد، [۲] دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج و [۳] دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ابوریحان

چکیده

توانایی جدایه‌های باکتریایی بدست آمده از خاک ریزوسفر در تولید هیدروژن سیانید و اثرات آنها در بازدارندگی رشد تاج‌خروس و جووحشی در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. طی آزمون کیفی انجام شده به روش آلستروم، تقریباً ۹/۲٪ از باکتری‌ها از مجموعه ۱۳۶ جدایه باکتری و ۲۷ سویه باکتری *سودوموناس* قادر به تولید هیدروژن سیانید (HCN) بودند که غالب این باکتری‌های سیانوژن باکتری‌های *سودوموناس فلورسنت* بودند. از بین آنها تعداد ۴ سویهٔ *سودوموناس فلورسنت* بعنوان تولیدکنندگان برتر HCN مشخص و در آزمونهای بعدی بکار گرفته شدند. میزان تأثیر متابولیت‌های گازی شکل و مایع این سویه‌های برتر در سه آزمون بر تاج‌خروس و جووحشی بررسی شد. بازدارندگی معنی‌دار از رشد ریشه و ساقه به میزان ۹۰٪ در تاج خروس وجووحشی در اثر متابولیت‌های گازی شکل نشان داد که HCN ماده اصلی بازدارنده در تولیدات گازی‌شکل باکتری می‌باشد. همچنین متابولیت‌های باکتری در حالت گازی بازدارنده‌تر از حالت مایع بودند. این نتایج نشان دادند که باکتری‌های سیانوژن خاکزی می‌توانند بعنوان بازدارندگان اختصاصی رشد عمل کنند و پتانسیل کنترل بیولوژیک علف هرز تاج‌خروس را داشته باشند.

مقدمه

مؤثرترین وسیله کنترل و مدیریت علف‌های هرز، علف‌کش‌ها می‌باشند که بعلت داشتن اثرات سوء (بروز مقاومت در علف‌های هرز، آلودگی محیط زیست و عواقب سوء آن بر سلامتی انسان و سایر موجودات زنده) در حال حاضر عواقب سنگینی برای مصرف بی‌رویه آنها پرداخت می‌شود (۱). امروزه روش‌های بیولوژیک در کنترل علف‌های هرز بسیار مؤثر و مناسب تشخیص داده شده‌اند. گروهی از میکروارگانیزم‌هایی که به عنوان عوامل بیولوژیک کنترل علف‌های هرز مورد مطالعه قرار گرفته‌اند با نام باکتری‌های خاکزی مضر و کشنده نام‌گذاری شده‌اند که میتوانند از رشد گیاه جلوگیری بعمل آورند (۱۰). بسیاری از این باکتری‌های بازدارندهٔ رشد، میزبان اختصاصی هستند (۶). در این میان باکتری‌های خانوادهٔ *سودوموناس* (*Pseudomonas*) یکی از اصلی‌ترین باکتری‌های خاکزی بازدارندهٔ رشد گیاه به شمار می‌روند. بعضی از سویه‌های این باکتری تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای به نام هیدروژن سیانید (HCN) می‌کنند که به عنوان عامل بازدارندهٔ رشد ریشه و متابولیسم گیاه شناخته شده است (۲). بگونیا (۵) ثابت کرد که *سودوموناس*‌های ریشهٔ گیاه گاوپنبه قادرند میزان جوانه زنی و زنده‌مانی بذور علف هرز را به طور معنی‌داری کاهش دهند. همچنین در آزمایش دیگری سویه‌های *سودوموناس فلورسنت* با تولید سیانید از رشد لوبیا جلوگیری بعمل آوردند (۳). اهداف اصلی این تحقیق بررسی توان کیفی و کمی

Biological control of Pigweed (*Amaranthus sp.*) and Wild Barley (*Hordeum murinum*) by cyanogenic rhizobacteria

S. Heidari, P. Rezvani, M. Khazai, H. Alikhani, H. Alizadeh, M. Arab

Abstract

This research was carried out to evaluate the ability in cyanide synthesis by rhizobacteria strains and their effects on seedling growth inhibition of Pigweed and wild barley. According to the qualitative test of HCN, 9.2% of bacteria (out of 134 isolates and 27 strains of *Pseudomonas*) were cyanogenic producing HCN. Most of these cyanogenic bacteria were distinguished as *Pseudomonas fluorescence*. Four super strains of cynogenic *Pseudomonas* were selected and used in further studies. We evaluated the effects of volatile and liquid metabolites of bacteria in three tests on Pigweed and Wild Barley. Significant growth inhibition (about 90%) in root and shoot growth of these weeds with volatile metabolites produced by cyanogenic rhizobacteria confirmed that HCN was the major inhibitory compound involved. Also volatile metabolites had more inhibitory effects than liquid metabolites. Our results suggested that cyanogenic rhizobacteria in rhizosphere can be specialized growth inhibitors and have the potential to control weeds biologically.

Keywords: Biological control, Pigweed, Wild Barley, cyanogenic rhizobacteria

منابع

۱. منتظری، م. ۱۳۸۴. کنترل میکربی علف‌های هرز. زیتون. شماره ۱۲، صفحه ص۵۴-۵۹.

2. Adam, O., and R. Zdor. 2001. Effect of cyanogenic rhizobacteria on the growth of velvetleaf (*Abutilon theophrasii*) and corn (*Zea mays*) in autoclaved soil and the influence of supplemented glycine. Soil. Biol. Biochem. 33: 801-809.
3. 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.
4. Bakker, A.W. and B. Schippers. 1986. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *Pseudomonas spp.* -Mediated plant growth-stimulation. Soil. Biol. Biochem. 19: 451-457.
5. Begonia, M. F. T., and R. J. Kremer. 1994. Chemotaxis of deleterious rhizobacteria to velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medik.) seeds and seedlings. FEMS. Microbiol. Ecol. 15: 227-236.
6. Cherrington, C. A., and L. F. Elliott. 1987. Incidence of inhibitory *pseudomonads* in the Pacific Northwest. Plant Soil: 101, 159-165.
7. Elliott, L. F., and J. M. Lynch. 1985. *Pseudomonads* as a factor in the growth of winter wheat (*Triticum aestivum* L.). Soil. Biol. Biochem. 16: 69-71.
8. Kennedy, A. C., L. F. Elliott, F. L. Young, and, C. L. Douglas. 1991. Rhizobacteria suppressive to the weed downy brome. Soil Science Society America Journal: 55, 722-727.
9. Kremer, R. J. and T. Souissi. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Curr. Microbiol. 43 : 182-186.
10. Kremer, R. J., and A. C. Kennedy. 1996. Rhizobacteria as biocontrol agents of weeds. Weed Technol. 10: 601-609.
11. Lorck, H. 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. Physiol. Plant. 1: 142-146.

دادند. نتایج این تحقیق توسط گزارشات پیشین محققین تأیید می‌شود (۲،۴،۵،۷و ۸). کرمرو سوئیسی (۹) گزارش کردند که رشد ریشه کاهو و سوروف در پلیت‌های دوتایی تحت تأثیر متابولیت‌های گازی شکل قرار گرفت و بطور قطع می‌توان گفت که HCN بخش اعظم متابولیت‌های گازی را تشکیل می‌دهد که بازدارنده قوی ریشه است.

جدول ۱- مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در تاج‌خروس و جووحشی در اثر متابولیت‌های حاصل از سویه‌های مختلف باکتری *سودوموناس فلورسنت* در آزمونهای مختلف

علف‌های هرز مورد آزمایش	تیمارهای باکتریایی (سویه‌های مختلف باکتری *سودوموناس فلورسنت*)	صفات مورد بررسی					
		متابولیت‌های گازی شکل		متابولیت‌های مایع I		متابولیت‌های مایع II	
		درصد کاهش طول ساقه (نسبت به شاهد)	درصد کاهش طول ریشه (نسبت به شاهد)	درصد کاهش طول ساقه (نسبت به شاهد)	درصد کاهش طول ریشه(نسبت به شاهد)	درصد کاهش طول ساقه (نسبت به شاهد)	درصد کاهش طول ریشه(نسبت به شاهد)
تاج‌خروس	۴۵۹	b۸۹/۵۱	b۵۰/۴۰	c۶۰/۳۸	c۶۱/۸۵	bc۸۷/۱۳	b۶۸/۵۲
	۴۶۰	c۴۶/۹۷	c۳۱/۲۵	d۲۹/۶۶	d۳۴/۸۶	c۸۶/۳۹	c۴۹/۷۴
	۴۶۷	a۹۳/۵۰	a۸۳/۴۶	a۸۵/۵۹	a۷۹/۴۶	a۹۰/۸۰	a۸۷/۳۰
	۲۷-۲	a۹۲/۳۱	a۷۸/۸۳	b۷۴/۷۸	b۷۲/۱۲	b۸۷/۸۶	b۷۰/۰۵
جووحشی	۴۵۹	a۸۷/۶۸	a۹۲/۵۱	c۳۸/۱۲	a۱/۷۸	a۶۰/۸۳	a۷۰/۶۰
	۴۶۰	b۷۸/۰۷	c۲۸/۶۳	bc۳۷/۰۹	a-۱۴/۰۴	b۳۰/۴۱	۴۶/۹۶c
	۴۶۷	a۸۷/۵۲	a۹۲/۷۳	b۳۶/۸۰	b۲۷/۴۸	c-۴/۳۰	۶۲/۹۳b
	۲۷-۲	a ۸۲/۶۳	b۹۱/۲۱	۴۹/۴۱a	b۲۷/۴۸	c۰/۴۴	d۳۵/۷۸

درج علامت منفی کنار درصدها بیانگر این مطلب است که سویه مورد نظر سبب افزایش در صفت مورد بررسی شده است.
اختلاف اعداد هر ستون مجزا که دارای یک حرف مشترک باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد ($P<0.01$).

متابولیت‌های مایع یاکتریایی نیز سبب کاهش معنی‌دار طول ریشه و ساقه در تاج‌خروس و جووحشی شدند. متابولیت‌های مایع در دو روش، اثرات متفاوتی بر روی این علف‌هرز اعمال کردند و بطوریکه بازدارندگی متابولیتها بر ریشه و ساقه تاج‌خروس در روش دوم بیشتر از روش اول بود. همچنین نتایج نشان داد که بطور کلی بازدارندگی متابولیت‌های گازی شکل بیشتر از متابولیت‌های مایع بود. کرمر و سوئیسی (۹) نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. آنها این مطلب را اینگونه توجیه کردند که وقتی که باکتری در تماس با ریشه است ممکن است متابولیت‌های سمی گازی شکل به اندازه و غلظت کافی توسط باکتری تولید نشود یا تحت تجزیه قرار بگیرد. بعبارتی دیگر تولید HCN در تماس مستقیم با ریشه گیاه (نسبت به زمانی که ریشه به یکباره با حجم بالایی از گاز HCN روبرو شود)، ممکن است سبب پراکنده شدن، تجزیه شدن یا غیر فعال شدن آن بشود (۳). این نتیجه‌گیری بیانگر این مطلب است که چرا با وجود حضور باکتری‌های سیانوژن در خاک کنترلی بر علف‌های هرز صورت نمی‌گیرد. نهایتاً با توجه به نتایج مشخص شد باکترهای خاکزی سیانوژن می‌توانند بعنوان بازدارندگان اختصاصی رشد عمل کنند و پتانسیل کنترل بیولوژیک علف‌های هرز را داشته باشند.

جدایه‌های باکتریایی در تولید HCN و مشخص‌ساختن اثر باکتری‌های برتر بر روی رشد ریشه و ساقهٔ علف های‌هرز تاج خروس و جووحشی در شرایط درون‌شیشه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جهت بدست آوردن نمونه‌های بومی باکتری‌های سیانوژن خاکزی، نمونه‌برداری از خاک ریزوسفر ریشه‌علف‌های هرز زمین‌های زراعی انجام گرفت و ۱۳۶ جدایه‌های باکتریایی بدست آمده بعلاوه ۲۷ سویه باکتری سودوموناس طی چند مرحله بازکشت، خالص‌سازی و جوان شدند. سپس توان کیفی جدایه‌ها در تولید HCN با استفاده از روش پیشنهادی لورک (۱۱) اصلاح شده توسط آلستروم (۳) انجام پذیرفت. این روش به این صورت بود که پلیت‌ها توسط باکتری‌های خالص شده در محیط کشت Nutrient Agar به صورت spread تلقیح شدند. سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف، شامل کربنات سدیم ۱۰٪ و اسید پیکریک ۱٪ در قسمت درب پلیت قرار داده شد و ظروف پلیت توسط نوار پارافیلم بدقت درزگیری شدند. آنگاه این ظروف بصورت واژگون در دمای ^{oC} ۲۹-۳۰ درون انکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید HCN توسط باکتری‌های رشد یافته بر روی سطح محیط کشت، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف می‌بایست در رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری (درجات مختلف سیانوژنی) تغییر رنگ می‌یافت. توان تولید HCN با توجه به میزان تغییر رنگ کاغذ معرف درون هر پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. از این میان ۴ جدایه از *سودوموناس* که دارای سطح تولید حداکثر HCN بودند انتخاب و در آزمون‌های درون شیشه‌ای بعدی بکار گرفته شدند.

جهت بررسی تأثیر متابولیت‌های گازی شکل باکتریایی پس از ضدعفونی، بذور تاج خروس وجووحشی جوانه‌دار شدند. سپس بذور جوانه‌زده با فواصل مساوی بر روی سطح آگار یک درصد قرار داده شدند. جدایه‌های برتر باکتریایی با بالاترین سطح تولید هیدروژن سیانید نیز بر روی محیط کشت مخصوص کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، هر پلیت با ظروف پتری حاوی آگار و بذور جوانه زده جفت شدند. هر دو ظرف پتری به وسیلهٔ نوار پارافیلم درزگیری شده و در دمای ^{oC} ۲۷ و محیط تاریک قرار داده شده پس از ۴۸ ساعت اندازه‌گیری‌های طول ریشه و اندام هوایی انجام پذیرفت. آزمون دوم (متابولیت‌های مایع I) به منظور تعیین میزان اثر بخشی متابولیت‌های مایع تولیدشده توسط باکتری، بر روی میزان رشد و نمو گیاهچه‌های تاج‌خروس و جووحشی انجام گرفت. ۱۵-۱۰ بذر جوانه زده روی آگار قرار داده شد و سپس ۳۰ ماکرولیتر از مایه تلقیح باکتریایی (سوسپانسیون باکتری و محیط کشت Nutrient Broth و گلایسین) روی هر بذر ریخته شد. سپس به منظور جلوگیری از ورود هر گونه آلودگی، درب پلیت‌ها به دقت توسط پارافیلم درزگیری شدند. در آزمون سوم (متابولیت‌های مایع II) ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۶ دقیقه سانتریفوژ شده سپس محلول صاف‌رویی از هر سوسپانسیون جدا گردید. ۲ میلی‌لیتر از عصارهٔ صاف‌شدهٔ هر سوسپانسیون باکتری روی سطح آگار ریخته شد و سپس ۱۰ عدد بذر جوانه زده از هر نمونه علف هرز روی آن قرار گرفت. پلیت‌ها توسط پارافیلم درزگیری شده و برای مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. هر سه آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی تیمارشده با ۴ باکتری و شاهد و در ۴ تکرار انجام پذیرفتند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمون کیفی توان تولید هیدروژن سیانید نشان دادند که تعداد و یا درصد بسیار کمی از باکتری‌های جداسازی شده، توان تولید HCN را دارند (در مجموع حدود ۹/۲٪). براساس نتایج بدست آمده از آزمون نیمه‌کمی HCN، تعداد ۴ سویهٔ سودوموناس بعنوان تولیدکنندگان برتر HCN مشخص شدند. نتایج حاصل از آزمون متابولیتهای گازی نشان داد که تیمارهای باکتریایی توانستند طول ریشه و ساقه جووحشی را به ترتیب بین ۲۸-۹۲ و ۷۸-۸۷ درصد در مقایسه با شاهد کاهش دهند (جدول-۱). این تیمارها طول ریشه و ساقه تاج خروس را به ترتیب در دامنه ۳۱- ۸۳ و ۴۶-۹۳ درصد کاهش