جداسازی باکتری‌های رایزوسفری و اندوفیتی محرک رشد از زعفران

علیرضا رامندی[۱]، سید حسن مرعشی[۲]، علیرضا سیفی[۳*]

۱-دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

۲-استاد گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

۳-استادیار گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

مشکلات ناشی ازچالش‌های تغییر اقلیم برای تولید زعفران را می‌توان با استفاده از فن‌آوری‌های جایگزین همراه با رویکرد های بیوتکنولوژی مدرن کاهش داد. ایجاد روابط همزیست بین میکروارگانیسم‌ها وگیاهان پتانسیل امیدوار کننده‌ای را برای افزایش تحمل گیاهان در برابر بیماری و خشکسالی نشان داده است، اثر مفید میکروارگانیسم ها در تحمل به خشکی در گیاه، ایجاد سیستم ریشه‌های با کارکرد بالا، افزایش ظرفیت هدایت آب و افزایش جذب عناصر غذایی ماکرو و میکرو می‌باشد که نتیجه آن جذب بهتر دی اکسید کربن و افزایش میزان فتوسنتز خواهد بود. در این تحقیق تاثیر باکتری های رایزوسفری و اندوفیتی شناسایی شده از مزارع با عملکرد بالا تولید زعفران بر رشد با آمایش برروی گیاه آرابیدوبسیس در شرایط درون شیشه ارزیابی شد. باکتری BCS5 دارای عملکرد خوبی در تولید سبزینه گیاه بود ول رشد طولی ریشه را محدود میکرد. باکتری BCS16 انشعابات ریشه فراوان و ریشه های مویی زیاد بود. باکتری‌های BCS1 و BCS5 سبب افزایش زمان گلدهی شدند و بکتری BCS13 تاثیر مثبتی در تولید سبزینه و انشعابات ریشه نبود.

کلمات کلیدی: کورم زعفران، اندوفیت، رایزوسفر

*آدرس ایمیل نویسنده مسئول: arseifi@um.ac.ir

۱. مقدمه

زعفران (Crocus sativus)، به عنوان طلای سرخ ایران، در صادرات کشور همواره از جایگاه خاصی برخوردار است. لذا افزایش تولید و عملکرد زعفران به همراه افزایش کیفیت در سال‌های اخیر به دلیل بالا رفتن رقابت جهانی حائز اهمیت است (کوچکی، ۱۳۹۲). به دلیل تغییرات آب و هوایی در چند سال گذشته، شرایط جوی کاملا تغییر کرده است و بارندگی کم با توزیع نامنظم در مرحله بحرانی گلدهی زعفران تاثیر منفی می‌گذارد (Hoseni, 2018). مشکلات ناشی ازچالش‌های تغییر اقلیم برای تولید زعفران را می‌توان با استفاده از فن‌آوری‌های جایگزین همراه با رویکرد های بیوتکنولوژی مدرن کاهش داد. ایجاد روابط همزیست بین میکروارگانیسم‌ها وگیاهان پتانسیل امیدوار کننده‌ای را برای افزایش تحمل گیاهان در برابر بیماری و خشکسالی نشان داده است، اثر مفید میکروارگانیسم ها در تحمل به خشکی در گیاه، ایجاد سیستم ریشه‌های با کارکرد بالا، افزایش ظرفیت هدایت آب و افزایش جذب عناصر غذایی ماکرو و میکرو می‌باشد که نتیجه آن جذب بهتر دی اکسید کربن و افزایش میزان فتوسنتز خواهد بود (Hoseni, 2018).

مدیریت ضعیف بیماری‌ها یکی از دلایل کاهش تولید زعفران در آسیا بوده است، که باکتری‌های همزیست قادر به کنترل آن هستند. شارما و همکاران (2015) دو گروه اندوفیت را به نام Firmictes و Proteobactria در زعفران طبقه بندی کردند، همچنین Bacillus lichniformis را به عنوان اندوفیت غالب در زعفران مشخص کردند. فراوانی کلون‌های اندوفیت غالب در بخش برگ بیشتر از کورم ها بود. فراوانی اندوفیت ها در بافت، به اختلاف ساختار و بستر در بافت‌های مختلف گیاه میزبان وابسته است(Okane et al, 1998). در هند پراری و همکاران (2013)، ریزوباکترهای مرتبط را از کورم زعفران جداسازی کردند و در مجموع ۶ جدایه از ریزو باکترها انتخاب و شناسایی شد. B. subtilis و A. lwofii به عنوان تولید کننده هورمون IAA دسته بندی شدند که استفاده از آن ها چشم انداز کارآمدی را برای رشد و نمو کورم ها نشان می‌دهد. شرف الدین و همکاران (2008)، اثر B. subtilis را روی کورم زعفران تحت شرایط آزمایشگاهی در مصر بررسی کردند و گزارش دادند که تلقیح B. subtilis به طور قابل توجهی باعث افزایش طول برگ، گل‌دهی و وزن اولین کلاله می‌شد ولی جوانه زدن کورم‌ها را کاهش می‌داد. همچنین امباردار و اکلو (2013)، نشان دادند که Pseudomonas ssp و Brevibacterum ssp باکتری‌های غالب در رایزوسفر زعفران هستند و نتیجه گرفتند که جمعیت-های باکتریایی دارای برخی از صفات مهم در رشد گیاهان هستند که می‌توان به عنوان کودهای زیستی مورد استفاده قرار گیرند و استفاده از این سویه‌های ریزوباکترها ممکن است با رشد سریع کورم و افزایش کلاله فوایدی برای تولید کنندگان زعفران داشته باشد. در این تحقیق، جداسازی باکتری‌های اندوفیت و رایزوسفری از کورم زعفران که از نواحی با تولید بالای زعفران و نواحی با تولید پایین زعفران در شهرستان تربت حیدریه مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت اثر بخشی این باکتری‌ها بر رشد و عملکرد آرابیدوبسیس، مورد ارزیابی قرارگرفت.

۲. مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در اردیبهشت سال ۱۴۰۰ نمونه برداری از کورم به همراه خاک بالک آن از مزارع با عملکرد بالا و عملکرد پایین زعفران روستا نسر (۳۵/۵۲۳۲۶۷۷۲° شمالی و ۵۹/°۴۴۱۵۲۸۳۲ شرقی) و شهرستان زاوه (۳۵/۲۹۱۷۹۹° شمالی و ۵۹/۴۶۵۲۱۴° شرقی) که در فاصله ۱۰۰ کیلومتری از هم قرار دارند صورت گرفت.

جداسازی باکتری های اندوفیت، رایزوسفری و بالک

بالک

به منظور جداسازی باکتری‌ها از خاک بالک ابتدا کورم‌ها را به مدت ۵ دقیقه تکانده تا خاک متصل به آن جدا گردد سپس ۱ گرم از خاک های جمع آوری شده را برداشته و در ۵۰ سی سی محلول NaCL 0.9% به مدت ۹۰ دقیقه روی شیکر قرار می دهیم.

رایزوسفر

به منظور جداسازی باکتری های رایزوسفری ریشه‌های کورم های زعفران جداشده و در ۵۰ سی سی محلول NaCL 0.9% قرار داده شد و به مدت ۹۰ دقیقه روی شیکر قرار می‌دهیم.

اندوفیت

به منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت از روش شارما و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی تغییر استفاده شد. بدین منظور ریشه‌های جداسازی شده از کورم های زعفران سه بار به وسیله آب شسته و سپس به قطعات کوچک تری تقسیم گردید، ریشه‌ها ابتدا به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰٪، سپس به مدت ۳۰ ثانیه در هیپوکلرید سدیم ۰/۵٪ استریل و در جهت حذف مواد ضدعفونی کننده ۲ بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. برای جداسازی باکتری های اندوفیت، ریشه زعفران در هاون سترون حاوی ۱۰ سی سی NaCL ۰/۹٪ خرد گردید.

رقت سازی و کشت

جهت کشت های باکتریایی دو رقت 10^{-2} و 10^{-4} تهیه و روی محیط LB Agar کشت گردید و در انکباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

تفکیک مورفولوژیکی باکتری ها

پس از گذشت ۴۸ ساعت از کشت اولیه، باکتری‌های موجود در خاک بالک، رایزوسفر و اندوفیت‌ها از نظر رنگ، شکل، اندازه و تعداد مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس باکتری‌هایی که از نظر مورفولوژیکی تمایز داده شدند در یک پلیت کشت داده شده تا بررسی های دقیق تر انجام گیرد.

بررسی اثرات محرک رشد

به منظور بررسی باکتری‌های انتخابی بر سنجش زیستی از گیاه آرابیدوبسیس استفاده گردید. ابتدا دانه‌ها ۱۵ دقیقه در هیپوکلرید ۳۰٪ استریل و بر محیط MS بدون ساکارز پخش گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد پس از آن، جهت جوانه زنی به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری گردید. برای آماده سازی تلقیح، باکتری ها در محیط LB مایع رشد داده شد و به در طول موج ۶۰۰ نانو متر به جذب ۰/۵ رسید و ۵۰۰ میکرو لیتر از آن به ۵ سی سی LB حاوی ۰/۸ گرم آگار اضافه گردید و روی پلیت های حاوی LB جامد ریخته شد(تاپ اگار) و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد. گیاهان پس از رسیدن به اندازه ۱/۵ تا ۲ سانتی متر به پلیت های MS بدون ساکارز انتقال داده شد (هر پلیت حاوی

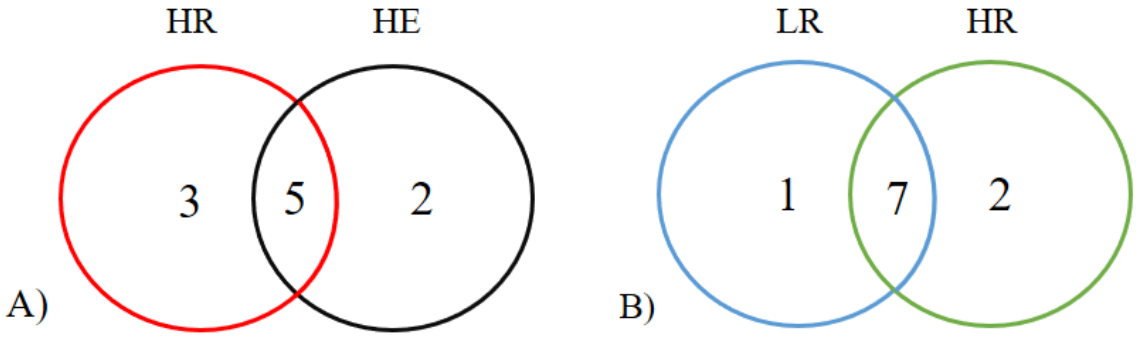
چهار گیاهچه) و از تاپ اگار رشد یافته جهت تلقیح مکعب هایی به قطر ۲ میلی متر بریده در فاصله ۱ سانتی متری از ریشه قرار میدهیم. پلیت ها در محفظه رشد در شرایط مشابه نگهداری شدند و بعد از ۲۱ روز مشخصات مورفولوژیکی آن ها بررسی گردید.

۳. نتایج و بحث

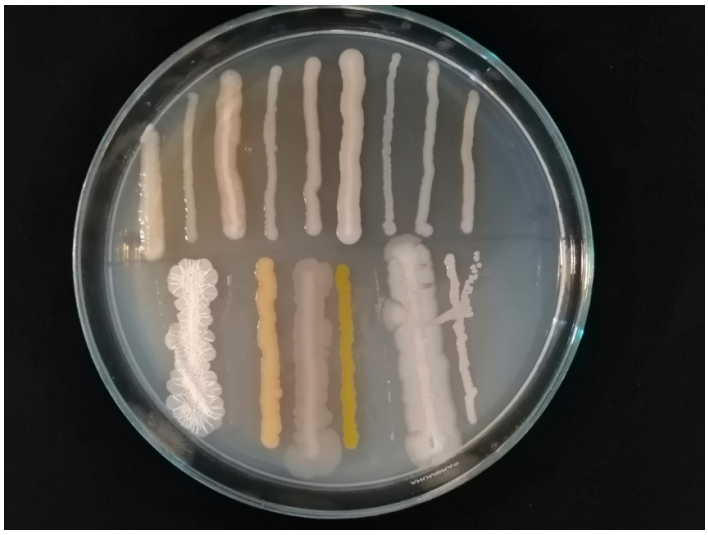
پس از ۴۸ ساعت، باکتری های رایزوسفری و اندوفیتی از منظر مورفولوژیکی و تعداد کلنی مورد بررسی قرار گرفت. مزارع با عملکرد بالا در مقایسه با مزارع با عملکرد پایین در تولید زعفران تنوع باکتریایی باکتریایی داشتند. در نتیجه انتخاب بر مبنی حضور باکتری در مزارع با عملکرد بالا صورت گرفت.

شناسایی مورفولوژیکی و جداسازی باکتری‌ها

در مجموع ده نوع باکتری قابل تمایز در رایزوسفر و ۶ نوع در اندوفیت ها شناسایی گردید. تفاوت تعداد و تنوع کلنی در مزارع با عملکرد بالا در مقایسه با مزارع با عملکرد پایین در تولید زعفران مشهود بود. از این بین در رایزوسفر، باکتری‌های BCS1 و BSC5 و در اندوفیت ها باکتری های BSC13 و BCS16 در مزارع با عملکرد بالا نسبت به مزارع با عملکرد پایین قابل تمایز بود و برای بررسی اثرات محرک رشد انتخاب گردید (شکل ۱ و ۲). شارما و همکاران (2015) اندوفیت غالب زعفران را Bacillus lichniformis مشخص کردند همچنین امباردار و الکو (2013) نشان دادند که Pseudomonas ssp و Brevibacterum ssp باکتری‌های غالب در رایزوسفر زعفران هستند.



شکل۱ : L و H نشان دهنده عملکرد بالا و پایین مزارع. R و E نشان دهنده باکتری های رایزوسفری و اندوفیت. هشت نوع باکتری اندوفیتی و ده نوع باکتری رایزوسفری از منظر موفولوژیکی تمایز داده شد که از این بین باکتری های BCS13 و BCS16 در اندوفیت ها فقط در مزارع با عملکرد بالا (A) و باکتری های BCS1 و BCS5 دارای تعداد کلنی های بالاتر در مزارع با عملکرد بالا در مقایسه با مزارع با عملکرد پایین در تولید زعفران بود (B).



شکل ۲: مورفولوژی باکتری های شناسایی شده.

اثرات باکتری های انتخابی بر رشد گیاه آرابیدوبسی

باکتری های BCS1، BCS5، BCS13 و BCS16 جهت بررسی عملکرد رشدی بر روی گیاه آرابیدوبسیس انتخاب شد. آزمایش بر مبنی ۳ تکرار (هر تکرار حاوی ۴ گیاهچه) و بر روی مشخصات مورفولوژیکی و وزن تر سبزینه انجام گردید. باکتری های BCS5 و BCS16 دارای عملکرد مثبت در تولید سبزینه و افزایش انشعابات ریشه بودند. BCS16 دارای انشعابات مویی بسیار زیاد بر روی ریشه ها بود علاوه بر این حجم انشعابات ریشه ایجاد شده تحت تاثیر این باکتری نسبت به سایر باکتری ها بسیار بهتر بود. باکتری های BCS5 و BCS1 سرعت گل دهی را نسبت به سایر باکتری ها افزایش میدادند. علاوه بر این BCS5 بهترین عملکرد را در تولید سبزینه داشت ولی رشد طولی ریشه در آن محدود شده بود. باکتری BCS13 عملکرد مثبتی بر تولید سبزینه و افزایش انشعابات ریشه از خود نشان نداد (شکل۳).

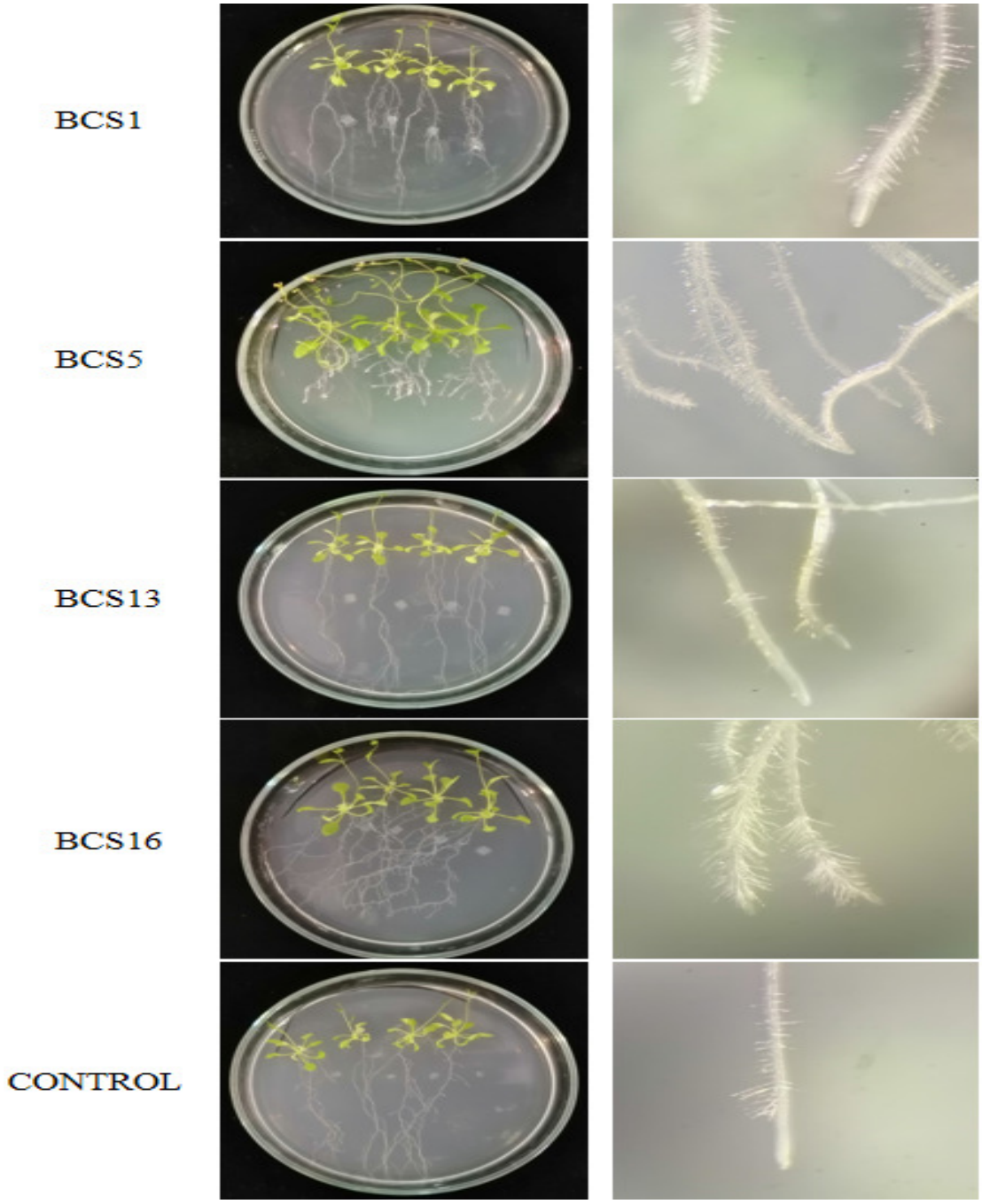
شرف الدین و همکاران (2008)، اثر *B. subtilis* را روی کورم زعفران تحت شرایط آزمایشگاهی در مصر بررسی کردند و گزارش دادند که تلقیح B. subtilis به طور قابل توجهی باعث افزایش طول برگ، گل‌دهی و وزن اولین کلاله می‌شد ولی جوانه زدن کورم‌ها را کاهش می‌داد. پراری و همکاران (2013) B. subtilis و A. lwofii به عنوان تولید کننده هورمون IAA دسته بندی شدند که استفاده از آن ها چشم انداز کارآمدی را برای رشد و نمو کورم ها نشان می‌دهد.

۴. نتیجه‌گیری

جمعیت‌های باکتریایی دارای برخی از صفات مهم در رشد گیاهان هستند که می‌توان به عنوان کودهای زیستی مورد استفاده قرار گیرند و استفاده از این سویه‌های ریزوباکترها ممکن است با رشد سریع کورم و افزایش کلاله فوایدی برای تولید کنندگان زعفران داشته باشد.

تشکر و قدردانی

با تشکر از جناب اقای مهندس مالکی و رضایی که امکان نمونه برداری کورم از مزارع خود را فراهم نمودند.



منابع

کوچکی، ع. (۱۳۹۲). پژوهش‌های زراعی زعفران در ایران: روند گذشته و نگاهی به آینده. نشریه زراعت و فناوری زعفران، ۱، ۲۱-۲.

Ambardar, S., Vakhlu, J. (2013). Plant growth promoting bacteria from Crocus sativus rhizosphere. World J Microbiol Biotechnol, 29, 2271–2279.

Dasgupta, SM., Khan, N., Nautiyal, CS. (2006). Biologic control ability of plant growth–promoting Paenibacillus lentimorbus NRRL B-30488 isolated from milk. Curr Microbiol, 53, 502–505.

Gheorghe, A., Jecu, L., Voicu, A., Popea, F., Rosu, A., Roseanu, A. (2008). Biological control of phytopathogen microorganisms with antagonist bacteria. Chem Eng Trans, 14, 509–516.

Husani, A. (2014). Challenges of climate change Omics based biology of saffron plants and organic agricultural biotechnology for sustainable saffron production. GM Crops & Food, 97-105.

Okane, I., Nakagiri, A., Ito, T. (1998). Endophytic fungi in leaves of Ericaceous plants. Can J Bot, 657–663.

Parray, JA., Kamili, AN., Reshi, ZA., Hamid, R., Qadri, RA. (2013). Screening of beneficial properties of rhizobacteria isolated from Saffron (Crocus sativus L) rhizosphere. Afr J Microbiol Res, 7, 2905-10.

Ryan, RP., Germaine, K., Franks, A., Ryan, DJ., Dowling, DN. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS Microbiol Lett, 278, 1–9.

Sharaf-Eldin, M., Elkholy, S., Fernández, JA., Junge, H., Cheetham, R., Guardiola, J., Weathers, P. (2008). Bacillus subtilis FZB24 affects flower quantity and quality of saffron (Crocus sativus). Planta Med, 74, 1316-20.

Sharma, T., Kaul, S., & Dhar, M. (2015). Diversity of culturable bacterial endophytes of saffron in Kashmir, India. SpringerPlus 4, 661.

Isolation of rhizosphere and endophyte growth-promoting bacteria from saffron

Alireza Ramandi[1], Hassan Marashi[2], Alireza Seafi[3*]
1- Master student of Biotechnology and Plant Breeding Department, Ferdowsi University.
2 Professor of Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University.
3- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University.

Abstract
Problems caused by climate change challenges for saffron production can be reduced by using alternative technologies combined with modern biotechnology approaches. Establishing symbiotic relationships between microorganisms and plants has shown a promising potential to increase plant tolerance to disease and drought. Water and increase the absorption of macro and micro nutrients, which results in better absorption of carbon dioxide and increased photosynthesis. In this study, the effect of rhizosphere and endophytic bacteria identified from high yield fields of saffron production on growth by arranging on Arabidobsis in in vitro conditions was evaluated. BCS5 bacterium has a good performance in green production of boudoir plant limited the longitudinal growth of roots. BCS16 had abundant branching and numerous hair roots. BCS1 and BCS5 bacteria increased flowering time and BCS13 bacteria did not have a positive effect on greenery production and root branching.

Keywords: saffron corm, Rhizosphere, Endophyte

*آدرس ایمیل نویسنده مسئول: arseifi@um.ac.ir