

الله أكبر



دانشگاه علم کشاورزی و منابع طبیعی گیلان

دانشکده آب و خاک

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته
بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

ارزیابی مزرعه‌ای اثر تلقیح باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر فاکتورهای رشد گیاه گوجه‌فرنگی

پژوهش و نگارش:

پروانه آغاز نشتیفانی

استاد راهنما:

دکتر محسن علمائی

اساتید مشاور:

دکتر مجتبی بارانی مطلق

دکتر رضا قربانی نصرآبادی

تابستان ۱۳۹۲

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود؛ بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

- ۱- قبل از چاپ پایان نامه خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.
- ۲- قبل از چاپ پایان نامه در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
- ۳- انتشار نتایج پایان نامه باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب پروانه آغاز نشتیفانی دانشجوی رشته بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء

تقدیم به:

خطوط مبهم‌پیشانی پدر فداکارم،

غزل ناب، سستی ام، استوارترین کوه تاریخ بودم،

به رسم بوسه ای بردستان باصفایش.

تقدیم به:

شانه‌های بی‌دینغ مادر مهربانم، آن سنگی بی‌ادعا

زیباترین حکایت زندگی ام،

به شوق طنین روح انگیز دعای خیرش.

تقدیم به:

خواهر و برادران عزیزم، مهربان‌ترین دوستان و همراهان زندگیم

آنان که سادگی آب را دارند و صفای باران.

شکر و قدردانی

سپاس بیکران خدای راست که دستم را توان نوشتن از اوست تا به انجام رسانم هر آنچه را با ناسخ آغاز کردم. سپاس آنان را که روشنای ردای علمشان نزدان ناجی نادانی است، آنان که معلم میثاق مهرزد و شگوفاکر شانه های شتاب اندیشه، اگر چه در کلام نمی گنجد، زر قهرین سپاس خود را از زحمات استاد محترم جناب آقای دکتر محسن علانی که در سایه رهنمودهای عالمانه ایشان توانستم گامی کوچک در پهنشت لایتنای علم و معرفت بردارم، ابراز می دارم.

بچنین شیسته است از اساتید مشاور جناب آقای دکتر محبتی بارانی مطلق و جناب آقای دکتر رضاقربانی نصرآبادی که در این راستا از ارائه نظرات و ارشادات آن مابهره جسم، صمیمانه شکر و قدردانی نمایم.

از داور گرامی سرکار خانم دکتر سیده سهیلا ابراهیمی که مطالعه این پایان نامه را قبل نمودند و بار اهنایی های ارزشمند خویش مراد ارائه بهتر مطالب یاری نمودند، کمال شکر را دارم.

از همزای و همیاری صمیمانه دوستان و بهکلاسی های عزیزم که در سخطات ناامیدی و سختی مایه امید بخشی اینجانب بودند بسیار سپاسگزاری می نمایم.

و بالاخره آنچه زانکار پذیر است و ز فراموش شدنی، محبت، بزرگواری و تلاش خانواده عزیزم که زمینه رشد و شگوفایی اندیشه ام را فراهم نمودند و تمام آنچه امروز هستم، همه مدیون زحمات بی دریغ آن هاست.

چکیده

کاربرد کودهای بیولوژیک برای حفظ توازن بیولوژیک، حاصلخیزی خاک به منظور به حداکثر رساندن روابط بیولوژیک مطلوب و به حداقل رساندن استفاده از مواد و عملیاتی که این روابط را بر هم می‌زنند، به ویژه مصرف کودهای شیمیایی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. باکتری‌های جنس *Pseudomonas spp.* از دسته باکتری‌های محرک رشد گیاه هستند، که به‌طور وسیعی در طبیعت توزیع پیدا کرده‌اند و به‌عنوان یک کنترل‌کننده بیولوژیکی نیز عمل می‌کنند. در این تحقیق از ۱۰ نمونه خاک فراریشه‌ای گیاه گوجه‌فرنگی از منطقه دلدان استان گلستان، ۱۷ جدایه *Pseudomonas* جداسازی و به گونه *P. fluorescens* تفکیک شدند. همچنین نتایج آزمون‌های مربوط به ویژگی‌های محرک رشد نشان داد که تمامی جدایه‌ها دارای توان حلالیت فسفر معدنی، تولید سیدروفور، تولید هورمون رشد (IAA) و تولید هیدروژن‌سیانید بودند. تأثیر تلقیح ۱ جدایه *Pseudomonas* و تیمار شاهد (بدون باکتری) و تیمار کودی بر روی برخی از پارامترهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در کشت مزرعه‌ای بررسی شد. اثر تیمار باکتری بر روی وزن میوه، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، میزان جذب عناصر نیتروژن، پتاسیم، فسفر و آهن اندام هوایی در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas fluorescens*، گوجه‌فرنگی، تست‌های محرک رشد

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

فصل اول

۱-۱- مقدمه ۲

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۱-۲- باکتری‌های فراریشه‌ای محرک رشد گیاه ۶

۱-۱-۲- باکتری جنس *Pseudomonas* spp. ۶

۲-۱-۲- تاریخچه پیدایش باکتری‌های جنس *Pseudomonas* spp. ۷

۳-۱-۲- خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی باکتری‌های جنس *Pseudomonas* spp. ۷

۴-۱-۲- خصوصیات کلی *Pseudomonas fluorescens* ۹

۲-۲- مکانیسم‌های باکتری‌های PGPR ۱۰

۱-۲-۲- توانایی تولید سیدروفور ۱۰

۱-۱-۲-۲- اهمیت و وضعیت آهن در خاک و گیاه ۱۰

۲-۱-۲-۲- سیدروفورها ۱۲

۲-۲-۲- هورمون‌ها و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی ۲۰

۳-۲-۲- افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول ۲۲

۴-۲-۲- توان تولید هیدروژن سیانید ۲۵

۳-۲- تأثیر در جذب عناصر غذایی و افزایش عملکرد در گیاهان ۲۹

۴-۲- گوجه‌فرنگی ۳۰

۱-۴-۲- مبدأ و تاریخچه کشت گوجه‌فرنگی ۳۰

۲-۴-۲- اهمیت کشت گوجه‌فرنگی ۳۰

۳-۴-۲- خصوصیات گیاه‌شناسی گوجه‌فرنگی ۳۱

۴-۴-۲- ارزش غذایی گوجه‌فرنگی ۳۱

۵-۴-۲- شرایط مناسب کشت گیاه گوجه‌فرنگی ۳۱

۵-۲- نقش عناصر در عملکرد و کیفیت گوجه‌فرنگی ۳۳

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳۸	۱-۳- جداسازی و گروه‌بندی جدایه‌های بومی <i>Pseudomonas fluorescens</i>
۳۸	۱-۱-۳- نمونه‌برداری خاک و ریشه.....
۳۸	۲-۱-۳- جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مقدماتی جدایه‌های <i>Pseudomonas</i>
۳۹	۱-۲-۱-۳- تست گرم.....
۴۰	۲-۲-۱-۳- تست کاتالاز.....
۴۰	۳-۲-۱-۳- تست اکسیداز.....
۴۰	۴-۲-۱-۳- آزمون تحرک در محیط نیمه‌جامد.....
۴۱	۲-۳- ویژگی‌های فیزیولوژیکی جدایه‌های <i>Pseudomonas</i>
۴۱	۱-۲-۳- آزمون ذوب ژلاتین.....
۴۲	۲-۲-۳- آزمون رشد در دمای ۴۱ درجه.....
۴۲	۳-۲-۳- آزمون هیدرولیز آرژینین.....
۴۳	۴-۲-۳- آزمون تشکیل لوان از ساکارز.....
۴۳	۵-۲-۳- آزمون سیترات.....
۴۳	۶-۲-۳- آزمون توانایی استفاده از قند گلوکز.....
۴۴	۳-۳- بررسی خصوصیات محرک رشد گیاه (PGPR) در جدایه‌های بومی <i>Pseudomonas</i>
۴۴	۱-۳-۳- آزمون نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور.....
۴۴	۱-۱-۳-۳- محیط کشت CAS-Agar.....
۴۵	۲-۱-۳-۳- محلول معرف Fe-CAS.....
۴۵	۳-۱-۳-۳- محلول بافر.....
۴۵	۴-۱-۳-۳- محلول غذایی.....
۴۵	۵-۱-۳-۳- محلول کاز آمینواسید.....
۴۶	۲-۳-۳- آزمون کمی توان تولید اکسین.....
۴۷	۳-۳-۳- آزمون کمی توان حلالیت فسفات معدنی نامحلول.....
۴۸	۴-۳-۳- تولید سیانید هیدروژن.....

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۴-۳- مشخصات جغرافیایی و آب هوایی محل اجرای آزمایش.....	۴۸
۵-۳- اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک مزرعه.....	۴۸
۱-۵-۳- اندازه‌گیری فسفر قابل جذب خاک به روش اولسن.....	۴۹
۲-۵-۳- اندازه‌گیری پتاسیم قابل جذب خاک.....	۴۹
۳-۵-۳- اندازه‌گیری ظرفیت تبادل کاتیونی خاک.....	۴۹
۴-۵-۳- تعیین اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک.....	۵۰
۵-۵-۳- اندازه‌گیری کربن آلی خاک.....	۵۰
۶-۵-۳- اندازه‌گیری بافت خاک.....	۵۰
۷-۵-۳- اندازه‌گیری آهن کل به روش DTPA.....	۵۰
۶-۳- بررسی تأثیر تلقیح <i>Pseudomonas</i> بر روی برخی پارامترهای رشد گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط مزرعه.....	۵۱
۱-۶-۳- تهیه مایه تلقیح باکتری.....	۵۱
۲-۶-۳- طرح آماری و اجرای آزمایش.....	۵۱
۳-۶-۳- عملیات کاشت و داشت.....	۵۱
۴-۶-۳- نحوه اندازه‌گیری صفات مورد بررسی.....	۵۲
۱-۴-۶-۳- وزن میوه.....	۵۲
۲-۴-۶-۳- وزن اندام هوایی.....	۵۳
۳-۴-۶-۳- وزن ریشه.....	۵۳
۵-۶-۳- نمونه‌برداری خاک ریزوسفری و غیر ریزوسفری.....	۵۳
۶-۶-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها.....	۵۳
فصل چهارم: نتایج و بحث	
۱-۴- آنالیز خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک زمین زراعی.....	۵۶
۲-۴- جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی مقدماتی‌های <i>Pseudomonas</i> spp.....	۵۶
۱-۲-۴- تست گرم.....	۵۷
۲-۲-۴- تست اکسیداز.....	۵۷
۳-۲-۴- تست کاتالاز.....	۵۸

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
۴-۲-۴- آزمون تحرک در محیط نیمه جامد.....	۵۸
۴-۳- ویژگی‌های فیزیولوژیکی جدایه‌های <i>Pseudomonas fluorescens</i>	۵۹
۴-۳-۱- آزمون ذوب ژلاتین.....	۵۹
۴-۳-۲- آزمون رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد.....	۵۹
۴-۳-۳- آزمون هیدرولیز آرژینین.....	۵۹
۴-۳-۴- آزمون تشکیل لوان از ساکارز.....	۵۹
۴-۳-۵- آزمون سیترات.....	۶۰
۴-۳-۶- آزمون توانایی استفاده از قند گلوکز.....	۶۰
۴-۴- بررسی خصوصیات محرک رشد گیاه (PGPR) در جدایه‌های بومی <i>Pseudomonas spp.</i>	۶۰
۴-۴-۱- آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور.....	۶۱
۴-۴-۲- آزمون کمی توان تولید اکسین.....	۶۳
۴-۴-۳- آزمون کمی توان حل فسفات معدنی نامحلول.....	۶۷
۴-۴-۴- آزمون توان تولید سیانید هیدروژن.....	۷۰
۴-۵- آماده‌سازی مایه تلقیح جهت استفاده در مزرعه.....	۷۱
۴-۵-۱- بررسی تأثیر تلقیح <i>pseudomonas spp.</i> بر روی برخی پارامترهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی.....	۷۲
۴-۵-۲- تأثیر تلقیح تیمار <i>pseudomonas spp.</i> بر وزن خشک ریشه.....	۷۳
۴-۵-۳- تأثیر تلقیح تیمار باکتری <i>pseudomonas spp.</i> بر وزن خشک اندام هوایی.....	۷۴
۴-۵-۴- تأثیر تلقیح تیمار باکتری <i>pseudomonas spp.</i> بر وزن میوه گوجه‌فرنگی.....	۷۵
۴-۵-۵- تأثیر تلقیح تیمار باکتری <i>Pseudomonas spp.</i> بر میزان جذب نیتروژن در گیاه گوجه‌فرنگی.....	۷۵
۴-۵-۶- تأثیر تلقیح تیمار باکتری <i>Pseudomonas spp.</i> بر میزان جذب فسفر در گیاه گوجه‌فرنگی.....	۷۶
۴-۵-۷- تأثیر تلقیح تیمار باکتری <i>Pseudomonas spp.</i> بر میزان جذب پتاسیم در گیاه گوجه‌فرنگی.....	۷۷

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۷۷.....	۴-۵-۸- تاثیر تلقیح تیمار باکتری <i>Pseudomonas spp.</i> بر میزان جذب آهن در گیاه گوجه‌فرنگی.....
۷۸.....	۴-۶- نتیجه‌گیری کلی.....
۷۹.....	۴-۷- پیشنهادات.....
۸۱.....	منابع.....

فهرست جدول‌ها

صفحه	عنوان
۱۰	جدول ۱-۲- برخی خصوصیات گونه‌های مختلف <i>Pseudomonas</i>
۱۵	جدول ۲-۲- انواعی از سیدروفورهای میکروبی
۳۹	جدول ۱-۳- فرمولاسیون محلول بافر جهت رقت‌سازی.....
۳۹	جدول ۲-۳- ترکیبات محیط کشت King B.....
۴۱	جدول ۳-۳- فرمولاسیون تست تحرک در محیط نیمه‌جامد
۴۲	جدول ۴-۳- فرمولاسیون تست ذوب ژلاتین.....
۴۲	جدول ۵-۳- فرمولاسیون تست هیدرولیز آرژینین
۴۳	جدول ۶-۳- ترکیبات محیط کشت سیمون سترات.....
۴۴	جدول ۷-۳- ترکیبات محیط کشت Ayer.....
۴۷	جدول ۸-۳- ترکیبات محیط کشت PKV.....
۴۸	جدول ۹-۳- ترکیبات محیط کشت TSA.....
۵۶	جدول ۱-۴- نتایج آنالیز خاک زمین زراعی در منطقه دلند.....
۶۱	جدول ۲-۴- نتایج تجربه واریانس تست‌های محرک رشد باکتری.....
۶۲	جدول ۳-۴- نسبت قطر هاله به کلنی در ۱۲۰ ساعت.....
۶۵	جدول ۴-۴- مقدار اکسین تولید شده در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت.....
۶۸	جدول ۵-۴- مقدار فسفر محلول در دوره زمانی ۹۶ ساعت.....
۷۱	جدول ۶-۴- گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس تولید سیانیدهیدروژن.....
۷۲	جدول ۷-۴- نتایج حاصله از آزمون‌های آزمایشگاهی.....
۷۲	جدول ۸-۴- تجزیه واریانس فاکتورهای اندازه‌گیری شده در مزرعه.....
۷۵	جدول ۹-۴- تجزیه واریانس جذب عناصر غذایی در گیاه.....

فهرست شکل‌ها

صفحه	عنوان
۱۳.....	شکل ۱-۲- ساختمان شیمیایی چند نوع فیتوسیدروفورهای گیاهی.....
۱۶.....	شکل ۳-۲- ساختمان انواعی از سیدروفورهای میکروبی.....
۵۷.....	شکل ۱-۴- کلنی باکتری سودوموناس.....
۵۷.....	شکل ۲-۴- توانایی تولید آنزیم اکسیداز به صورت تغییر رنگ کلنی به بنفش تیره در اثر تماس با معرف وواکس...۵۷
۵۸.....	شکل ۳-۴- تشکیل حباب توسط محلول ۳ درصد پراکسید هیدروژن با کلنی.....
۵۸.....	شکل ۴-۴- تحرک جدایه در محیط نیمه جامد.....
۵۸.....	شکل ۵-۴- آزمون هیدرولیز ژلاتین (لوله آزمایش سمت چپ) در برابر شاهد (لوله آزمایش سمت راست).....
۶۰.....	شکل ۶-۴- تغییر رنگ محیط کشت سیمون از سبز به آبی در <i>Pseudomonas</i> اثر کشت.....
۶۱.....	شکل ۷-۴- آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور.....
۶۲.....	شکل ۸-۴- نمودار نسبت قطر هاله به کلنی بعد از ۱۲۰ ساعت.....
۶۴.....	شکل ۹-۴- پاسخ جدایه‌ها به تست اکسین.....
۶۶.....	شکل ۱۰-۴- نمودار میزان اکسین تولید شده در زمان ۷۲ ساعت.....
۶۷.....	شکل ۱۱-۴- آزمون کمی توان حل فسفات معدنی نامحلول.....
۶۹.....	شکل ۱۲-۴- نمودار بیشترین مقدار فسفر محلول در زمان ۴۸ ساعت.....
۷۰.....	شکل ۱۳-۴- نمودار تغییرات pH بر اثر انحلال فسفر در زمان ۴۸ ساعت.....
۷۱.....	شکل ۱۴-۴- توانایی تولید سیانید هیدروژن.....
۷۳.....	شکل ۱۵-۴- تصویر ریشه گوجه‌فرنگی.....
۷۴.....	شکل ۱۶-۴- نمودار نمودار وزن خشک ریشه‌ها پس از برداشت محصول.....
۷۴.....	شکل ۱۷-۴- نمودار تأثیر تیمار باکتری بر وزن خشک اندام هوایی.....
۷۵.....	شکل ۱۸-۴- نمودار تأثیر تیمار باکتری بر وزن میوه.....
۷۶.....	شکل ۱۹-۴- نمودار میزان جذب نیتروژن در گیاه گوجه‌فرنگی.....
۷۶.....	شکل ۲۰-۴- نمودار میزان جذب عنصر فسفر در گیاه گوجه‌فرنگی.....
۷۷.....	شکل ۲۱-۴- نمودار جذب پتاسیم در گیاه گوجه‌فرنگی.....
۷۸.....	شکل ۲۲-۴- نمودار جذب آهن در گیاه گوجه‌فرنگی.....

