بسم الله الرحمن الرحیم

احیای جنگل‌های دو گونه بلوط ایرانی و وی‌ول
با کمک باکتری‌های محلول‌کننده فسفات غیرآلی

نگارش

مریم تیموری

عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

عنوان طرح منتج به نشریه	
بررسی افزایش رشد و زنده‌مانی نونهال‌های برودار (*Quercus brantii*) و وی‌ول (*Quercus libanii*) با کمک باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاهان	۲-۰۹-۰۹-۹۱۰۱۵

عنوان نشریه: احیای جنگل‌های دو گونه بلوط، ایرانی و وی‌ول، با کمک باکتری‌های محلول‌کننده فسفات غیرآلی

نگارش: مریم تیموری

نشانی نویسنده: موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویرایش علمی: احمد رحمانی

ویرایش فنی: اصغر احمدی

عکس روی جلد: مهدی پورهاشمی

تهیه شده در: موسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور / اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی

نشانی: اتوبان تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید علی گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور.

صندوق پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵.

تلفن: ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱

وب‌سایت: www.rifr-ac.ir

شمارگان: الکترونیکی

نوبت و سال انتشار: اول - ۱۳۹۸

شماره نشریه: ۲

این نشریه به شماره ۵۵۸۸۰ در تاریخ ۱۳۹۸/۰۴/۲۴ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است

ISBN:978-964-473-406-9

مخاطبان

محققان منابع طبیعی، کارشناسان و تکنسین نهالستان‌ها

شما با مطالعه این نشریه با موارد زیر آشنا می‌شوید

- ✓ اهمیت جنگل‌های زاگرس و گونه بلوط
- ✓ کاربرد باکتری‌ها در افزایش رشد درختان جنگلی
- ✓ نقش فسفر در رشد و نمو گیاهان
- ✓ نحوه استفاده از باکتری‌های محلول کننده فسفات برای افزایش رشد بلوط ایرانی و وی‌ول

فهرست مندرجات

مقدمه ۵

جنگل‌های زاگرس ۵

گونه بلوط ۵

رویزوباکترهای افزایش دهنده رشد درختان جنگلی ۶

فسفر ۷

روش کار ۷

جدا کردن باکتری‌های محلول‌کننده فسفات ۷

تهیه مایه تلقیح ۹

آماده‌سازی بذرها برای تلقیح ۹

تلقیح و کاشت بذرها ۱۰

نتایج ۱۰

خصوصیات رشدی نهال‌های تلقیح شده ۱۰

توصیه‌های فنی ۱۰

منابع مورد استفاده ۱۱

جنگل‌های زاگرس

جنگل‌های زاگرس در غرب کشور، اکوسیستم‌های طبیعی با ارزشی با تنوع بالایی از گونه‌های گیاهی و جانوری هستند. این ناحیه رویشی که تحت عنوان جنگل‌های خشک و نیمه-خشک نیز طبقه‌بندی می‌شود، یکی از مهم‌ترین منابع تولید آب در کشور به حساب می‌آید. وجود رودخانه‌های پرآبی که از این جنگل‌ها سرچشمه می‌گیرند، سبب شده که این منطقه تمرکز جمعیتی بالایی داشته باشد. علاوه بر تولید آب، جلوگیری از فرسایش خاک، حفظ حیات وحش منطقه، افزایش تنوع زیستی و پایداری منطقه، تلطیف آب و هوا، حذف آلودگی‌های زیست محیطی، ترسیب کربن، حفظ رطوبت خاک، تعلیف دام، محصولات فرعی، گیاهان دارویی، چوب و سوخت و هزاران فایده دیگری که به‌صورت مستقیم یا غیر مستقیم عاید انسان‌ها می‌شود، به‌واسطه وجود این جنگل‌ها است. متاسفانه با وجود فواید بیشماری که این جنگل‌های ارزشمند برای مردمان زاگرس‌نشین و سایر مناطق کشور به ارمغان داشته‌اند، امروزه شاهد تخریب کمی و کیفی جنگل‌های این ناحیه رویشی هستیم (۱).

گونه بلوط

جنس بلوط (*Quercus*) از نظر تعدد گونه، پراکنش جغرافیایی، اهمیت اکولوژیک، جایگاه زیست محیطی و اقتصادی یکی از مهم‌ترین جنس‌های خانواده راش (*Fagaceae*) محسوب می‌شود. این جنس با حدود ۶۰۰ گونه یکی از گسترده‌ترین جنس‌های خانواده مذکور است. بلوط دارای رویشگاه‌های وسیعی در آسیا (ایران، ترکیه، قسمتی از افغانستان، پاکستان، هند و چین)، اروپا (انگلستان، ایرلند، فرانسه، اسپانیا، آلمان، لهستان و رومانی)، آمریکا (ایالات متحده امریکا، مکزیک و گواتمالا) و شمال افریقا است. بلوط مظهر قدرت و استقامت و نماد ملی بسیاری از کشورها محسوب می‌شود (۱). در ایران بلوط عمدتاً در جنگل‌های زاگرس می‌روید. گونه‌های مختلف جنس بلوط سازش اکولوژیک و میزان بردباری بسیار بالایی به شرایط مختلف از خود نشان می‌دهند. این درخت اهمیت زیادی در اقتصاد جنگل‌نشینان زاگرس دارد و استفاده جنگل‌نشینان از چوب و میوه آن در مصارف متعدد خانگی و صنایع مختلف، منجر به قطع بی‌رویه این درختان شده و حیات جنگل‌های بلوط را تهدید می‌کند. زراعت دیم در زیرآشکوب جنگل‌های زاگرس، توسعه زیرساخت‌ها، تغییر اقلیم و پدیده ریزگرد در سال‌های اخیر باعث آسیب جدی به درختان

بلوط و کاهش سطح رویشگاه‌های طبیعی آن در ناحیه رویشی زاگرس شده است (۲و۳). مجموع این عوامل باعث شده است احیای رویشگاه‌های بلوط از طریق جنگل‌کاری اهمیت ویژه‌ای پیدا کند. استفاده از کودهای شیمیایی برای تقویت خاک به منظور تولید سریع نهال‌های جنگلی با کیفیت بالا در نهالستان‌ها به علت گران بودن، افزایش غلظت نیترات در آب‌های زیرزمینی و قابل شرب، تخریب ساختار خاک بویژه در مناطق خشک و در نهایت به خطر افتادن سلامت موجودات زنده توصیه نمی‌شود. کودهای زیستی، متشکل از میکروارگانیسم‌ها و یا فرآورده‌های آنها، به دلایل متعدد از جمله هزینه پایین‌تر و نیز سازگاری با محیط زیست جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی هستند.

رویزوباکترهای افزایش دهنده رشد درختان جنگلی

ریزوباکترهای محرک رشد گیاه[1] به باکتری‌هایی گفته می‌شود که توانایی کلنیزه کردن در اطراف ریشه گیاه و تحریک رشد آنها را دارند. این باکتری‌ها عمدتاً باکتری‌هایی از جنس *سودوموناس*[2] و *باسیلوس*[3] می‌باشند (۴). ازتوباکتر[4]، آرتروباکتر[5]، انتروباکتر[6]، سراشیا[7] و آزوسپریلیوم[8] نیز جزء این گروه از باکتری‌ها محسوب می‌شوند (۵). این باکتری‌ها بشکل مستقیم و غیر مستقیم باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند. اثرات مستقیم با تثبیت زیستی نیتروژن، تولید و ترشح هورمون‌های گیاهی و افزایش حلالیت فسفر و اثرات غیرمستقیم با ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در اطراف سیستم ریشه‌ای گیاه اعمال می‌شود. این اثرات باعث بهبود رشد طولی، قطری و شرایط تغذیه‌ای گیاهان می‌شوند. اگرچه از باکتری‌های محرک رشد عمدتاً به منظور افزایش رشد محصولات زراعی استفاده شده است اما کاربرد این باکتری‌ها برای افزایش رشد درختان جنگلی نیز نتایج امیدوار کننده و مثبتی داشته و باعث افزایش رشد طولی، رشد قطری، میزان ماده خشک گیاه و بهبود وضعیت تغذیه‌ای آنها شده است

---

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

[2] *Pseudomonas*

[3] *Bacillus*

[4] *Azotobacter*

5 *Arthrobacter*

6 *Enterobacter*

7 *Serratia*

8 *Azospirillum*

فسفر

عنصر فسفر موقعیت مهمی را در رشد گیاه و بیولوژی خاک دارد. این عنصر در ترکیبات آلی و غیرآلی خاک و نیز ساختمان گیاهان و میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (۶). این عنصر پس از نیتروژن دومین عنصر مورد نیاز برای رشد گیاهان و میکروارگانیسم‌ها است. این عنصر با وجود مقدار کم و حرکت کندی که در خاک دارد در هدایت آبی گیاه، رشد برگ، رشد جوانه‌های محوری، شدت فتوسنتز، مصرف کربوهیدرات‌ها در اندام هوایی، رشد ریشه‌ها و انتقال سایر ترکیبات معدنی در گیاه مؤثر است. نقش اصلی و فیزیولوژیک فسفر تجمع و آزاد کردن انرژی در طی متابولیسم سلولی است. فسفر به منزله منبع انرژی عمومی در کلیه فعل و انفعالات بیوشیمیایی داخل سلول‌های زنده نقش دارد.(۶). اگرچه اشکال مختلف فسفر توسط سلول‌های زنده جذب می‌شود اما قسمت اعظم آن بشکل فسفات غیرآلی آزاد (HPO_4^{-2} یا H_2PO_4) جذب می‌گردد. فسفات غیرآلی آزاد علاوه بر کوددهی از طریق تجزیه آنزیمی ترکیب‌های فسفاته آلی و غیرآلی و نیز محلول شدن غیرآنزیمی فسفات‌های rock متفاوت و منابع فسفردار غیرآلی به خاک اضافه می‌شود. اغلب برای تأمین فسفر از کودهای شیمیایی فسفاته استفاده می‌شود. این کودها گران بوده و برای تولید آنها از منابع انرژی تجدیدناپذیر مثل سوخت‌های فسیلی استفاده می‌شود که باعث از بین رفتن و هدر رفتن آنها می‌شود. از طرف دیگر کودها منجر به آلودگی منابع زیرزمینی می‌شوند. این دلایل ضرورت وجود یک جایگزین مناسب را برای کودهای شیمیایی مطرح می‌کند به همین دلیل استفاده از روشهای سازگار با محیط زیست از جمله محلول شدن فسفات‌های نامحلول بوسیله میکروارگانیسم‌ها و افزایش فسفر در دسترس بسیار مورد توجه قرار گرفته است. باکتری‌های محلول کننده فسفات یک گروه مهم و شناخته شده از باکتری‌های افزایش دهنده رشد محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها از نوع هتروتروف و اتوتروف بوده و توانایی محلول‌کردن فسفات غیرآلی را در طی فرآیندهای متابولیک خود به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم و قابل دسترس کردن آن را برای گیاهان دارند (۶ و ۷).

روش کار

جدا کردن باکتری‌های محلول‌کننده فسفات

۱- خاک از اطراف ریشه (ریزوسفر) دو گونه بلوط ایرانی و وی‌ول نمونه تهیه کنید.

۲- نمونه‌های خاک را به آزمایشگاه منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید.

۳- رقت های متوالی از نمونه خاک تهیه کنید. برای این منظور ۱۰ گرم از خاک را به ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل (محلول ۰/۱٪ کلرید سدیم، با حل کردن ۰/۱ گرم کلرید سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل تهیه می‌شود) اضافه کنید. این محلول دارای رقت $۱۰^{-۲}$ است.

۴- ارلن حاوی محلول رقت $۱۰^{-۲}$ را بر روی شیکر افقی را بمدت ۲ ساعت با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه هم بزنید. این کار باعث پراکنده شدن ذرات خاک و جدا شدن باکتری‌ها می‌گردد.

۵- رقت‌های متوالی $۱۰^{-۳}$ تا $۱۰^{-۷}$ از رقت $۱۰^{-۲}$ را تهیه کنید. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون دارای رقت $۱۰^{-۲}$ را به لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل اضافه کنید. محلول حاصل دارای رقت $۱۰^{-۳}$ است. پس از هم زدن محتویات لوله با همزن لوله، رقت بعدی را تهیه کنید و این روند را تا تهیه رقت $۱۰^{-۷}$ ادامه دهید. از لوله حاوی رقت $۱۰^{-۷}$، ۱ میلی‌لیتر بیرون بریزید تا حجم همه لوله‌ها یکسان باشد

۶- محیط کشت اختصاصی Sperber برای جداسازی باکتری‌های محلول‌کننده فسفات را آماده کنید. برای تهیه این محیط کشت، مواد را مطابق جدول شماره ۱ به جز آگار با هم مخلوط و ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه کنید. pH محیط کشت روی ۷/۲ تنظیم کرده و سپس با آب مقطر به حجم یک لیتر برسانید. محیط کشت را در اتوکلاو به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع استریل کنید. برای جلوگیری از رشد قارچ‌های محلول‌کننده فسفات، آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزیمید را به‌مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم در هر لیتر از محیط کشت اضافه کنید. سیکلوهگزیمید را در استون خالص حل کرده و پس از استریل کردن محیط کشت به آن اضافه کنید. در هر پتری‌دیش استریل (شیشه‌ای و یا یک بار مصرف)، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت استریل و خنک شده (دمای حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد) را ریخته و صبر کنید تا محیط کاملا ببندد. محیط کشت‌ها را برای اطمینان از اینکه استریل هستند یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری کنید (۸).

۷- نمونه‌های رقیق شده خاک را بر روی محیط‌های آماده شده کشت دهید. برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از نمونه‌های خاک رقیق شده را به محیط کشت منتقل کرده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری کنید. کلنی‌هایی را که اطراف آنها یک هاله شفاف مشاهده می‌شود انتخاب کرده و پس از خالص‌سازی شناسایی کنید (۸).

۸. شناسایی باکتری‌ها را با استفاده از رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی (کاتالاز، اکسیداز، OF glucose، حرکت، MR-VP، سیترات، احیای نیترات و تولید ایندول) انجام دهید (۹).

جدول ۱-ترکیبات تشکیل دهنده محیط Sperber

ماده شیمیایی	مقدار (گرم) در لیتر
گلوکز	۱۰
عصاره مخمر	۰/۵
کلرید کلسیم	۰/۱
سولفات منیزیم	۰/۲۵
تری فسفات کلسیم	۲/۵
آگار	۱۵

تهیه مایه تلقیح

باکتری‌های دارای توانایی انحلال فسفات (ازتوباکتر، اکتینوبسیلوس، باسیلوس و سودوموناس) را در ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت غنی مایع مانند Trypto case یا Nutrient بمدت ۲۴ ساعت کشت دهید. سلول‌های باکتریایی را با سانتریفیوژ کردن (۱۰۰۰۰ دور به‌مدت ۱۰ دقیقه) جدا کنید. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت 3×10^{8} CFU/ml در محلول بافر نمکی فسفات استریل (حاوی ۸ گرم سدیم کلرید، ۱/۲۱ گرم هیدروژن دی پتاسیم فسفات و۰/۳۴ گرم دی هیدروژن پتاسیم فسفات در لیتر) را تهیه کنید (۹).

آماده‌سازی بذرها برای تلقیح

بذرهای سالم و بدون لکه درختان بلوط ایرانی و وی‌ول را جمع‌آوری و تا زمان کاشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری کنید. بذرها را قبل از مایه‌زنی برای حذف آلودگی‌های سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ به‌صورت سطحی به‌مدت ۵ دقیقه استریل و برای حذف مقادیر باقی‌مانده هیپوکلریت سدیم چندین بار با آب مقطر استریل باید شستشو دهید.

تلقیح و کاشت بذرها

بذرهای استریل شده را با مایه تلقیح آماده شده از باکتری‌های *ازتوباکتر* و *اکتینوباسیلوس*، *باسیلوس* و *سودوموناس* به مدت یک‌شب تیمار کنید. بذرها را در محلی که منشاء بذرها از آنجا بوده است بکارید.

نتایج

خصوصیات رشدی نهال‌های تلقیح شده

بر اساس یافته های ما، باکتری‌های تلقیح شده قادر به تغییر معنی‌دار در زنده‌مانی نهال‌ها نبودند که احتمالاً به دلیل شرایط نامناسب آب و هوایی موجود بوده است. باکتری‌های تلقیح شده توانستند رشد طولی، رشد قطری و وزن خشک ریشه نهال‌های حاصل شده را افزایش دهند. افزایش رشد طولی، قطری و وزن خشک ریشه به گونه بلوط و نوع باکتری بستگی داشت بنحوی که میزان رشد طولی و قطری در نهال‌های وی‌ول بیش از برودار بود. بعلاوه استفاده از باکتری‌های *سودوموناس* و *باسیلوس* می‌تواند منجر به افزایش رشد طولی، رشد قطری و وزن خشک ریشه نهال‌های بلوط شود.

توصیه‌های فنی

۱-بر اساس خصوصیات رشدی، گونه وی‌ول گزینه مناسب‌تری برای تلقیح باکتری‌ها است.

۲- باکتری‌های *سودوموناس* و *باسیلوس* می‌توانند جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی به منظور افزایش رشد گونه بلوط و برنامه‌های احیای مناطق تخریب شده باشند.

۳- بهتر است مخلوطی از *سودوموناس* و *باسیلوس* استفاده شود.

۴- با توجه به کمبود بارندگی در بیشتر مناطق و اهمیت رطوبت در رشد و عملکرد باکتری‌ها، توصیه می‌شود در سال اول نهال‌ها آبیاری شوند.

۵- با توجه به اینکه گفته می‌شود کودهای زیستی ماندگاری کمی دارند، حدود ۶ ماه، توصیه می‌شود برای ماندگاری اثرات باکتری‌های تلقیح شده حداقل ۶ ماه بعد از تلقیح اولیه، بار دیگر باکتری‌ها به ریزوسفر نهال‌ها اضافه شوند.

۶- برای اطمینان از اینکه یک گروه مناسب از باکتری‌ها برای تلقیح انتخاب می‌شوند خصوصیات شیمیایی خاک و کمبود احتمالی عناصر مختلف قبل از تلقیح باکتری‌ها بررسی شود.

منابع مورد استفاده

۱–نادری‌شهاب، م.ع. ۱۳۹۵. بلوط‌های ایران، نشر آموزش و ترویج کشاورزی، ۵۳۵ ص.

۲– غضنفری، ه. مروی‌مهاجر، م.ر.، سبحانی، ه.، نمیرانیان، م. ۱۳۷۴. برآورد رویش قطری درختان وی‌ول (*Quercus libani*) در منطقه زاگرس شمالی (مطالعه موردی: هواره خول). منابع طبیعی ایران، (۴) ۵۷ :۶۶۲–۶۴۹

۳– عابدینی، ا.، پورطهماسبی، ک.، غضنفری، ح. و کریمی، ا. ن. ۱۳۸۹. تأثیر شاخه‌بری‌های شدید در قالب گلازنی بر رویش شعاعی درختان وی‌ول (*Quercus libani Oliv*.) در جنگل‌های اطراف بانه.، تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، (۴) ۱۸: ۵۶۸–۵۵۶

4- Klopper, J. W., and Schroth, M. N. 1981. Plant growth promoting rhizobacteria under genobiotic condition. Phythopathology, 71: 642-644.

5- Benizri, E.; Baudoin, E., and Guckert, A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology, 11 (5): 557-574.

6- Alexander M. 1983. Introduction to soil Microbiology. Second eddition. Jon Wielly Publication. 455 pp.

7- Illmer, P., and Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biology and Biochmeistry, 24 (4) 389-395.

8- Sperber J. I. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research, 9:778–781.

9- MacFadine J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Second edition. Warley Press, Inc. U.S.A. 527 pp.