

ارتباط تولید هورمون IAA با تنش های خشکی و شوری و تغییرات غلظت تریپتوفان در باکتری های جداسازی شده از خاک های شور و شور-سدیمی

رضا سلیمانی^۱، حسن توفیقی^۲، حسینعلی علیخانی^{۳*}، کاظم خاوازی^۴

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱۲

تاریخ تصویب: ۹۶/۱۲/۶

چکیده

با توجه به اهمیت تولید IAA توسط باکتری های خاک، به ویژه نقش آن در القاء ریشه زایی در خاک های متأثر از خشکی و شوری این تحقیق انجام شد. در این تحقیق، ضمن جداسازی ۴۰۰ باکتری از خاک های با درجات مختلف EC و SAR، تغییرات تولید IAA و اثر مقادیر مختلف تریپتوفان و تنش های خشکی و شوری بر تولید این هورمون تجزیه و تحلیل شد. نتایج نشان داد که اثر تنش های خشکی و شوری بر تغییرات تولید IAA از نظر آماری معنی دار بود. گونه باکتری *Arthrobacter siccitolerans* که از خاک های شور-سدیمی جداسازی شد، مولد هورمون IAA بوده و نسبت به سایر جدایه های باکتری دارای بیشترین پایداری تولید در تنش های خشکی و شوری بود. همچنین این باکتری، متحمل به خشکی و شوری بوده و به تا EC برابر با ۴۰ دسی زیمنس بر متر و پتانسیل اسمزی ۲۵- بار همچنان به تولید IAA ادامه داد. این باکتری، کارایی بالایی در مصرف تریپتوفان در شرایط تنش های خشکی و شوری از خود نشان داد. به طوری که مقدار تولید

۱- استادیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی ایلام، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، ایلام، ایران

۲- استاد، شیمی خاک، دانشگاه تهران، ایران

۳- استاد، بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشگاه تهران، ایران

(نویسنده مسئول alikhan@ut.ac.ir)

۴- استاد، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

هورمون IAA به ازاء مصرف هر واحد تریپتوفان، برابر با ۱/۰ بود و به عنوان کاراترین باکتری، گزارش شد. این باکتری با توجه به آزمون های انجام شده و برتری نسبی آن، برای انجام آزمون های مزرعه ای در تنش های موجود در خاک های متأثر از خشکی، شوری و شور-سدیمی، پیشنهاد شد.

واژه های کلیدی: باکتری *Arthrobacter siccitolerans*، تریپتوفان، شوری، شور-سدیمی، هورمون IAA

مقدمه

یکی از مهمترین اثرات مستقیم باکتری های محرک رشد گیاه، تولید هورمون IAA به عنوان متابولیت ثانویه می باشد. این هورمون، جزء اکسین های فعال فیزیولوژیکی است. نقش اساسی اکسین، در القاء ریشه زایی و تشکیل آغازنده ریشه اثبات شده است (Mangang, et al., 2015). به طوری که در غلظت های کمتر از ۸-۱۰ مولار، نقش های فیزیولوژیکی دیگری نیز در گیاه ایفاء می کند که از آن جمله می توان به تغییر در معماری ریشه (Root Architecture) و الگو دهی اندام ها (Organ Patterning) اشاره کرد (Lamine, et al., 2008, Woodward, et al., 2005). در شرایط تنش های خشکی و شوری، کاهش جوانه زنی بذر و رشد گیاه را به اختلال در تولید هورمون IAA در گیاه نسبت می دهند (Dilfuza, 2011). به طوری که مصرف IAA (Exogenous application) در غلظت های کم و به طور پیوسته پیشنهاد شده است (Fernandez-Falcon, et al., 2005). تولید IAA بوسیله ریز موجودات خاک از جمله باکتری ها به طور پیوسته انجام می گردد (Mandal et al., 2007). باکتری ها، این هورمون را به منظور بهبود فرایند های فیزیولوژیکی گیاه و ایجاد شرایط مناسب در سیکل تشدید رشد خود تولید می کنند (Mohite, 2013). هورمون IAA تولید شده در این باکتری ها، با متعادل کردن توزیع اکسین در گیاه، فرایند های رشد و نمو گیاه از جمله توسعه ریشه را تنظیم می کند (Spaepen, et al., 2007). مقدار IAA تولید شده بستگی به عوامل ژنتیکی و محیطی دارد. با توجه به محدود بودن مسیر تولید IAA در هر گیاه، باکتری ها، با ایجاد تنوع در مسیرهای تولید IAA، به تولید پایدار آن در جهت رشد گیاه کمک می کنند (Spaepen and Vanderleyden, 2012). مسیرهای عمده بیوسنتز IAA شامل مسیر Indole-3-Acetamide (IAM)، مسیر Indole-3-Pyruvate (IPA) و مسیر تریپتامین (Tra) بوده و بیوسنتز هورمون IAA در باکتری ها، بیشتر از مسیر IAM و گاهی از مسیر IPA انجام می شود (Mohite, 2013). با توجه به وابسته بودن مسیر تولید IAA، به تریپتوفان (Trp-dependent pathway)، در

مرحله اول، ژن *Maai*، آنزیم تریپتوفان مونواکسیژناز (monooxygenase-2-Tryptophan) را کد می کند. این آنزیم، تریپتوفان را به IAM تبدیل می کند. در مرحله دوم مسیر، ژن *Haai*، آنزیم ایندول استامید هیدرولاز (*IAM-hydrolase*) را کد کرده و آنزیم ایندول استامید هیدرولاز، IAM را به IAA و آمونیوم تبدیل می کند (Matsukawa et al., 2007). همچنین تولید هورمون IAA به شدت وابسته به شرایط محیطی موجود در آشیان اکولوژیکی (*Niche*) باکتری ها، از جمله فاکتورهای مورد نیاز برای فعالیت های میکروبی شامل اسید های آلی، قند ها و دیگر متابولیت های گیاهی از جمله *L-Tryptophane* (پیش ماده تولید اکسین) می باشد. در تحقیقات Patten و Glick (2002)، مشخص شد که توان تولید اکسین توسط *Pseudomonas putida* با افزودن تریپتوفان به محیط کشت باکتری، افزایش یافت. به طوری که در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تریپتوفان، به ترتیب ۱۴/۵، ۲۲/۵، ۲۶/۲ و ۳۲/۷ میکروگرم در میلی لیتر IAA تولید شد. همچنین مشخص شده است که مصرف تریپتوفان، توانایی تولید هورمون IAA را توسط باکتری سودوموناس افزایش داد به طوری که در غلظت های ۰/۱، ۲۵ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تریپتوفان به ترتیب ۷/۱، ۱۲ و ۹۶ میکروگرم در میلی لیتر IAA تولید شد (Bent, et al., 2001). در بین گونه های مختلف باکتری نیز تفاوت های زیادی در مقدار تولید هورمون IAA گزارش شده است به طوری که *Ensifer meliloti* و *Rhizobium leguminosarum* به ترتیب ۲۰ و ۲ میکروگرم در میلی لیتر IAA تولید کردند (Dilfuza, 2011). علیخانی و همکاران (۱۳۸۶) گزارش کردند که ۷۴/۱ درصد از باکتری های گروه ریزوبیومی دارای توانایی تولید هورمون IAA بوده و توانایی این باکتری ها در تولید هورمون IAA با هم متفاوت بودند.

تاکنون مطالعه ای بر روی توان تولید هورمون IAA در باکتری های بومی در خاک های مناطق جنوب غربی کشور که تحت تنش با درجات مختلف خشکی، شوری و شور-سدیمی قرار دارند و همچنین پاسخ های باکتری های مولد، به تنش های شوری و خشکی انجام نشده است. بنابراین این تحقیق به منظور تعیین مناسب ترین جدایه باکتری مولد هورمون IAA از نظر توانایی تحمل به خشکی و شوری و کاراترین آن از نظر مصرف تریپتوفان انجام شد.

مواد و روش ها

تهیه نمونه های خاک و جداسازی باکتری ها از خاک

با استفاده از دستگاه موقعیت یاب جهانی (GPS) و دستگاه EC سنج پرتابل، اقدام به مکان یابی و نمونه برداری از توده خاک های شور، شور-سدیمی و معمولی و خاک ریزوسفری گیاه گندم در استان خوزستان و جنوب استان ایلام شد. نمونه های مرکب خاک به مقدار دو کیلوگرم از این خاک ها از عمق صفر تا ۳۰ سانتی متری تهیه، و پس از هوا خشک کردن به منظور تجزیه های

شیمیایی به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس از خاک ها، گل اشباع تهیه شده و pH و EC عصاره اشباع، غلظت کلسیم، غلظت سدیم و پتاسیم به روش فلیم فتومتر (Page, et al., 1982). با توجه به این نتایج، SAR نیز محاسبه شد. با توجه به نتایج تجزیه شیمیایی خاک ها، از خاک های شور، شور-سدیمی و معمولی تعداد ۵۶ نمونه خاک برای جداسازی باکتری ها انتخاب شد. به این منظور، ابتدا سوسپانسیون همگن از هر نمونه، با انتقال ۱۰ گرم خاک به ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه شد. سوسپانسیون تهیه شده، در شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده و پس از آن، سری های رقت (از ۱-۱۰ تا ۹-۱۰) تهیه گردید. در نهایت، ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت، بر روی پلیت حاوی محیط کشت Nutrient Agar پخش (Spread Plate) گردید (Wang et al., 2007). تمام پلیت ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ روز گرماگذاری شدند. به منظور خالص سازی جدایه ها، کلنی های تشکیل شده از بالاترین رقت های هر نمونه کشت شده انتخاب و دوباره بر روی محیط کشت NA رشد داده شدند. کلونی هایی که پس از کشت های متوالی مشابهت داشتند انتخاب شد و برای استفاده بعدی بر روی محیط کشت شیبدار (Slant Agar Medium) در یخچال نگهداری خواهند شد.

ارزیابی جدایه های باکتری از نظر توان تولید هورمون IAA

توانایی تولید هورمون IAA با روش پیشنهادی Bric و همکاران (۱۹۹۱) انجام شد. برای اندازه گیری کمی تولید IAA در محیط کشت مایع، شدت رنگ ایجاد شده در اثر استفاده از محلول سالکوفسکی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر سنجش گردید. به نحوی که ابتدا باکتری ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت TSB کشت داده شد. در مرحله غربالگری اولیه، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در مرحله غربالگری اولیه به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت دارای ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تریپتوفان و در مرحله بعد به منظور مقایسه کارایی مصرف تریپتوفان همین مراحل با استفاده از محیط کشت حاوی مقادیر صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر تریپتوفان انجام شد. بعد از ۲۴ ساعت، سوسپانسیون خالص باکتری به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (g ۱۰۰۰۰) شده و سلول های باکتری (Pellet) از محیط کشت و مواد مترشحه جدا گردید. از محلول رویی (Supernatant) به نسبت ۱ به ۲ با معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی لیتر $0/5 \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ مولار) مخلوط گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و آنگاه با استفاده از اسپکتروفتومتر، مقدار جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید (Patten and Glick, 2002). مقدار تولید هورمون IAA با مقایسه جذب آن با جذب در نمودار استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه شد.

آزمون میزان تحمل به تنش کم آبی باکتری ها با استفاده از PEG-۶۰۰۰

به منظور ارزیابی میزان تحمل جدایه ها به سطوح مختلف تنش کم آبی، از توان رشد آن ها در محیط کشت TSB حاوی غلظت های مختلف پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ استفاده شد. بر اساس معادله Michel & Kaufmann (1973) غلظت های صفر، ۲۰۲/۲، ۲۹۵/۷، ۳۶۷/۷، ۴۲۸/۴ و ۴۸۱/۹ گرم پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ به ازاء هر کیلوگرم محیط کشت TSB معادل پتانسیل های آبی ۰، -۵، -۱۰، -۱۵، -۲۰ و -۲۵ بار می باشد. میزان رشد جدایه ها با اندازه گیری OD (Optical density) محیط رشد آن ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و درصد کاهش رشد هر جدایه در سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول در مقایسه با میزان رشد همان جدایه در محیط TSB محاسبه گردید. ۳ تکرار از محیط TSB تلقیح نشده حاوی مقادیر مختلف پلی اتیلن گلیکول نیز به عنوان شاهد جهت تعیین میزان OD این محیط در شرایط فوق تهیه شد (Sandhya et al., 2009).

آزمون میزان تحمل به تنش شوری

به این منظور، توان رشد جدایه های مختلف باکتری در محیط کشت TSB حاوی مقادیر مختلف نمک های کلرید سدیم، کلرید کلسیم و کلرید منیزیم مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر نمک اضافه شده به نحوی تنظیم گردید که نتیجه حاصل از آن، ایجاد شوری های صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دسی زیمنس بر متر بود. سپس تغییرات رشد جدایه ها با اندازه گیری OD محیط رشد آن ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و در بین جدایه ها با هم مقایسه شد.

شناسایی جدایه برتر

برای شناسایی باکتری های برتر به روش ژنتیکی (16S rRNA)، استخراج DNA با روش استاندارد انجام شد (Dauphin, et al., 2009). ابتدا ایز سلول و تغییر ماهیت دادن پروتئین با به کارگیری بافر لیز کننده (لیزوزیم، EDTA، پروتئیناز K)، انجام و سپس با استفاده از فنل و کلروفرم تمام اجزاء غیر از اسید های نوکلئیک رسوب داده شد (Maciel, et al., 2009). در پایان، با استفاده از استات سدیم و اتانول مطلق سرد، DNA موجود در محلول رسوب کرد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (PCR) با شرایط تکثیر (Amplification) استاندارد انجام شد. در این تحقیق، برای تکثیر ژن 16S rRNA جدایه منتخب از پرایمرهای (3/AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3/5) RP و (5/AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3/5) استفاده شد. محصول حاصل از PCR در ژل آگارز ۱ درصد، بارگذاری (Load) و بعد از مشاهده باند مشخص مورد نظر (۱۲۰۰ bp)، با توجه به راهنما (Lader)، برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید (Parmeela, et al., 2004).

تجزیه های آماری

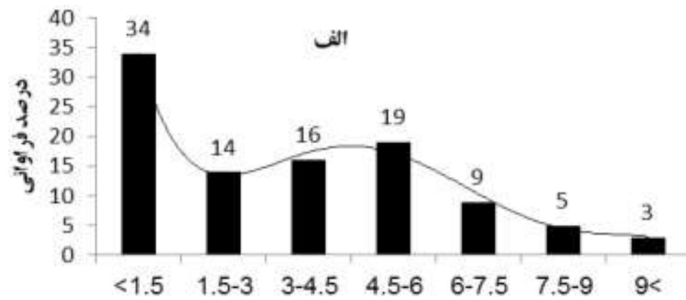
آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی، تیمار تریپتوفان در ۶ سطح شامل صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، تنش خشکی در ۶ سطح شامل صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ بار و تنش خشکی در ۶ سطح شامل صفر، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دسی زیمنس بر متر با ۴ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و نتایج تجزیه واریانس به دست آمد. سپس با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن (DMRT)، میانگین داده ها در سطح ۵٪ با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

نتایج تجزیه شیمیایی خاک های نمونه برداری شده نشان داد که محدوده شوری خاک ها بین ۰/۱ تا ۲۶/۳ دسی زیمنس بر متر و SAR بین ۰/۱ تا ۳۰/۱۲ (میلی اکی والان بر لیتر) ۱/۲ قرار داشت. همچنین سدیم، کلسیم و منیزیم محلول خاک بطور میانگین به ترتیب ۵۶، ۲۲ و ۱۷ میلی اکی والان بر لیتر و میانگین pH خاک ها ۷/۶۱ بود. در مجموع تعداد ۴۰۰ جدایه باکتری از خاک ریزوسفری و غیر ریزوسفری جداسازی گردید.

فراوانی مقادیر تولید هورمون IAA توسط جدایه های باکتری

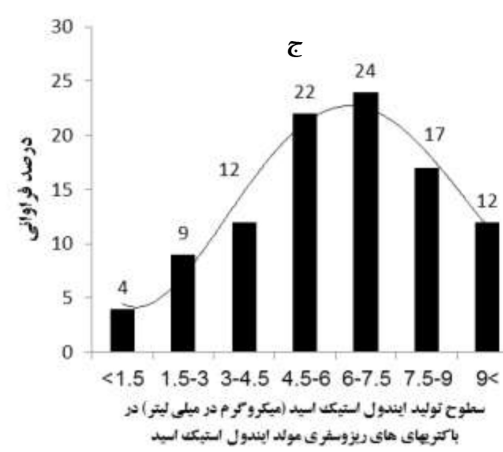
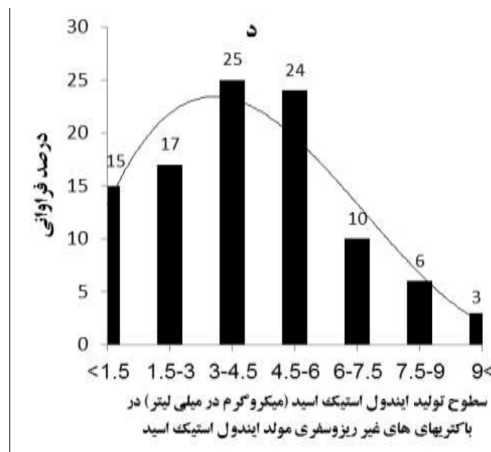
فراوانی مقادیر تولید هورمون IAA در محدوده های با فاصله های ۱/۵ میکروگرم در میلی لیتری در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود، مقادیر بالای تولید هورمون IAA، دارای فراوانی های کمی بودند. به طوری که تنها در ۳ درصد از باکتری ها، مقدار تولید هورمون IAA، بیشتر از ۹ میکروگرم در میلی لیتر بوده و از طرفی، مقدار تولید IAA در ۳۴ درصد از باکتری ها، کمتر از ۱/۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. تولید هورمون IAA در محدوده میانه جمعیت (۶-۴/۵ میکروگرم در میلی لیتر)، دارای فراوانی برابر با ۱۹ درصد بود (شکل ۱-الف). همچنین، مشخص شد که ۷۸ درصد از باکتری های جداسازی شده از ناحیه ریزوسفری و ۵۴ درصد از باکتری های جداسازی شده از ناحیه غیر ریزوسفری (توده خاک)، مولد هورمون IAA بودند (شکل ۱-ب).



سطوح تولید ایندول استیک اسید (میکروگرم در میلی لیتر) در باکتریهای جداسازی شده (سطح کمتر از ۱۵ شامل جدایه های غیر مولد با تولید صفر نیز می گردد).



ب



شکل ۱: مقایسه فراوانی تولید هورمون IAA در جدایه های باکتری مورد مطالعه

الف-فراوانی تولید در جدایه های باکتری ب-نسبت باکتری های مولد و غیر مولد ج-مقایسه فراوانی در باکتری

های ریزوسفری مولد د-مقایسه فراوانی در باکتری های غیر ریزوسفری مولد

در این تحقیق، تفاوت های دیگری نیز در کمیت تولید IAA در شرایط ریزوسفری و غیر ریزوسفر مشاهده شد (شکل ۱-ج). به طوری که بیشترین فراوانی تولید هورمون IAA در باکتری های ریزوسفری، مربوط به محدوده ۶-۷/۵ میکروگرم در میلی لیتر و در مورد باکتری های غیر ریزوسفری، مربوط به محدوده ۳-۴/۵ میکروگرم در میلی لیتر بود. به عبارت دیگر، اوج (Pick) نمودار در مورد باکتری های جداسازی شده از خاک ریزوسفری به سمت مقادیر بیشینه و در مورد باکتری های جداسازی شده از خاک غیر ریزوسفری به سمت مقادیر کمینه تولید هورمون IAA کشیده شده است.

تغییرات تولید هورمون IAA

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که تفاوت های بین تولید هورمون IAA در جدایه های باکتری ریزوسفری و غیر ریزوسفری در سطح یک درصد معنی دار بود (جدول ۱). همچنین مقایسه میانگین تولید هورمون IAA با آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۵ درصد نشان داد که در بین باکتری های ریزوسفری، جدایه های RS11، RN74، RSS57، RSS32 و RS2 به ترتیب با تولید ۱۰/۴۱، ۱۰/۳۷، ۱۰/۰۳ و ۱۰/۰۱ میکروگرم در میلی لیتر بیشترین مقدار تولید هورمون IAA را داشته و در بالاترین گروه آماری قرار گرفتند. همچنین در بین باکتری های غیر ریزوسفری، جدایه های RSS15 و BSS207 به ترتیب با تولید ۹/۴۲ و ۹/۳۱ میکروگرم در میلی لیتر بیشترین مقدار تولید هورمون IAA را داشته و در بالاترین گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۲).

مقایسه توان تحمل تنش به خشکی و شوری

در مورد سنجش تنش خشکی، با حل کردن مقادیر مختلف ماده PEG 6000 در محیط کشت باکتری، قابلیت استفاده مولکولهای آب کاهش یافته و پتانسیل های اسمزی متفاوتی ایجاد شد. همانطور که در شکل ۲ در مورد جدایه RSS57 مشاهده می گردد، با افزایش غلظت PEG 6000 در محیط کشت، چگالی نوری (OD600) به عنوان معیاری از رشد باکتری روند کاهشی نشان داد. شیب منحنی حاصل، بیانگر شدت پاسخ جدایه باکتری به تنش ایجاد شده می باشد. به طوری که شیب کاهشی کمتر (شیب ملایم تر)، نشان دهنده تحمل نسبی بیشتر است که در مورد جدایه RSS57 این شیب برابر با ۰/۱۲۸- بود (شکل ۲). وضعیت کاهشی چگالی نوری و مقایسه سه جدایه برتر مولد هورمون IAA در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است جدایه RSS57 نسبت به جدایه های دیگر دارای توان تحمل به خشکی بیشتری بود و پس از آن، جدایه های RS10 و BSS192 با شیب های ۰/۱۳۷ و ۰/۱۳۹- در رتبه های بعدی قرار گرفتند. همچنین، ارزیابی توان تحمل به شوری جدایه ها با استفاده از محلول های نمکی (ترکیبی از کلرید های سدیم، کلسیم و منیزیم) نشان داد که در این شرایط نیز، با افزایش EC، چگالی نوری (OD600) به عنوان معیاری از رشد باکتری تغییر یافت. در این حالت نیز، روند کلی شیب منحنی

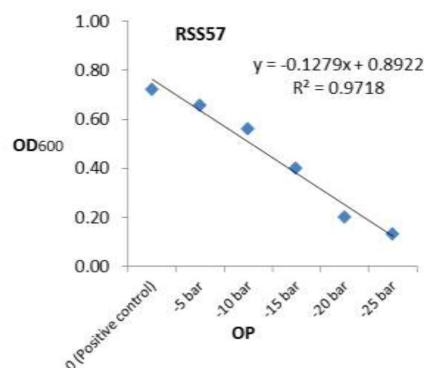
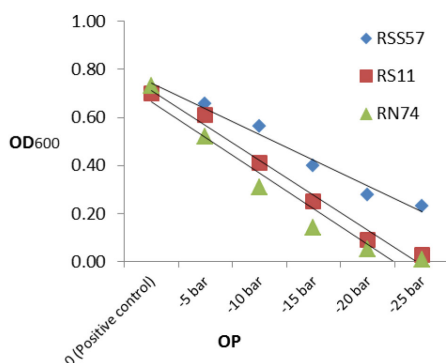
حاصل، شدت پاسخ جدایه های باکتری را به تنش شوری نشان داد. به طوری که شیب کاهشی کمتر، نشان دهنده تحمل نسبی بیشتر است. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود جدایه RSS57 با شیب $-0/067$ ، متحمل ترین جدایه و پس از آن جدایه های RN65 و BSS192 به ترتیب با شیب های $-0/091$ و $-0/098$ در رتبه های بعدی قرار داشتند.

جدول ۱: خلاصه نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تولید هورمون IAA توسط جدایه های ریزوسفری

و غیر ریزوسفری

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال
جدایه های ریزوسفری			
تکرار	۲	۴/۲۱ ^{MS}	۰/۳۴۲
تولید IAA	۸۹	۳۴۵/۶*	۰/۰۱۳
خطا	۱۷۸	۲۴/۲	
			CV%=۸/۴۳
جدایه های غیر ریزوسفری			
تکرار	۲	۸/۷۵ ^{MS}	۰/۴۷۱
تولید IAA	۳۰۹	۶۵۶/۴*	۰/۰۲۲
خطا	۶۱۸	۵۳/۶	
			CV%=۶/۱۲

** نشان دهنده معنی دار بودن در سطح ۵ درصد می باشد.



ب

الف

شکل ۲: (الف) اثر تنش خشکی بر روند رشد جدایه RSS57 و (ب) مقایسه سه جدایه برتر مولد هورمون IAA

جدول ۲: مقادیر هورمون IAA تولید شده توسط جدایه های باکتری برتر ریزوسفری و غیر ریزوسفری

ردیف	جدایه های ریزوسفری	میانگین تولید IAA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	ردیف	جدایه های غیر ریزوسفری	میانگین تولید IAA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	شیب منحنی تحمل به تنش	
						خشکی	شوری
۱	RS11	۱۰/۴۱a	۱	BS153	۹/۴۲a	-۰/۱۷۰c	-۰/۱۲۴c
۲	RN۷۴	۱۰/۳۷a	۲	BSS2۰۷	۹/۳۱a	-۰/۱۹۳c	-۰/۱۲۸c
۳	RSS57	۱۰/۰۳a	۳	BS۸۰	۹/۲۷b	-۰/۱۲۸a	-۰/۰۶۳a
۴	RSS32	۱۰/۰۱a	۴	BSS1۷۴	۹/۱۷b	-۰/۱۸۴c	-۰/۱۰۶b
۵	RS2	۱۰/۰a	۵	BN2۷۶	۹/۰۲b	-۰/۱۸۸c	-۰/۱۵۸d
۶	RN۷۶	۹/۷۶b	۶	BSS1۷۹	۸/۲۸c	-۰/۱۹۹c	-۰/۱۰۳b
۷	RN۸۳	۹/۷۵b	۷	BSS1۷۲	۸/۱۳c	-۰/۱۹۴c	-۰/۱۳۲c
۸	RN۸۰	۹/۳۳b	۸	BSS234	۸/۰۱c	-۰/۲۱۳d	-۰/۱۱۸b
۹	RN65	۸/۷۴c	۹	BS96	۷/۵۴c	-۰/۱۵۷b	-۰/۱۶۳c
۱۰	RS1۰	۸/۷۱c	۱۰	BSS192	۶/۷۳d	-۰/۱۳۷a	-۰/۱۰۸b

میانگین هایی که با حرف یا حروف مشترک مشخص شده اند براساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.

R= Rhizosphere, B= Bulck, S= Saline, SS= Saline- sodic, N= Non-saline soils

اثر مصرف تریپتوفان و سطوح مختلف تنش خشکی بر تولید هورمون IAA

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات غلظت های مختلف تریپتوفان، تنش خشکی و برهمکنش آن ها بر مقدار تولید هورمون IAA به ترتیب در سطح یک، یک و پنج درصد معنی دار بود (جدول ۳). همچنین، مقایسه میانگین داده ها نشان داد که مصرف تریپتوفان در مورد جدایه RSS57 باعث تولید هورمون IAA بیشتری نسبت به سایر جدایه ها شد. این جدایه، در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر تریپتوفان، مقداری ۴/۲۲ میکروگرم در میلی لیتر هورمون IAA تولید کرد که نسبت به تولید هورمون IAA در جدایه RS11 (با تولید ۲/۲۹ میکروگرم در میلی لیتر، ۸۴/۳ درصد افزایش نشان داد. در حالی که جدایه RS11، در شرایط بدون تنش خشکی در مرحله اول غربالگری، بیشترین مقدار IAA را تولید کرد (جدول ۲). در سایر تیمارهای مصرف تریپتوفان نیز این روند ملاحظه گردید. به طوری که در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تریپتوفان نیز، ۲۸/۳ درصد افزایش تولید هورمون IAA حاصل شد (جدول ۴). در سایر جدایه ها نیز همین روند وجود داشت و جدایه های با توان تحمل به خشکی و شوری بالاتر (جدایه های RS10 و BSS192) هم نتوانستند مقادیر قابل ملاحظه ای هورمون IAA با مصرف تریپتوفان تولید کنند و پایداری تولید مناسبی نسبت به جدایه RSS57 نداشتند. به عبارت دیگر افزایش تولید IAA با توجه به روند افزایشی غلظت تریپتوفان ناچیز بود و در تیمار ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر تریپتوفان، مقدار تولید IAA از ۲/۱۶

میکروگرم در میلی لیتر تجاوز نکرد. محاسبه کارایی مصرف تریپتوفان نیز نشان داد که در تیمار ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، جدایه های RSS57 و BSS192، به ترتیب ۰/۱ و ۰/۰۱ میکروگرم در لیتر هورمون IAA به ازاء مصرف هر واحد تریپتوفان (یک میکروگرم در لیتر) تولید کردند که بیانگر ۱۰ برابر بودن کارایی مصرف تریپتوفان و تولید هورمون IAA در جدایه RSS57 نسبت به جدایه RSS192 بود. در مورد سایر جدایه ها نیز کارایی کمتر از ۰/۱ بود. کارایی مصرف تریپتوفان از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$Et=(Pt-Pc)/Trpapp$$

تولید هورمون در تیمار با مصرف تریپتوفان Pt=، کارایی مصرف تریپتوفان Et=

مقدار تریپتوفان مصرف شده Trpapp=، تولید هورمون در تیمار بدون مصرف تریپتوفان Pc=

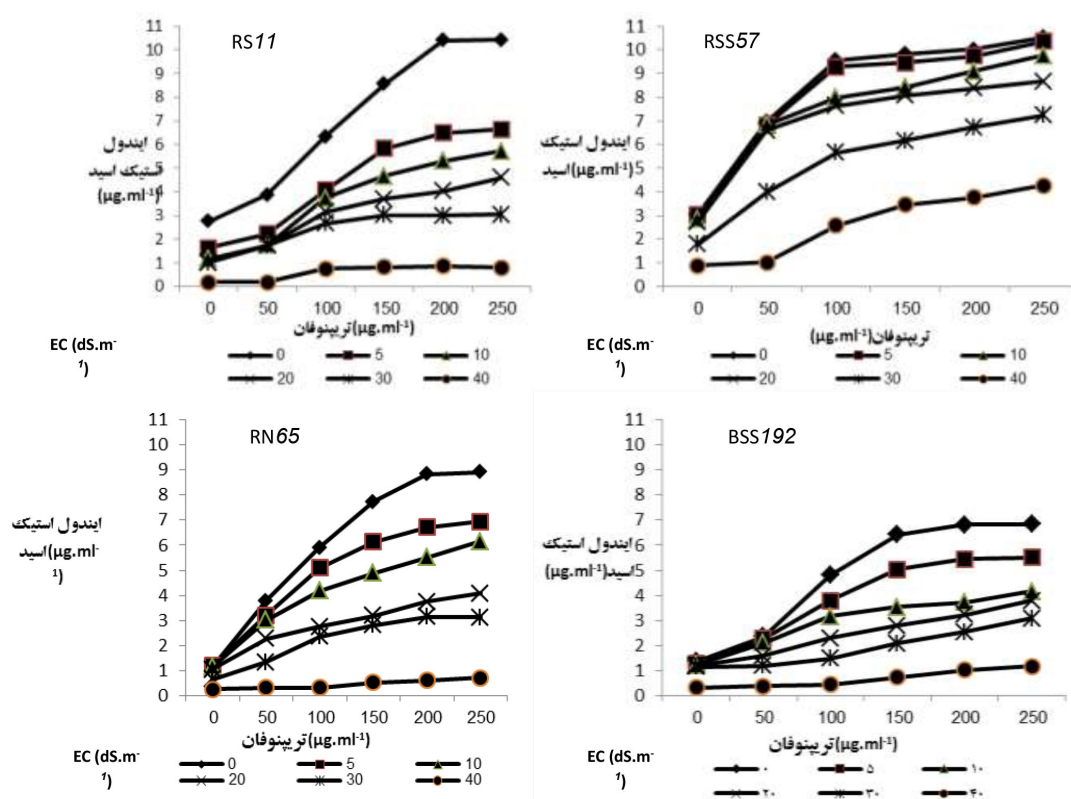
جدول ۳: خلاصه نتایج تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تغییرات تولید هورمون IAA متأثر از مصرف تریپتوفان و سطوح تنش خشکی

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	احتمال
تکرار	۳	۱۴/۳۲ ^{ns}	۰/۴۸۲
جدایه باکتری	۹	۴۷۶/۳ ^{**}	۰/۰۰۲
مصرف تریپتوفان	۵	۱۶۲/۷ [*]	۰/۰۱۳
تنش خشکی	۵	۲۷۴/۵ [*]	۰/۰۱۱
جدایه*تریپتوفان	۴۵	۸۷۶/۲ [*]	۰/۰۳۴
جدایه*تنش خشکی	۴۵	۶۳۴/۷ [*]	۰/۰۲۶
تریپتوفان*تنش خشکی	۲۵	۴۲۹/۶ [*]	۰/۰۱۷
جدایه*تریپتوفان*تنش خشکی	۲۲۵	۹۸۳/۷ [*]	۰/۰۴۱
خطا	۱۰۵	۲۴/۲	
			CV%=۸/۲۴

** و * به ترتیب نشان دهنده معنی دار بودن در سطوح ۱ و ۵ درصد می باشد.

جدایه RSS۳۲							
۶/۳۲A	۱۰/۳۹a	۱۰/۳۷a	۷/۳۲b	۴/۵۸c	۲/۷۸d	۲/۴۸d	۰
۴/۸۰B	۶/۹۹b	۶/۸۴b	۶/۶۵b	۴/۴۸c	۲/۵۹d	۱/۸۶d	-۵
۴/۱۱B	۵/۷۱b	۵/۷۱b	۵/۴۴b	۳/۲۵c	۲/۴۸d	۱/۸۱d	-۱۰
۳/۲۵C	۳/۸۷b	۳/۷۵c	۴/۸۴c	۳/۲۰c	۲/۲۹d	۱/۷۷e	-۱۵
۲/۷۸C	۳/۱۶c	۳/۱۰c	۳/۶۱c	۳/۱۶c	۲/۱۰d	۱/۷۲d	-۲۰
۰/۰۰D	۰/۰۰e	۰/۰۰e	۰/۰۰e	۰/۰۰e	۰/۰۰e	۰/۰۰e	-۲۵

- میانگین هایی که با حرف مشترک مشخص شده اند براساس آزمون دانکن در سطح پنج درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.



شکل ۳: روند تغییرات تولید هورمون IAA توسط ۴ جدایه برتر در سطوح مختلف تریپتوفان و تنش شوری

شروع شده و این موضوع در شکل ۳ با مشاهده فاصله ایجاد شده منحنی های تنش شوری، نسبت به منحنی بدون تنش شوری (شاهد) مشخص می گردد.

نتیجه شناسایی جدایه باکتری برتر

پس از انجام مراحل شناسایی ژنتیکی، نتایج تعیین توالی ها، به وسیله نرم افزار BLAST بررسی شد و با توجه به میزان قرابت ها مشخص شد که به احتمال ۹۹ درصد این جدایه باکتری، متعلق به گونه *Arthrobacter Siccitolerans* می باشد. *Narvaez-Reinaldo* و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که باکتری های جنس *Arthrobacter*، که از ریزوسفر گیاهان مناطق خشک جداسازی شد،

تجمع دهنده ترکیبات محافظت کننده از خشکی (Xeroprotectant) از جمله ترهالوز و گلوتامین بوده و همین موضوع دوام آن ها در شرایط تنش خشکی و شوری سبب شده است.

بحث و نتیجه گیری

در این تحقیق، با توجه به این که نمونه برداری اولیه به تعداد زیاد و از خاک های با درجات مختلف EC و SRA انجام شد، باکتری های جداسازی شده نیز به همان نسبت، متنوع بوده و توانایی های متفاوتی در تولید هورمون IAA در شرایط تنش های خشکی و شوری و کارایی های مختلفی نسبت به مصرف تریپتوفان از خود نشان دادند. همچنین، مشخص شد که ۷۸ درصد از باکتری های جداسازی شده از ناحیه ریزوسفری گندم و ۵۴ درصد از باکتری های جداسازی شده از ناحیه غیر ریزوسفری (توده خاک)، با درجات مختلفی مولد هورمون IAA بودند (Dilfuza (۲۰۱۱) گزارش کرد که ۹۰ درصد از باکتری های جداسازی شده از ریزوسفر، قادر به تولید هورمون IAA بودند. با توجه به تجزیه و تحلیل نمودارهای فراوانی، مشخص شد که توانایی تولید هورمون IAA در سطوح بالا، در باکتری های جداسازی شده از ریزوسفر گندم نسبت به باکتری های جداسازی شده از توده خاک بیشتر بود. به نظر می رسد که به دلیل وجود ترکیباتی مانند هیدرات های کربن و ترکیبات آلی در ترشحات ریشه ای اطراف ریشه و همچنین سلول های مرده جانداران خاک در ریزوسفر نسبت به توده خاک، فراوانی و مقدار تولید هورمون IAA در باکتری های جداسازی شده از ریزوسفر بیشتر بود. با استفاده از چندین مرحله آزمون و مقایسه جدایه ها، یک باکتری متعلق به گونه *Arthrobacter siccitolerans* که از ریزوسفر گندم در یک خاک شور-سدیمی جداسازی شده بود، ویژگی های یک باکتری برتر را داشت. به طوری که محاسبه کارایی مصرف تریپتوفان نشان داد که در تیمار ۲۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، باکتری مقداری ۰/۱ میکروگرم در لیتر هورمون IAA به ازاء مصرف هر واحد تریپتوفان (یک میکروگرم در لیتر) تولید کرد که این مقدار تولید، نسبت به سایر جدایه ها بالاترین مقدار بود. در شرایط تنش های خشکی، شوری و شور-سدیمی، ترشحات ریشه ای به تبعیت از رشد گیاه، کمتر بوده و تریپتوفان کمتری در اختیار باکتری ها قرار می گیرد. از طرفی، جمعیت باکتری ها و توده های مرده آن ها، کمتر بوده و منبع تریپتوفان فراوانی در دسترس باکتری قرار نمی گیرد. بنابراین کارایی بیشتر مصرف تریپتوفان در این شرایط، تعیین کننده موثر بودن تلقیح بوده و به تدریج با افزایش ریشه های گیاه، اثرات متقابل باکتری و گیاه در جهت گسترش رشد هر دو موجود زنده پیش خواهد رفت. Swain و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که باکتری *Bacillus subtilis* مقادیر متغیری از هورمون IAA تولید کرد. Ahmad و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که تعدادی از جدایه های سودوموناس فلورسنس قادر بودند که در محیط NB بدون افزودن تریپتوفان، مقادیر بین ۵/۳۴ تا ۲۲/۴ میکروگرم در میلی لیتر IAA تولید کنند.

همچنین، باکتری *Arthrobacter siccitolerans* در شرایط تنش های خشکی و شوری، بیشتر از سایر جدایه ها، هورمون IAA تولید کرده و پایداری تولید (*Production stability*) در پتانسیل های اسمزی مختلف و مقادیر شوری کم تا زیاد را از خود نشان داد. اهمیت این موضوع از آن جا مشخص می گردد که محققین مختلف از جمله Berg و همکاران (۲۰۱۳) اظهار داشتند که بخشی از توانایی یک گونه گیاهی برای سازش با شرایط تنش خشکی و شوری بستگی به میکروارگانیزم های توانا به تولید هورمون های رشد گیاهی به ویژه IAA در همان شرایط دارد. از آن جایی که بخشی از کاهش رشد گیاه در شوری های پایین، به کاهش تولید هورمون IAA گیاهی (*Endogenous phytohormone*) در بافت گیاهی نسبت داده می شود، لذا هورمون IAA تولیدی توسط باکتری های متحمل به شوری، می تواند جبران کننده این خلاء در گیاه باشد (Alqarawi, et al., 2014). همچنین باکتری مذکور، دارای پایداری تولید هورمون IAA در شرایط تنش خشکی و شوری بوده و کارایی بالایی نیز در مصرف تریپتوفان دارد. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده، این جدایه، کاندید مناسبی برای انجام آزمون های مزرعه ای به عنوان باکتری محرک رشد گیاه در تنش های موجود در خاک های شور و شور-سدیمی مناطق خشک و نیمه خشک در جنوب غربی کشور محسوب شده و می تواند به توسعه رشد ریشه، جذب بیشتر آب و عناصر غذایی و در نتیجه افزایش عملکرد گیاهان در شرایط سخت محیطی کمک کند.

منابع

- Alikhani, H.A., Saleh Rasteen, N. and Bihamta, M. (2007) The Evaluation of IAA and ACC deaminase production ability by Iranian soils rhizobial strains and the effects of superior strains application on plant growth characteristics. *Iranian Journal of Agricultural Science* 38: 693-703.
- Alqarawi, A.A., Abd Allah, E.F., Hashem, A., Al Huqail, A. Asma, Abdulaziz, A. and Al Sahli A.A. (2014) Impact of abiotic salt stress on some metabolic activities of *Ephedra alata* Decne. *Journal of Food and Agricultural Environment* 12: 620-625.
- Benizri, E., Courtade, A., Picard, C. and Guckert, A. (1998) Role of maize root exudates in the production of auxin by *Pseudomonas fluorescense* M.3.1. *Soil Biology and*

- Biochemistry 30: 1481-1484.
- Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. (2001) Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian. Journal of Microbiology 47:793-800.
- Berg, G., Alavi, M., Schmidt, C.S., Zachow, C., Egamberdieva, D. and Lugtenberg F. B. (2013) Biocontrol and osmoprotection for plants under saline conditions. In: J. de Bruijn Frans (Ed.), Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere, Wiley-Blackwell, USA.
- Dauphin, L., Moser, A. and Bowen, M.D. (2009) Evaluation of five commercial nucleic acid extraction kits for their ability to inactivate *Bacillus anthracis* spores and comparison of DNA yields from spores and spiked environmental samples. Journal of Microbiological Methods 76:30-37.
- Dilfuza, E. (2011) Indole-acetic acid production by root associated bacteria and its role in plant growth and development. 2011. In: Keller, A.H., and Fallon, M.D. (Ed.), Auxins: Structure, Biosynthesis and functions. Nova Science Publishers, Inc.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Broek, A.V. and Vanderleyden, J. (1999) Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. Plant and Soil 212: 155-164.
- Fernandez-Falcon, M., Borges, A. and Borges-Perez, A. (2003) Induced resistance to Fusarium wilt of banana by exogenous applications of indoleacetic acid. Phytoprotection 84:149-153.
- Lamine, B., Maria, L.V. and Marc-Andre, F. (2008) Induction and growth of hairy roots for the production of medicinal compounds. Electronic Journal of Integrative Bioscience 3:1-9.
- Maciel, B.M., Santos, A.C.F., Dias, J.C.T., Vidal, R.O., Dias, R.G.C., Gross, E., Cascardo, J.C.M. and Rezende, R.P. (2009) Simple DNA extraction protocol for a 16S rDNA study of bacterial diversity in tropical landfarm soil used for bioremediation of oil waste. Genetics and Molecular Research 8: 375-388.
- Mandal SM, Mondal K.C., Dey S. and Pati B.R. (2007) Optimization of cultural and nu-

- tritional conditions for indole-3-acetic acid (IAA) production by a *Rhizobium* sp. isolated from root nodules of *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Research Journal of Microbiology* 2: 239-246.
- Mangang, J.S., Deaker, R. and Rogers, G. (2015) Early seedling growth response of lettuce, tomato and cucumber to *Azospirillum brasilense* inoculated by soaking and drenching. *Horticultural Science* 42:37-46.
- Matsukawa, E., Nakagawa, Y., Imura, Y. and Hayakawa, M. (2007) Stimulatory effect of indole-3-acetic acid on aerial mycelium formation and antibiotic production in *Streptomyces* spp. *Actinomycetologica* 21:32-39.
- Michel, B.E. and Kaufmann, M.R. (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51:914-916
- Mohite, B. (2013) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from *rhizospheric soil* and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 13:638-649.
- Narvaez-Reinaldo, J.J., Barba, I., Gonzalez-Lopez, J., Tunnacliffe, A. and Manzanera, M. (2010) Rapid method for isolation of desiccation-tolerant strains and xero-protectants. *Appl. Environ. Microbiology* 76: 5254-5262.
- Page, A.L., Miller, R.H. and Keeney, D.R. (1982) *Methods of Soil Analysis*. 2nd Edn., American Society of Agronomy, Madison, WI., USA.
- Parmeela, S. and Johri. B.N. (2004) Phylogenetic analysis of bacterial endophytes showing antagonism against *Rhizoctonia solani*. *Current Science* 87: 687-692.
- Patten, C.L. and Glick, B.R. (2002) Role of *pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of host plant root system. *Applied Environmental Microbiology* 68:3795-3801.
- Sandhya V., Ali S.K.Z., Minakshi, G., Reddy, G. and Venkateswarlu, B. (2009) Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils* 46:17-26
- Spaepen S., Vanderleyden, J. and Remans, R. (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiological Review* 31:425-448.

- Spaepen, S. and Vanderleyden, J. (2012) Auxin and Plant-Microbe Interactions. Cold Spring Herb Perspective Biology 10:1-14.
- Swain, M.R., Naskar, S.K. and Ray, R.C. (2007) Indole 3-acetic acid production and effect on sprouting of yam. (*Dioscorea rotundata* L) Minisetts by *Bacillus subtilis* Isolated from culturable cowdung microflora. Polish Journal of Microbiology 56:103-110.
- Wang, Q.F., Li, W., Liu, Y.L., Cao, H., Li, Z. and Guo, G.Q. (2007) *Bacillus qingdaonensis* sp. nov., a moderately haloalkaliphilic bacterium isolated from a crude sea-salt sample collected near Qingdao in eastern China. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 1143-1147.
- Woodward, A.W. and Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. Annals of Botany 95:707-73.