نشریه علمی پژوهشی زیست‌شناسی خاک / جلد 9 / شماره 1 / 1400
Archive of SID

ارزیابی برخی صفات محرک رشد گیاهی باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از ساقه و برگ تعدادی از گیاهان دارویی

علی اشرف سلطانی طولارود[1] و اسماعیل گلی کلانپا

دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی؛ **ali_soltani_t@yahoo.com**

دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی؛ **goli@uma.ac.ir**

دریافت: **99/4/7** و پذیرش: **99/7/23**

چکیده

گیاهان دارویی نقش حیاتی در پیشبرد اهداف ملی، منطقه‌ای و جهانی برای تحقق سلامت، خودکفایی دارویی، ایجاد اشتغال و توسعه اقتصادی دارند. از آنجا که رویکرد جهانی در تولید گیاهان دارویی به سمت بهبود کمیت و کیفیت ماده مؤثره می‌باشد، به نظر می‌رسد که تغذیه‌ی سالم این گیاهان از طریق کاربرد کودهای میکروبی دارای بیشترین تطابق با هدف تولید گیاهان دارویی می‌باشد. لذا این تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ساقه و برگ گیاهان دارویی و ارزیابی صفات محرک رشد گیاهی آنها به‌منظور بررسی پتانسیل استفاده از این ریزجانداران به‌عنوان کودزیستی انجام شد. به‌منظور انجام این پژوهش، بوته‌های سالم گیاهان دارویی ریحان، پونه، رزماری و مرزه از مزارع و گلخانه‌های اطراف شهر اردبیل جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. عمل جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ساقه و برگ گیاهان با تهیه سری‌های رقت روی محیط کشت آگار مغذی حاوی قارچ‌کش انجام شد. کلنی‌های رشد یافته‌ی متمایز از نظر شکل ظاهری کلنی، رنگ و حاشیه آن و همچنین سرعت رشد باکتری، پس از واکشت و خالص‌سازی، در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگه‌داری گردیدند. در مرحله‌ی بعد تولید ایندول استیک اسید، قدرت حل-کنندگی تری کلسیم فسفات، pH محیط کشت، تولید سیانید هیدروژن و پروتئاز در جدایه‌ها اندازه‌گیری گردید. در این پژوهش در مجموع 95 باکتری اندوفیت از گیاهان مذکور جداسازی و پس از بررسی صفات مرفولوژیک مذکور و سرعت رشد آنها در نهایت 52 جدایه (از هر گیاه 13 جدایه) متفاوت انتخاب شد. نتایج حاصل نشان داد که تمامی باکتری‌های اندوفیت مورد مطالعه قادر به تولید ایندول استیک اسید در غلظت 100 میلی گرم در لیتر ال- تریپتوفان بودند. توانمندترین باکتری‌ها از نظر تولید IAA در پونه (جدایه‌های P_4، P_3 با تولید به‌ترتیب 15/3 میلی‌گرم در لیتر، 11/6 میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید) و ریحان (جدایه B_1 با تولید 13/0 میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید) مشاهده شد. همه جدایه‌های این تحقیق توانایی انحلال تری کلسیم فسفات را داشتند. قوی‌ترین جدایه‌ی حل‌کننده فسفر (S_5 با میزان انحلال 646 میلی‌گرم در لیتر) در بین باکتری‌های جداسازی شده از گیاه مرزه مشاهده شد. کمترین مقدار توان حل‌کنندگی فسفر، در باکتری‌های جداسازی شده از رزماری (جدایه R_4 با میزان انحلال 100 میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد. در پژوهش حاضر همه ریزجانداران مورد ارزیابی قادر به تولید سیانید هیدروژن از مقدار کم تا خیلی زیاد بودند. در ارزیابی توانایی تولید آنزیم پروتئاز در باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده، تشکیل هاله شفاف تنها در اطراف کلنی باکتری‌های S_1، S_4، B_9، B_{12}، B_3، B_{11}، R_7، P_6 و P_4 مشاهده شد. با توجه به نتایج، پیشنهاد می‌گردد اثرات جدایه‌های برتر بر میزان رشد و عملکرد گیاهان دارویی مورد استفاده در این پژوهش در شرایط گلخانه و مزرعه بررسی گردد.

واژه‌های کلیدی: ایندول استیک اسید، انحلال فسفر، سیانید هیدروژن، پروتئاز، کودزیستی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: اردبیل، بلوار دانشگاه، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم و مهندسی خاک

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در کشاورزی مرسوم یکی از روش‌های سریع و به نوعی آسان افزایش تولید در واحد سطح محصولات زراعی، استفاده از سموم و کودهای شیمیایی است. اما این افزایش تولید به قیمت گرانی برای محیط‌زیست و انسان تمام می‌شود. مصرف زیاد این ترکیبات نه‌تنها باعث افت کیفیت محصولات زراعی می‌شود، بلکه اثرات سوء زیادی روی سلامت انسان و اجزای محیط‌زیست از جمله اکوسیستم خاک دارد. در مقابل، کودهای‌زیستی علاوه بر افزایش کیفیت و کمیت محصولات زراعی، با سازوکارهای مختلفی باعث بهبود هرچه بیشتر خواص فیزیکی، شیمیایی و زیستی اکوسیستم خاک به عنوان مهم‌ترین بستر تولید شده و موجب بقاء این اکوسیستم که یکی از مهم‌ترین ارکان کشاورزی پایدار می‌باشد، می‌گردد. کودزیستی یا میکروبی شامل مواد نگهدارنده‌ای با انبوه متراکم یک یا چند ریزموجود زنده مفید خاکزی می‌باشد که در صورت تلقیح به بذر، گیاه یا خاک، قسمت‌های داخلی گیاه را کلونیزه نموده و با افزایش زیست فراهمی عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان، موجب افزایش حاصلخیزی خاک، رشد گیاه و عملکرد محصول می‌شوند (مالوسا و واسیلو، 2014؛ مزید و خان، 2015).

یکی از ریزجاندارانی که می‌توانند به‌عنوان محرک رشد گیاه در تهیه کودهای میکروبی مورد استفاده قرار گیرند باکتری‌های اندوفیت می‌باشند. اندوفیت‌ها، ریزجانداران باکتریایی و قارچی هستند که در قسمت‌های داخلی بافت‌های گیاهی بدون ایجاد علایم ظاهری در گیاه مستقر می‌شوند و اثرات مضری روی گیاه میزبان ایجاد نمی‌کنند (باکن و وایت، 2000؛ لاتا و همکاران، 2018؛ تاموسیون و همکاران، 2017). همه یا اکثر گیاهان دارای ریزجانداران اندوفیت بوده و باکتری‌های اندوفیت تقریباً از تمام ارگان‌های گیاهی (مانند ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، دمبرگ‌ها، جوانه‌ها، گل‌ها، میوه‌ها، بذور، برگچه‌ها، مجاری رزین، بافت‌های مریستم، پوست) جداسازی شده‌اند (باکن و وایت، 2000؛ نیر و پدمواتی، 2014). سورت و همکاران (2003) بیش از 360 باکتری اندوفیت را از گیاه هویج وحشی جداسازی نمودند که در باکتری‌های جداسازی شده، جنس‌های *سودوموناس*، *استافیلوکوکوس* و *آگروباکتریوم* غالب بودند. چو و همکاران (2007) 63 باکتری اندوفیت متعلق به 13 جنس مختلف را از قسمت داخلی ریشه‌های جینسنگ رشد کرده در سه منطقه متفاوت را جداسازی نمودند. 77 باکتری اندوفیت از ریشه، ساقه و برگ گیاه بادنجان تاجریزی موجو در دو منطقه جنای آلمان توسط لونگ و همکاران (2008) جداسازی شد. آراویند و همکاران (2009) 80 جدایه باکتری اندوفیت متعلق به جنس‌های *باسیلوس*، *سودوموناس*، *سراشیا*، *میکروکوکوس*، *آرتروباکتر* و *کوتوباکتریوم* را از واریته‌های مختلف گیاه فلفل سیاه نمونه‌برداری شده از نقاط مختلف هند جداسازی نمودند. یانگ و همکاران (2011) و پاتل و همکاران (2012) به‌ترتیب 72 و 18 جدایه باکتری اندوفیت از ساقه و برگ گیاه گوجه‌فرنگی جداسازی نمودند.

دقیقاً مشخص نشده است که گیاهان بیشتر از یک باکتری اندوفیت سود می‌برند یا یک باکتری ریزوسفری، با این وجود مزایای فراوان باکتری‌های اندوفیت برای گیاهان به وسیله محققین مختلف تأیید و اثبات شده است. ظاهراً تعدادی از باکتری‌های مستقر در ریشه، ساقه، برگ، بذر و میوه گیاهان از نظر تأثیر بر سلامت گیاه خنثی هستند، اما چندین مطالعه پیشنهاد کرده است که بسیاری از همیاری‌های اندوفیتی به هیچ وجه خنثی نبوده بلکه برای گیاهان مفید هستند و این باکتری‌ها به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاهی عمل می‌کنند (بارکا و همکاران، 2002).

تحریک و افزایش رشد گیاهان به وسیله باکتری‌های اندوفیت می‌تواند نتیجه تثبیت نیتروژن مولکولی، افزایش زیست فراهمی ترکیبات معدنی، تولید فیتوهورمون‌های گیاهی، تولید ترکیبات فرار مانند 2-3 بوتاندیل و آسئوتین و بیوکنترل عوامل بیمارگر از طریق تولید ترکیبات ضد باکتری و قارچ، رقابت غذایی، تولید سیدروفور، مقاومت سیستمیک القایی و مصونیت توسط این ریزجانداران باشد (اینوگوز و همکاران، 2004؛ ریو و همکاران،a2003؛ سسیتچ و همکاران، 2002؛ استوزو همکاران، 2000). در سال‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی به دلیل اثبات اثرات مفید آن، ارزان بودن، نداشتن اثرات جانبی و همچنین سازگار بودن با محیط‌زیست روزبه‌روز در حال افزایش است و این گیاهان نقش حیاتی در پیشبرد اهداف ملی، منطقه‌ای و جهانی برای تحقق سلامت، خودکفایی دارویی، ایجاد اشتغال و توسعه اقتصادی دارند (خسروی‌پور و همکاران، 1394). از آنجا که رویکرد جهانی در تولید گیاهان دارویی به سمت بهبود کمیت و کیفیت ماده مؤثره می‌باشد، بنابراین به نظر می‌رسد که تغذیه‌ی سالم این گیاهان از طریق کاربرد کودهای زیستی دارای بیشترین تطابق با هدف تولید گیاهان دارویی می‌باشد (کاپور و همکاران، 2002). مطالعه پژوهش‌های انجام‌شده حاکی از آن است که استفاده از باکتری‌های همراه یک گیاه (موجود در ریزوسفر، ریشه،

www.SID.ir

Archive of SID

بافت‌ها و اندام‌های هوایی آن) که با شرایط زیست-محیطی آن گیاه سازگاری پیدا کرده‌اند، برای تولید کود زیستی جهت افزایش رشد از اهمیت و جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به محدود بودن اطلاعات در خصوص توانایی محرک رشد بودن باکتری‌های اندوفیت همزیست با گیاهان دارویی در کشور، این تحقیق با هدف جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ساقه و برگ گیاهان دارویی و ارزیابی صفات محرک رشد گیاهی آنها به‌منظور بررسی پتانسیل استفاده از این ریزجانداران به‌عنوان کودزیستی انجام شد.

مواد و روش‌ها

به منظور انجام این پژوهش، بوته‌های سالم گیاهان دارویی ریحان، پونه، مرزه (از باغات سبزی اردبیل و شش عدد به ازای هر گیاه) و رزماری (به تعداد شش عدد از باغ سبزی و گلخانه واقع در اردبیل) با دقت لازم جمع‌آوری گردید. نمونه‌های تهیه شده تا شروع آزمایش در شرایط مناسب در آزمایشگاه نگه‌داری و ساقه و برگ این گیاهان به‌عنوان منبعی برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت استفاده شدند.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

بدین‌منظور، ساقه و برگ گیاهان دارویی پس از شستشوی کامل با آب مقطر، به مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک 70 درصد و 5 دقیقه در هیپوکلریت سدیم 2 درصد غوطه‌ور شدند. اندام‌های هوایی استریل سطحی شده پس از چندین‌بار شستشو با آب مقطر استریل (حدوداً شش بار)، تحت شرایط اسپتیک با استفاده از یک هاون استریل به‌خوبی له گردید. سوسپانسیون تهیه شده به محیط کشت نوترینت براث تلقیح و پس از 24 ساعت انکوباسیون در دمای 27-26 درجه سلسیوس، از محیط کشت کدرشده رقت متوالی تهیه و در سطح پلیت حاوی محیط کشت مایع مغذی محتوی قارچ‌کش‌های سیکلوهگزیمید، بنومیل و متالاکسیل تلقیح شدند. پلیت‌ها به مدت 24 تا 72 ساعت در دمای 27-26 درجه سلسیوس انکوبه شده و بعد کلونی‌های باکتریایی متفاوت از نظر اندازه، رنگ و سرعت رشد طی چند مرحله واکشت خالص‌سازی گردیدند (هونگ و آناپورنا، 2004). برخی از خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده شامل واکنش گرم، رشد در شرایط هوازی، کاتالاز، اکسیداز و اوره‌آز بر اساس کتاب راهنمای برگی اندازه-گیری شد (گریتی و همکاران، 2005).

اندازه‌گیری صفات محرک رشد گیاهی

اندازه‌گیری میزان تولید ایندول استیک اسید

به‌منظور بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت NB کشت و سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی لیتر محیط کشت NB حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر ال – تریپتوفان منتقل شد. بعد از 48 ساعت سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با 2 میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (شامل 150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5 میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ 0/5مولار) مخلوط گردید. سپس به مدت 25 دقیقه در دمای اتاق نگه‌داری و بلافاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج 535 نانومتر قرائت شد (بنت و همکاران، 2001). مقدار تولید اکسین با مقایسه این جذب با نمودار استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

اندازه‌گیری توان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی در محیط مایع

برای بررسی توان حلالیت فسفر معدنی نامحلول باکتری‌ها، از روش اسپربر (1958) استفاده گردید. در این روش ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده شدند، سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع (شامل 10 گرم در لیتر گلوکز، 0/5 گرم در لیتر عصاره مخمر، 0/32 گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، 0/14 گرم در لیتر $CaCl_2$، 2/5 گرم در لیتر$Ca_3(PO_4)_2$ و (pH=7/2) حاوی 5 گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات) منتقل شد. سپس ارلن‌های تلقیح شده همراه با یک شاهد به مدت 5 روز داخل انکوباتور شیکر شده و بعد از آن pH آن‌ها قرائت شد. هم‌زمان با عملیات فوق سوسپانسیون حاوی باکتری سانتریفوژ (با دور 10000 به مدت 15 دقیقه) شده و 0/2 میلی‌لیتر از محلول رویی با 3/8 میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات- وانادات مخلوط شد. پس از 10 دقیقه خواباندن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول 470 نانومتر قرائت شده و میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از KH_2PO_4 محاسبه شد.

اندازه‌گیری نیمه کمی توان تولید آنزیم پروتئاز

بدین‌منظور، جدایه‌ها بر روی محیط اسکیم میلک آگار (شامل پنج گرم اسکیم میلک، پنج گرم عصاره مخمر، چهار گرم بلاد آگار و 14 گرم آگار) کشت و برای 48 ساعت در دمای 29 درجه سلسیوس در

www.SID.ir

Archive of SID

انکوباتور قرار داده شدند. سپس پیدایش هاله در پیرامون کلنی همانند شناسه ساخت آنزیم پروتئاز آزمایش شد (مورفر و همکاران، 1995).

اندازه‌گیری توان تولید سیانید هیدروژن

توانمندی جدایه‌های مورد مطالعه در سنتز سیانید هیدروژن به روش دونیت-کورئا و همکاران (2004) ارزیابی شد. بدین‌منظور ابتدا جدایه‌ها در پلیت-های حاوی محیط NB[1] غنی شده با گلایسین (4/4 گرم در لیتر) کشت داده شدند. سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک 0/5 درصد در قسمت داخلی درب پلیت قرار داده شد. پلیت‌های درز بندی شده با استفاده از پارافیلم، به مدت پنج روز در انکوباتور با دمای 28 درجه سلسیوس نگه‌داری و براساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (کم)، نارنجی (متوسط)، قهوه‌ای تیره (زیاد) و آجری (خیلی زیاد) که به‌ترتیب از صفر تا چهار درجه‌بندی شدند میزان تولید سیانید هیدروژن تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این پژوهش، صفات محرک رشد 13 سویه جداسازی شده از هر کدام از گیاهان دارویی نعناع، مرزه، رزماری و پونه در قالب طرح کاملا تصادفی و در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست آمده در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی و برخی صفات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری

در تحقیق حاضر در مجموع 95 باکتری اندوفیت از ساقه و برگ گیاهان دارویی ریحان، پونه، رزماری و مرزه جداسازی شد. پس از بررسی دقیق اندازه کلنی، رنگ و حاشیه آن و همچنین سرعت رشد، در نهایت 52 جدایه (از هر گیاه 13 جدایه) متفاوت انتخاب گردید. باکتری‌های انتخابی پس از اطمینان از خالص بودن آنها، روی پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار برای استفاده‌های بعدی در یخچال با دمای 4 درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. نتایج اندازه‌گیری برخی صفات بیوشیمیایی جدایه‌های مورد بررسی در جدول 1 نشان داده شده است.

ارزیابی صفات محرک رشد گیاهی باکتری‌های اندوفیت جداسازی‌شده

در این پژوهش به‌منظور بررسی پتانسیل محرک رشد گیاهی بودن اندوفیت‌های باکتریایی جداسازی شده، تولید ایندول استیک اسید[2]، میزان افزایش زیست فراهمی ترکیبات معدنی کم‌محلول فسفر (تری‌کلسیم فسفات)، تولید سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز توسط این ریزجانداران مورد ارزیابی قرار گرفت که در ادامه به تفکیک بررسی خواهند شد.

توان تولید ایندول استیک اسید

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که تمام جدایه‌های (13 جدایه برای هر گیاه) اندوفیت انتخابی گیاهان دارویی مورد بررسی، تاثیر معنی‌داری روی توان تولید ایندول استیک اسید در غلظت 100 میلی گرم در لیتر ال- تریپتوفان در سطح احتمال 1 % داشتند (جدول 2).

مقایسه میانگین توانایی باکتری‌های جداسازی شده از چهار گیاه دارویی در تولید ایندول استیک اسید در شکل 1 نشان داده شده است. بر اساس این شکل، توانایی باکتری‌های جداسازی شده از گیاهان دارویی مختلف در تولید این متابولیت با همدیگر متفاوت بود. در بین چهار گیاه دارویی مورد بررسی، باکتری‌های جداسازی شده از گیاه رزماری و مرزه به ترتیب با میانگین تولید 8/00 و 3/58 میلی‌گرم در لیتر اسید ایندول استیک بیشترین و کمترین مقدار این ویژگی را به خود اختصاص دادند. میانگین تولید IAA در باکتری‌های جداسازی شده از گیاه پونه و ریحان به ترتیب 6/73 و 4/79 میلی‌گرم در لیتر بدست آمد.

[1] Nutrient Broth

[2] Indole Acetic Acid; IAA

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- نتیجه اندازه‌گیری برخی صفات بیوشیمیایی جدایه‌های مورد مطالعه

جدایه	واکنش گرم	کاتالاز	اکسیداز	رشد در شرایط هوازی	اوره آز
R1	+	+	-	+	+
R2	+	_	+	+	-
R3	_	+	+	+	+
R4	_	+	-	+	+
R5	_	+	-	+	_
R6	_	+	+	+	-
R7	+	+	_	+	+
R8	+	-	-	+	+
R9	+	+	+	+	-
R10	+	+	-	+	-
R11	+	_	-	+	-
R12	-	+	+	+	+
R13	-	+	-	+	_
B1	+	+	-	+	+
B2	-	-	+	+	-
B3	-	+	+	+	-
B4	-	+	-	+	+
B5	+	+	-	+	-
B6	-	+	+	+	-
B7	+	+	+	+	-
B8	+	+	-	+	+
B9	-	+	-	+	+
B10	+	-	+	+	_
B11	+	-	+	+	+
B12	-	+	+	+	-
B13	-	+	+	+	+
P1	+	+	-	+	+
P2	+	+	-	+	-
P3	+	+	+	+	-
P4	-	+	+	+	-
P5	-	+	+	+	+
P6	+	+	-	+	+
P7	-	+	-	+	+
P8	+	+	-	+	+
P9	+	+	+	+	-
P10	-	+	+	+	+
P11	-	-	+	+	+
P12	+	+	-	+	-
P13	-	+	+	+	-
S1	_	+	+	+	+
S2	_	_	+	+	-
S3	+	+	-	+	-
S4	_	+	+	+	+
S5	-	+	+	+	+
S6	-	+	+	+	-
S7	+	-	-	+	+
S8	-	+	-	+	+
S9	+	-	+	+	+
S10	+	+	-	+	-
S11	-	+	-	+	+
S12	-	+	+	+	-
S13	+	+	-	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- تجزیه واریانس توانایی باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از ساقه و برگ گیاهان دارویی ریحان، رزماری، مرزه و پونه در تولید ایندول استیک اسید و حل‌کنندگی تری‌کلسیم فسفات

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		ریحان		رزماری		مرزه		پونه	
		TCPS[1]	IAA[2]	TCPS	IAA	TCPS	IAA	TCPS	IAA
تیمار	12	162881**	265**	154784**	284**	469847**	45/4**	113852**	613**
اشتباه آزمایشی	26	63197	0/442	89779	2/15	68206	0/310	66185	0/870
ضریب تغییرات (CV) (%)		26	54	43	34	26	30	19	59

1 توان حل کنندگی تری‌کلسیم فسفات (Tricalcium phosphate solubilization ability)

2 ایندول استیک اسید (Indole Acetic Acid production, IAA)

**نمایانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

باکتری‌های اندوفیت گیاه رزماری اکثراً توانایی خوبی در تولید فیتوهورمون ایندول استیک اسید داشتند. دامنه‌ی تولید این فیتوهورمون در اندوفیت‌های باکتریایی جداسازی شده از رزماری 10/39-2/97 میلی‌گرم در لیتر بود. بیشترین میزان IAA تولیدی به جدایه R_1 (10/4 میلی‌گرم در لیتر) تعلق داشت که با جدایه R_{10} (10/4 میلی‌گرم در لیتر) تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل 1). کمترین میزان IAA تولیدی به مقدار 2/97 میلی گرم در لیتر در جدایه‌های R_2 و R_{13} مشاهده شد. در گیاه ریحان، جدایه‌های B_{13} و B_8 به ترتیب با تولید 12/81 میلی‌گرم در لیتر و 2/41 میلی‌گرم در لیتر IAA قوی‌ترین و ضعیف‌ترین جدایه‌ها از نظر سنتز این متابولیت بودند (شکل 1). در باکتری‌های جداسازی شده از گیاه مرزه جدایه‌ی S_{11} بیشترین و S_{12} کمترین توانایی را از نظر تولید فیتوهورمون مذکور دارا بودند و سه جدایه‌ی S_1، S_2 و S_4 و همچنین جدایه‌های S_7، S_8، S_9 و S_{10} توانایی خیلی نزدیک به هم از نظر تولید IAA داشتند (شکل 1). مقدار تولید ایندول استیک اسید در اکثر اندوفیت‌های ایزوله شده از پونه با همدیگر اختلاف نسبتاً بالایی داشتند. دامنه تولید در این باکتری‌ها 15/32-2/63 میلی‌گرم در لیتر بود (شکل 1).

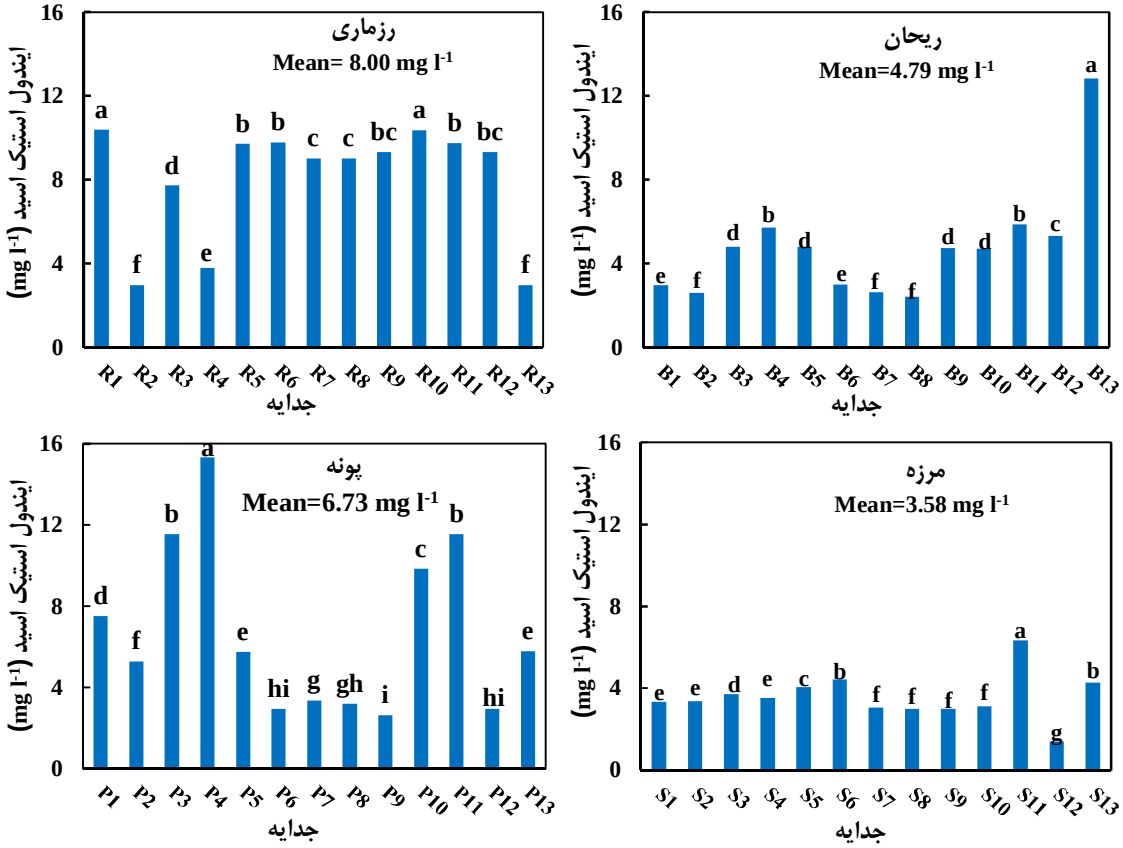
در میان همه باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق، توانمندترین باکتری‌ها از نظر تولید IAA در جدایه‌های P_4، P_3 جداسازی شده از گیاه پونه (به‌ترتیب با تولید 15/3 و 11/6 میلی‌گرم در لیتر IAA) و جدایه B_{13} جداسازی شده از گیاه ریحان (13/0 میلی‌گرم در لیتر IAA) مشاهد شد. همچنین جدایه‌های R_1 و R_{10} (10/4 میلی‌گرم در لیتر و 10/4 میلی‌گرم در لیتر) توانایی نسبتاً بالایی را در تولید فیتوهورمون مورد بررسی نشان دادند. ضعیف‌ترین جدایه از نظر تولید ایندول استیک اسید، در میان باکتری‌های جداسازی شده از گیاه مرزه مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت در مقایسه با دیگر باکتری‌های مورد مطالعه، اکثر جدایه‌های این گیاه توانایی پایینی در تولید متابولیت مورد ارزیابی داشتند.

یکی از مکانیسم‌هایی که توسط آن باکتری‌های اندوفیت باعث افزایش رشد گیاهان میزبان خود می‌شوند تولید IAA است (لی و همکاران، 2004). ایندول استیک اسید مهمترین نوع اکسین و یکی از انواع مهم هورمون-های محرک رشد می‌باشد. این فیتوهورمون در غلظت کم می‌تواند فرآیندهای فیزیولوژیکی از قبیل تقسیم و توسعه یافتگی سلول، تمایز بافت‌ها را در گیاه تحت تأثیر قرار داده و به‌ویژه با افزایش چشم‌گیر زیتوده ریشه، موجب افزایش سطح جذب آب و عناصر غذایی و بهبود رشد گیاه گردد (راجا و همکاران، 2008؛ اسپائپن و همکاران، 2007). توانایی باکتری‌های اندوفیت در تولید ایندول استیک اسید توسط پژوهشگران مختلفی گزارش شده است. در تحقیق انجام شده‌ی جئها و کومار (2007)، 7 جدایه اندوفیت از 10 جدایه جداسازی شده از گیاه *Typha australis* از نظر تولید IAA مثبت بودند. وندان و همکاران (2010)، گزارش نمودند که 12 جدایه اندوفیت جداسازی شده از گیاه جینسینگ توانایی بالایی در تولید IAA در محیط کشت نوترینت براث حاوی پیش‌ماده ال-تریپتوفان داشتند. در مطالعه هانگ و همکاران (2007)، تولید اکسین در 56 باکتری اندوفیت جداسازی شده از ساقه، برگ و گره‌های گیاه سویا مشاهده شد که 15 جدایه از آنها بیش از 25 میکروگرم در میلی‌لیتر IAA در حضور ال-تریپتوفان تولید نمودند. در مطالعه حاضر جدایه‌های جداسازی شده از گیاهان دارویی مختلف تفاوت قابل توجه در تولید IAA داشتند، در حالی که به استثنای گیاه پونه (که تفاوت بین برخی جدایه‌ها از نظر سنتز متابولیت

www.SID.ir

Archive of SID

مورد ارزیابی نسبتاً بالاست)، در سه گیاه ریحان، رزماری و مرزه اختلاف چندانی بین اکثر گونه‌های جداسازی شده از یک گیاه از نظر تولید ایندول استیک اسید وجود نداشته و این جدایه‌ها مقادیر خیلی نزدیک به هم از فیتوهورمون مزبور را تولید نمودند. تولید مقادیر متفاوت IAA توسط انواع مختلف سویه‌های باکتریایی در تحقیقات گزارش شده توسط محققین به چشم می‌خورد. تفاوت در تولید اکسین در ریزجانداران مختلف می‌تواند به دلیل میزان در دسترس بودن سوبسترا و توانایی خود ریزجاندار در استفاده از منابع موجود در محیط باشد. با توجه به این نکته و شرایط آزمایش می‌توان اظهار داشت که باکتری-های دارای توانمندی یکسان از نظر تولید ایندول استیک اسید در این پژوهش، توانایی فیزیولوژیکی و ژنتیکی مشابهی در استفاده از ترکیبات موجود جهت سنتز فیتوهورمون مزبور را دارند. اختلاف در ویژگی‌های ژنوتیپی باکتری‌ها، منجر به تولید مقادیر متفاوت از متابولیت‌های سلولی از قبیل IAA خواهد شد.



شکل 1- میزان ایندول استیک اسید تولید شده توسط باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از برگ و ساقه گیاهان دارویی ریحان، رزماری، مرزه و پونه. حروف متفاوت در هر جدایه مورد بررسی بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد است.

www.SID.ir

Archive of SID

توان حل کنندگی تری‌کلسیم فسفات و تغییرات pH محیط کشت

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به ارزیابی انحلال تری‌کلسیم فسفات توسط جدایه‌های اندوفیت مورد مطالعه و همچنین تغییرات pH محیط کشت در سطح 1 درصد معنی‌دار بود (جدول‌های 2 و 3). همه جدایه‌های این تحقیق توانایی انحلال ترکیب کم‌محلول مذکور را داشتند. قوی‌ترین جدایه‌ی حل‌کننده ترکیب کم-محلول فسفر در بین باکتری‌های جداسازی شده از گیاه مرزه در جدایه S_5 با میزان انحلال 646 میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. اکثر جدایه‌های اندوفیت این گیاه توانایی بالایی را در حل کردن تری‌کلسیم فسفات نشان دادند. مقدار متوسط انحلال توسط اندوفیت‌های گیاه مرزه 443 میلی‌گرم در لیتر بود (شکل 2). در این پژوهش، کمترین مقدار حل‌کنندگی ترکیب معدنی کم‌محلول فسفات با میانگین 185 میلی گرم در لیتر در باکتری‌های جداسازی شده از گیاه رزماری مشاهده شد. در این گیاه، جدایه R_1 با میزان انحلال 319 میلی‌گرم در لیتر توانمندترین باکتری در حل کردن تری‌کلیسم فسفات بود که با تیمارهای R_2، R_5 و R_8 تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل 2). اختلاف نسبتاً کمی بین جدایه‌های اندوفیت گیاه پونه از نظر میزان انحلال ترکیب معدنی کم‌محلول مذکور وجود داشت. در باکتری‌های جداسازی شده از این گیاه، دامنه انحلال تری کلسیم فسفات از 273-473 میلی‌گرم در لیتر بود (شکل 2). در میان باکتری‌های جداسازی شده از گیاه ریحان، جدایه‌های B_1 و B_{13} به ترتیب با میزان انحلال 437 میلی‌گرم در لیتر و 164 میلی‌گرم در لیتر بالاترین و کمترین توانایی را در انحلال تری‌کلیسم فسفات داشتند (شکل 2).

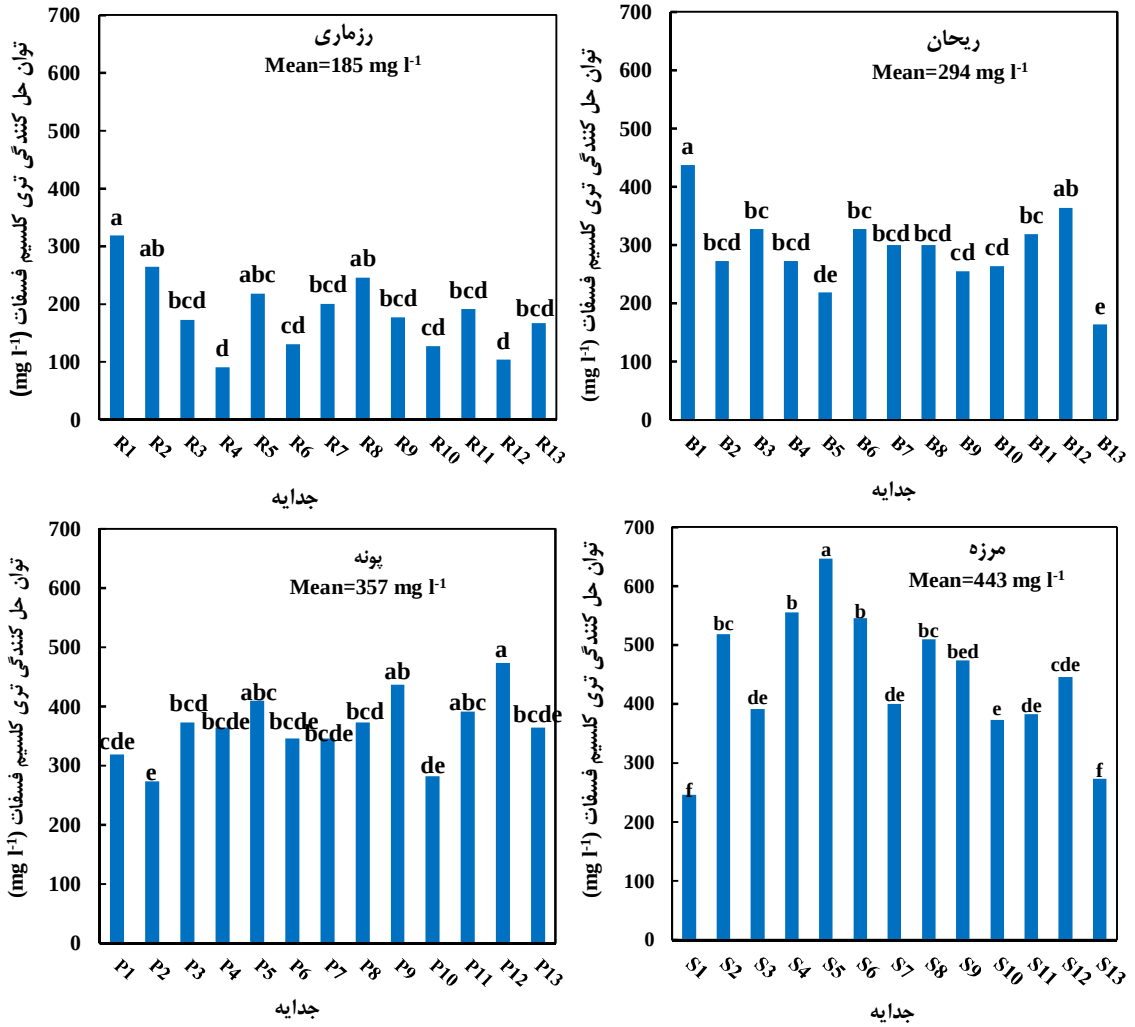
بررسی نتایج پژوهش محققین مختلف نشان می‌دهد که باکتری‌های اندوفیت توانایی انحلال ترکیبات معدنی کم‌محلول را دارند. لونگ و همکاران (2008) گزارش نمودند که تعدای از باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از ریشه، ساقه و برگ گیاه بادنجان تاجریزی توانایی انحلال فسفر معدنی کم‌محلول را داشتند. وندان و همکاران (2010)، انحلال فسفات کم-محلول توسط 9 باکتری اندوفیت جداسازی شده از گیاه جینسینگ را مشاهده نمودند. در پژوهش انجام شده توسط پاتل و همکاران (2012)، 9 باکتری جداسازی شده از گیاه گوجه‌فرنگی توانایی انحلال فسفات کم‌محلول را داشتند. زمانی که باکتری‌های محرک رشد به‌عنوان کودزیستی استفاده می‌شوند، این ریزجانداران با افزایش میزان انحلال ترکیبات معدنی و در نتیجه افزایش زیست فراهمی عناصر غذایی مورد نیاز گیاه موجب افزایش رشد می‌شوند. یکی از مهم‌ترین این عناصر فسفر است که باکتری‌های حل‌کننده ترکیبات معدنی کم‌محلول فسفر[1] موجب افزایش شکل قابل جذب این عنصر برای گیاه می‌گردند. توانایی گونه‌های مختلف باکتریایی در انحلال فسفات‌های معدنی کم‌محلول از قبیل تری کلسیم فسفات، دی‌کلسیم فسفات، هیدروکسی آپاتیت و سنگ فسفات توسط محققین مختلف گزارش شده است (گلداستین، 1986). ریزجانداران حل‌کننده فسفر در خاک با استفاده از فرآیند اسیدی کردن[2]، تولید ترکیبات کلات کننده[3] و واکنش‌های تبادلی[4] باعث افزایش حلالیت ترکیبات معدنی کم‌محلول فسفر می‌شوند (بانیک، 1983؛ رودریگوز و همکاران، 2000؛ سون و همکاران، 2006).

با توجه به داده‌های تجزیه واریانس، تأثیر باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاهان دارویی مورد مطالعه بر pH محیط کشت پنج روز پس از تلقیح باکتری‌ها، در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 3). بیشترین (5/92) و کمترین (4/65) مقدار pH محیط کشت به ترتیب در تیمار شاهد (بدون ریزجاندار) و تیمار باکتری‌های جداسازی شده از گیاه ریحان مشاهده شد. به عبارت دیگر، باکتری‌های جداسازی شده از گیاه ریحان به طور میانگین 1/27 واحد pH محیط کشت را کاهش داده است. این تأثیر در باکتری‌های جداسازی شده از گیاه مرزه کمترین (0/80 واحد کاهش نسبت به شاهد) و در باکتری‌های جداسازی شده از پونه و رزماری به ترتیب برابر 1 و 0/86 واحد بود. در بین جدایه‌های مورد بررسی نیز کمترین مقدار pH محیط کشت (بیشترین تأثیر در کاهش pH) در جدایه B_9 گیاه ریحان به میزان 4/0 مشاهده شد (جدول 4).

1. Phosphate Solublizing Bacteria; PSB
2. acidification
3. chelation
4. exchange reactions

www.SID.ir

Archive of SID



شکل 2- توان حل کنندگی تری کلسیم فسفات باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از برگ و ساقه گیاهان دارویی ریحان، رزماری، مرزه و پونه. حروف متفاوت در هر جدایه مورد بررسی بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد است.

مقایسه pH مربوط به محیط کشت حاوی جدایه‌های مورد مطالعه با تیمار شاهد بدون ریزجاندار نشان داد که رشد و نمو اکثر جدایه‌ها موجب کاهش این ویژگی در سطح احتمال 1 درصد شدند (جدول 3). البته، آزمون مقایسه میانگین نشان داد که در خصوص برخی باکتری‌ها این کاهش‌معنی‌دار نبود (جدول 4).

بررسی همبستگی پیرسون بین کاهش pH محیط و انحلال تری کلسیم فسفات توسط جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که بجز در باکتریهای جداسازی شده از ریحان ($r=0.513^{**}$)، در سایر گیاهان همبستگی قابل توجهی بین کاهش pH توان حل‌کنندگی فسفات کم-محلول مشاهد نشد ($r=0.287$ برای رزماری، $r=-0.046$ برای مزره و $r=0.18$ برای پونه). هر چند کاهش pH محیط‌کشت حاوی باکتری‌های PSB، تولید اسید آلی توسط این باکتری‌ها را نشان می‌دهد (شارما و همکاران، 2013؛ وایت‌لو، 2000). اما، به نظر می‌رسد اسیدی نمودن[1] محیط کشت تنها مکانیسم انحلال ترکیبات ن کم-محلول فسفر معدنی توسط ریزجانداران PSMs[2] نیست، چون مطالعه تحقیقات انجام شده حاکی از آن است که در برخی پژوهش‌ها همبستگی بین کاهش pH و انحلال وجود ندارد (ساباروِ، 1982). در یک پژوهش آلتومار همکاران (1999) توانایی قارچ *تریکودرما هارزیانوم* سویه T-22 را در انحلال سنگ فسفات تحت شرایط آزمایشگاهی بررسی نمودند. این قارچ قادر به انحلال ترکیب کم‌محلول فسفر بود، اما هیچ‌گونه اسید آلی در محیط کشت این ریزجاندار شناسایی نشد. لذا این

1. Acidification
2. Phosphate Solublizing Microorganisms; PSMs

www.SID.ir

Archive of SID

محققین نتیجه‌گیری کردند که مکانیسم اصلی مورد استفاده توسط قارچ مذکور در انحلال تولید اسید آلی نبوده، چون pH محیط‌کشت کاهش قابل ملاحظه‌ای نشان نداد. این پژوهشگران کلات‌سازی و فرایند احیا را به عنوان سازوکار انحلال فسفات معدنی کم‌محلول توسط این قارچ ذکر کردند. در پژوهش حاضر نیز همبستگی معنی‌داری بین کاهش pH محیط‌کشت و میزان انحلال تری کلسیم فسفات وجود نداشت. این یافته نشان می‌دهد که تولید اسید آلی توسط اندوفیت‌های جداسازی شده مکانیسم اصلی و در مورد برخی از جدایه‌ها مکانیسم مورد استفاده نیست.

جدول 3- تجزیه واریانس تأثیر باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از ساقه و برگ گیاهان دارویی ریحان، رزماری، مرزه و پونه بر pH محیط کشت

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		ریحان	رزماری	مرزه	پونه
تیمار	13	7/86**	26/60**	6/30**	9/36**
اشتباه آزمایشی	28	0/013	0/007	0/672	0/182
ضریب تغییرات (CV) (%)		6	16	7	8

**نمایانگر تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

توان تولید سیانیدهیدروژن (HCN)

در این پژوهش همه ریزجانداران مورد مطالعه قادر به تولید سیانید هیدروژن از مقدار کم تا خیلی زیاد بودند (جدول 4). در گیاه ریحان % 30/8 و % 23/1 جدایه‌ها به ترتیب توانایی خیلی بالا و کمی در تولید این متابولیت داشتند. % 46/1 از باکتری‌های اندوفیت مورد مطالعه مقادیر متوسط و زیاد از HCN را تولید نمودند. در اکثر باکتری‌های جداسازی شده از گیاه رزماری (61/5 درصد)، توانایی تولید با درجه متوسط سیانید هیدروژن مشاهده شد. حداقل مقدار تولید متابولیت مزبور در جدایه‌های جداسازی شده از گیاه مرزه و پونه متوسط بود. در جدایه‌های اندوفیت متعلق به این گیاهان، به ترتیب % 61/5 و % 23/1 جدایه‌ها توانمندی خیلی زیاد در تولید سیانید هیدروژن نشان دادند. در مجموع جدایه‌های جداسازی شده از مرزه در مقایسه با جدایه‌های اندوفیت دیگر گیاهان دارویی مورد مطالعه در این تحقیق، توانایی زیادتری در تولید HCN داشتند.

بررسی نتایج حاصل از توانایی تولید آنزیم پروتئاز در باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده نشان داد که همه باکتری‌ها قادر به رشد در محیط کشت اسکیم میلک آگار نبودند. در بین جدایه‌های رشد کرده در محیط مزبور تشکیل هاله شفاف تنها در اطراف کلنی باکتری‌های S_1، S_4، B_9، B_{12}، B_3، B_{11}، R_7، P_6 و P_4 مشاهده شد.

باکتری‌های اندوفیت به‌طور غیرمستقیم و با کنترل عوامل بیمارگر گیاهی موجب تأمین سلامت و افزایش رشد گیاهان مستقر در آن می‌شوند. اولین بار پژوهشگری به نام شیمانوکی (1987) تأثیر اندوفیت‌ها بر قارچ‌های بیمارگر را گزارش نمود. این محقق نشان داد که تلقیح گیاه تیموتی با قارچ *اپیکولی تیفینا* موجب مقاومت این گیاه علفی نسبت به قارچ *کلادوسپوریوم* فلی شد. کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی توسط ریزجانداران اندوفیت توسط محققین مختلف گزارش شده است (آراویند و همکاران، 2009؛ پاتل و همکاران، 2012؛ سئو و همکاران،2010؛ یانگ و همکاران، 2011).

باکتری‌های اندوفیت با تولید متابولیت‌های ضد میکروبی (همچون، آنزیم‌های هیدرولیتیک (سلولاز، پکتیناز، پروتئاز، لامیناریناز)، ترکیبات سمی (سیانید هیدروژن و برخی اسیدهای آلی))، رقابت در جذب عناصر غذایی به‌خصوص آهن و کاهش جذب آن توسط بیمارگر از طریق تولید سیدروفور و اشغال آشیان‌های اکولوژیکی مناسب در گیاه موجب سرکوبی و یا تعدیل اثرات پاتوژن‌های گیاهی می‌شوند. در تحقیق حاضر اکثر جدایه‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاهان داوریی توانایی خوبی در تولید سیانید هیدروژن نشان دادند. همچنین تعداد محدودی از باکتری‌ها از توانایی تولید آنزیم پروتئاز برخوردار بودند. لذا انتظار می‌رود که باکتری‌های مورد ارزیابی در این پژوهش (به‌ویژه جدایه-هایی که از نظرستز هر دو متابولیت ضد میکروبی توانمند

www.SID.ir

Archive of SID

بودند) با محدود کردن رشد باکتری‌ها و قارچ‌های بیمارگر باعث بهبود رشد گیاه مستقر در آن شوند.

جدول 4- توانایی باکتری‌های اندوفیت جداشده از ساقه و برگ گیاهان دارویی ریحان، رزماری، مرزه و پونه در تولید سیانید هیدروژن و تغییر pH محیط کشت

ریحان			رزماری			مرزه			پونه		
جدایه	pH	HCN	جدایه	pH	HCN	جدایه	pH	HCN	جدایه	pH	HCN
B_1	4/81de	1	R_1	4/65c	2	S_1	5/48b	4	P_1	4/47f	3
B_2	4/80de	1	R_2	5/39g	2	S_2	5/29b	4	P_2	5/33c	2
B_3	4/82d	2	R_3	5/43f	1	S_3	6/00c	4	P_3	5/15d	2
B_4	4/70f	2	R_4	4/66i	2	S_4	5/97a	3	P_4	5/55b	3
B_5	4/56g	4	R_5	6/43a	2	S_5	4/98c	2	P_5	4/58f	4
B_6	4/92c	4	R_6	4/41g	3	S_6	4/98c	4	P_6	4/56f	4
B_7	4/98b	2	R_7	5/56e	3	S_7	5/77b	4	P_7	4/44f	4
B_8	4/78e	1	R_8	6/20b	1	S_8	4/75c	2	P_8	5/31c	3
B_9	4/00j	3	R_9	4/10l	2	S_9	4/71c	3	P_9	5/00e	3
B_{10}	4/21i	4	R_{10}	4/71h	2	S_{10}	5/28b	3	P_{10}	4/20g	3
B_{11}	4/59g	4	R_{11}	4/41g	1	S_{11}	5/31b	4	P_{11}	5/29cd	2
B_{12}	4/99b	3	R_{12}	4/21k	2	S_{12}	4/70c	4	P_{12}	4/90e	2
B_{13}	4/31h	3	R_{13}	6/00c	2	S_{13}	4/90c	4	P_{13}	5/21cd	3
شاهد	5/92a	0	شاهد	5/92d	0	شاهد	5/92a	0	شاهد	5/92a	0

اعداد 0، 1، 2، 3 و 4 به ترتیب بیانگر عدم تولید، تولید کم، متوسط، زیاد و خیلی زیاد هیدروژن سیانید توسط جدایه‌های می‌باشد. حروف متفاوت در هر خصوصیت مورد بررسی بیانگر معنی داری در سطح احتمال 5 درصد است.

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های این تحقیق، می‌توان اظهار نمود که باکتری‌های اندوفیت تولیدکننده‌ی متابولیت‌های محرک رشد و سرکوب‌گر عوامل بیمارگر گیاه، از بافت‌ها و اندام‌های ریحان، پونه، رزماری و مرزه قابل جداسازی هستند. تعدادی از جدایه‌های مورد بررسی در آزمایش حاضر، به دلیل تولید مقادیر زیادی ایندول استیک اسید، تـوانمندی قابل توجه در انحلال ترکیب معدنی کم‌محلول فسفر و تولید بالای ترکیبات ضد میکروبی می‌توانند به‌عنوان کود زیستی فسفاته، فزآینده‌ی (محرک) رشد زیستی و آفت‌کش زیستی در زراعت گیاهان مختلف عمل نمایند. پیشنهاد می‌گردد اثرات جدایه‌های برتر این تحقیق بر میزان رشد و عملکرد گیاهان مورد استفاده در این پژوهش و همچنین دیگر گیاهان در شرایط گلخانه و مزرعه بررسی گردد.

فهرست منابع:

1. خسروی پور، ب.، سیاهپوش، ع.ب.، مهمدی کربلایی، ز. 1394. اهمیت کشت گیاهان دارویی و تولید فرآورده‌های آن در کشاورزی، اولین همایش گیاهان دارویی و داروهای گیاهی، تهران، مرکز توسعه پایدار علم و صنعت فرزین.
2. Altomare, C., Norvell, W.A., Borjkman. T. and Harman, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum Rifai* 1295–22. Applied and Environmental Microbiology. 65:2926–2933.
3. Aravind, R., Antony, D., Eapen, S. J., Kumar, A. and Ramana, K.V. 2009. Isolation and Evaluation of Endophytic Bacteria Against Plant Parasitic Nematodes Infesting Black Pepper (*Piper nigrum* L.). Indian Journal of Nematology. 39 (2): 211-217.
4. Bacon, C.W. and White, J.F. Microbial Endophytes; Marcel Dekker Inc.: New York, NY, USA, 2000.

www.SID.ir

Archive of SID

5. Banik, S. 1983. Variation in potentiality of phosphate solubilizingsoil microorganisms with phosphate and energy source. Zentralblatt für Mikrobiologie. 138: 209-216.
6. Barka, E.A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J.C. and Belarbi, A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control. 24: 135-142.
7. Bent, E., Tvzun, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology. 47: 793-800.
8. Cho, K.M., Hong, S.Y. and Lee, S.M. 2007. Endophytic bacterial communities in Ginseng and their antifungal activity against pathogens. Microbial Ecology. 54: 341-351.
9. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M. and Perez, G. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in Chamaecytisus proligerus, a forage tree- shrub legume endemic to the Canary Island. Plant and Soil. 226: 967-978.
10. Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., editors. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed. New York: Spriger; 2005. P . 323-84.
11. Goldstein, A. H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspectives and future prospects. American Journal of Alternative Agriculture. 1:57–65.
12. Hung, P.Q. and Annapurna, K. 2004. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria in Soybean (*Glycine* sp.). Omonrice, 12 (4): 92-101.
13. Hung, P.Q., Kumar, S.M., Govindsamy, V. and Annapurna, K. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. Biology and Fertility of Soils. 44: 155–162.
14. Iniguez, A.L., Dong, Y. and Triplet, E.W. 2004. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumonia* 342. Molecular Plant-Microbe Interactions. 17: 1078-1085.
15. Jha, P.N. and Kumar A. October 2007. Endophytic colonization of *Typha australis* by a plant growth-promoting bacterium *Klebsiella oxytoca* strain GR-3. Journal of Applied Microbiology. 103(4): 1311–1320.
16. Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.J. 2002. Mycorrhization of coriander (*Coriandrum sativum*) to enhance the concentration and quality of essential oil. Journal of the Science of Food and Agriculture. 82 (4): 339- 342
17. Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S.K. and White. J.r. J.F. 2018. Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. Letters in Applied Microbiology. 66 (4): 268-276.
18. Lee, S., Flores-Encarnacion, M., Contreras-Zentella, M., GarciaFlores, L., Escamilla, J.E. and Kennedy, C. 2004. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. Journal of Bacteriology. 186: 5384–5391.
19. Long, H.H., Schmidt, D.D. and Baldwin I.T. 2008. Native bacterial endophytes promote host growth in a species-specific manner; phytohormone manipulations do not result incommon growth responses. Plos One. 3: e2702.
20. Malusa. E., Vassilev, N. 2014. A contribution to set a legal framework for biofertilisers. Applied Microbiology and Biotechnology. 98 (15): 6599–6607.
21. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. and Defago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 with enhanced antibiotic production. Plant Pathology. 44: 40-50.
22. Mazid, M., Khan, T.A. 2015. Future of bio-fertilizers in Indian agriculture: an overview. International Journal of Agricultural and Food Research. 3 (3):10–23.
23. Nair, D.N. and Padmavathy, S. 2014. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. The Scientific World Journal. Volume 2014, Article ID 250693, 11 pages.

www.SID.ir

Archive of SID

24. Patel, H.A., Patel, R.K., Khristi, S.M., Parikh, K. and Rajendran, G. 2012. Isolation and Characterization of Bacterial Endophytes From *Lycopersicon esculentum* Plant and Their Plant Growth Promoting Characteristics. Nepal Journal of Biotechnology. 2(1): 37-52.
25. Raja, D., Sivasankari, B. and Daniel, T. 2008. Bioefficacy of Methylobacterium spp. Isolated from various leaf samples on the growth performance of black gram, (L.) Vigna mungo L. walp. Current science. 12: 735-740.
26. Rodriguez, H.; Gonzalez, T. and Selman, G. 2000. Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. Journal of Biotechnology. 84: 155-161.
27. Ryu, C.M., Farag M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Pare, P.W. and Kloepper, J.W. 2003a. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 100: 4927-4932.
28. Seo, J.H., Leem, J.H., Ha, E.H., Kim, O.J. and Kim, B.M. 2010. Population-attributable risk of low birthweight related to PM10 pollution in seven Korean cities. Paediatric and Perinatal Epidemiology. 24 (2):140–148.
29. Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U. and Wilhelm, E. 2002. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. FEMS Microbiology Ecology. 39: 23-32.
30. Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. and Gobi, T. A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus. 2: 1-14.
31. Shimanuki, H. and Vandenberg, J.D. 1987. Technique for rearing worker honeybees in the laboratoryJournal of Apicultural Research. 26 (2):90–97.
32. Son, H.J.; Park, G.T.; Cha, M.S. and Heo, M.S. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by a novel salt- and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. Bioresource Technology. 97: 204-210.
33. Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. FEMS Microbiology Reviews. 31: 425–448.
34. Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. Australian Journal of Agricultural Research. 9: 778-781.
35. Sturz, A.V., Christie, B.R. and Nowak, J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. CRC Crit. Critical Reviews in Plant Sciences. 19: 1–30.
36. SubbaRao, N.S. 1982. Advances in agricultural microbiology. Oxford and IBH Publications Company, India. pp: 229–305.
37. Surette, M. A., Sturz, A. V., Lada, R. R. and Nowak, J. 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. PLant Soil. 253: 381–390, 2003
38. Tamosiune, I., Baniulis, D. and Stanys, V. 2017. Role of endophytic bacteria in stress tolerance of agricultural plants: Diversity of microorganisms and molecular mechanisms. In: Kumar V, Kumar M, Sharma S, Prasad R (Eds). Probiotics in Agroecosystem. Springer, Singapore pp 26-42.
39. Vendan, R.T., Yu, Y.J., Lee, S.H. and Rhee, Y.H. 2010. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. Journal of Microbiology. 48:559–565.
40. Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advances in Agronomy. 69: 99-151.

www.SID.ir

Archive of SID

41. Yang, C., Zhang, X. and Shi, G. 2011. Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability. African Journal of Microbiology Research. 5(2):131-136.
42. Yasari, E., Patwardhan, A.M., Ghole, V.S., Ghasemi Chapi, O. and Asgarzadeh, A. 2007. Biofertilizers impact on canola (*Brassica napus* L.) seed yield and quality. Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences. 9(3): 701-707.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of plant growth promotion characteristics of endophytic bacteria isolated from leaves and stems of some medicinal plants

A. A. Soltani Toularoud[1], and E. Goli Kalanpa

Associate Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili; E-mail: ali_soltani_t@yahoo.com

Associate Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili; E-mail: goli@uma.ac.ir

Received: June, 2020 & Accepted: October, 2020

Abstract

Medicinal plants have an important role in advancing national, regional and global goals for achieving health, drug self-sufficiency, employment creation and economic development. Since, quality and quantity improving of medicinal plants is aimed therefore it seems that the application of biofertilizers is the most compatible with that purpose. The objectives of this research were to isolate endophytic bacteria from leaves and stems of medicinal plants and to evaluate their growth promoting traits and assess their potential as biofertilizers. Healthy basil, rosemary, savory and pennyroyal plants were collected from area around Ardabil city and transferred to the laboratory. The endophytic bacteria isolated using serial dilution technique on the nutrient agar. Different colonies according to the appearance, color, margin and growth rate were selected, purified and kept at 4 °C. Then, the ability of the isolates to produce Indole Acetic Acid (IAA), solubilization of tricalcium phosphate, hydrogen cyanide and protease were evaluated. In this study, 99 endophytic bacteria were isolated from the medicinal plants. Finally, According to the morphological properties and growth rate, 53 different isolates (13 isolates from each plant) were selected. Results revealed that all the endophytic bacteria were able to produce IAA at 100 mg l^{-1} L-tryptophan. The most potent bacteria in terms of IAA production were P_4, P_3 and B_1 isolates (with production of 15.31 mg l^{-1}, 11.55 mg l^{-1} and 12.97 mg l^{-1}, respectively). All of the examined isolates had the ability to dissolve tricalcium phosphate. The highest ability of solubility (646.52 mg l^{-1}) was observed in S_5 isolated from Savory. The bacteria isolated from Rosemary had the lowest ability to dissolve tricalcium phosphate. All bacterial isolates were able to produce hydrogen cyanide. In assessing the ability of isolated endophytic bacteria to produce protease enzyme, clear zone formation was observed only around the colonies of S_1, S_4, B_9, B_{12}, B_3, B_{11}, R_7, P_6 and P_4. It is suggested that the effects of superior isolates on growth and yield of medicinal plants used in this study should be investigated in greenhouse and field conditions before any recommendation.

Keywords: Indole acetic acid, Phosphorus, Hydrogen cyanide, Protease, Biofertilizer

[1]. Corresponding author: Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil.

www.SID.ir