بررسی توانایی تولید هورمونهای محرک رشد جیبرلین و ایندول اسید استیک در باکتریهای اندوفیت *Pseudomonas fluorescence* در سویا رقم L17

فایقه اطمینانی* و ادیبه اطمینانی

سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان

تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۷

ONLINE FIRST

چکیده

باکتریهای اندوفیت قادرند بدون اینکه علائم مشخصی داشته باشند، برای مدتهای مدید در بافت داخلی گیاه میزبان حضور داشته باشند. این گروه از میکروارگانیسم‌ها به عنوان باکتریهای محرک رشد در بیشتر موارد گزارش شده‌اند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی باکتری اندوفیت در سویا رقم L17 انجام پذیرفته است. در این تحقیق باکتری اندوفیت سودوموناس فلورسنس از بخشهای مختلف برگ، ساقه، دانه و ریشه سویا رقم L17 به کمک آزمونهای مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از پرایمر اختصاصی ژن *16S rDNA* شناسایی گردید. سویه‌ها از نظر تولید هورمون ایندول اسید استیک در غیاب تریپتوفان و هم در حضور تریپتوفان و همچنین توانایی تولید جیبرلین به صورت آماری در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. عملیات آماری شامل تجزیه واریانس داده‌ها و مقایسه میانگینها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن با نرم‌افزار آماری SAS انجام شد. نتایج مقایسه میانگین سویه‌های سودوموناس فلورسنس بررسی شده در این تحقیق قادر به تولید هورمون ایندول اسید استیک در حضور تریپتوفان در مقادیر۲۶/۷۶ تا ۵۱/۱۷ و در غیاب تریپتوفان در محدوده ۲۰/۰۳ تا ۴۵/۳۳ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. سویه‌های مورد مطالعه قادر به تولید هورمون جیبرلین در مقادیر ۱۲/۹۷ تا ۱۷/۱۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. این مطالعه اولین گزارش برای جداسازی باکتری اندوفیت سودوموناس فلورسنس با توانایی تولید ترکیبات محرک رشد در گیاه سویا رقم L17 می‌باشد که می‌تواند به عنوان مایه تلقیح در افزایش رشد گیاه و کنترل عوامل بیماری‌زا به کار رود.

واژه های کلیدی: اندوفیت، سودوموناس فلورسنس، سویا

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۷۷۲۶۷۷۰، پست الکترونیکی: agriculture.student@yahoo.com

مقدمه

باکتریهای اندوفیت به باکتریهایی گفته می‌شوند که در داخل بافت گیاه سالم، بدون ایجاد علائم و آسیب حضور دارند (۳۰). باکتریهای اندوفیت از ریشه، برگ، ساقه، بذر، غده، گل‌آذین و میوه‌های گیاهان مختلف جدا شده‌اند (۸). باکتری‌های اندوفیت با حفظ بقای خود در گیاه میزبان معمولاً نه تنها زیانی به میزبان نمی‌رسانند بلکه با کمک سازوکارهای مختلف سبب افزایش رشد گیاهان می‌گردند (۱۵ و ۱۶). این دسته از ریزموجودات قادر به افزایش عملکرد گیاهان زراعی از راههای مختلف همچون تثبیت ازت (۳، ۷ و ۳۶)، حل فسفات (۱۴ و ۲۳)، تولید سیدروفور (۳۱)، تولید هورمونهای رشد اکسین و جیبرلین (۹، ۲۲ و ۳۵)، توانایی کنترل زیستی ریزموجودات بیمارگر (۳۸) و افزایش مقاومت گیاهان به تنشهای غیرزیستی و زیستی (۳۴) می‌باشند. باکتریهای جنس *Pseudomonas* به طور وسیعی در طبیعت گسترش پیدا کرده‌اند و می‌توانند از بیشتر محیطها جدا شوند (۲). باکتریهای مذکور از لحاظ طیف متنوع متابولیتهای محرک رشد گیاهی از جمله تولید سیانید هیدروژن (۲۹) تولید سیدروفور (۱۷) حل‌کنندگی

Archive of SID

www.SID.ir

فسفات (۲۵) و تولید اکسین (۲۱) حائز اهمیتند. اومامهسواری و همکاران (۲۰۱۳) این جنس را به عنوان باکتری اندوفیت محرک رشد در گیاهان زراعی معرفی نمودند (۳۵). احمدزاده (۱۳۹۲) (۱) نشان داد که باکتریهای *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas putida* در کاج و باکتری *Pseudomonas aureofaciens* در نراد قادر به افزایش ارتفاع و زیست‌توده گیاه می‌گردند باکتری اندوفیت *Pseudomonas* در آرابیدوپسیس شناسایی گردیدند (۲۰). در بررسی انجام شده توسط بنت و همکاران (۲۰۰۱) مشخص شد که *Pseudomonas fluorescens* توانایی تولید مقادیر متغیری از اکسین در حضور غلظتهای مختلف ال-تریپتوفان و عدم حضور آن را دارند (۵). مطالعات سلطانی طولارود و همکاران (۲۰۰۸) بر روی میزان تولید اکسین ۲۵ جدایه *Pseudomonas fluorescens* نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید اکسین را دارند و متوسط میزان تولید ۲/۴۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر و دامنه آن از۱/۳ تا ۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود (۳۲). خاکی‌پور و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که ۷۲ درصد از سویه‌های *Pseudomonas* توانایی تولید ترکیبات اکسین را دارا هستند (۱۲). اوما مهسواری و همکاران (۲۰۱۳) سویه‌های از *Pseudomonas* با قابلیت تولید اندول استیک اسید را جداسازی نمودند که این سویه‌ها قادر به تولید بیشترین مقدار ۴/۵۶ و کمترین آن ۱/۹۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (۳۵). باکتری اندوفیت سودوموناس شناسایی شده از پنبه قادر به تولید ۲/۸۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندول استیک اسید در حضور تریپتوفان شدند (۱۸). سویا از جمله گیاهان زراعی محسوب می‌شود که به خانواده بقولات تعلق دارد. عملکرد این محصول زراعی به دلیل اهمیت اقتصادی آن در تولید روغن و کاربرد آن به عنوان علوفه و کود سبز به دلیل تولید روغن، و کاربرد آن به عنوان علوفه و کود سبز مورد توجه کشاورزان قرار دارد. این محصول، غنی از ترکیبات پروتئینی و اسید چرب غنی است و همین امر آن را مستعد ابتلاء به بیماریها و آفات نموده است و از عملکرد آن در مزارع به میزان قابل توجهی کاسته است. لذا برای حل این مشکل، در این پژوهش تلاش گردیده است تا باکتریهای اندوفیت با توانایی تولید ترکیبات محرک رشد همانند هورمون ایندول اسید استیک و جیبرلین شناسایی گردند، بدین امید که بتوانند به عنوان مایه تلقیح، پس از آزمایشهای گلخانه ای و مزرعه ای به کار گرفته شوند (۴۰).

مواد و روشها

نمونه‌برداری، ضدعفونی بافت گیاهی و جداسازی باکتری اندوفیت: در اواخر تابستان سال ۱۳۹۳ نمونه‌برداری از بخشهای مختلف بافت گیاهی (برگ، ساقه، ریشه و دانه) سویا رقم *L17* از مزرعه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج انجام پذیرفت. به منظور جداسازی باکتریهای اندوفیت بخشهای مختلف شامل برگ، ساقه، بذر و ریشه با آب مقطر سترون شسته شد، پس از خشک کردن با کاغذ صافی، نمونه‌های مورد نظر به قطعات کوچک‌تر ۳ ×۲/۵ سانتیمتری خرد گردید سپس توسط هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ۴ دقیقه شستشو داده شد و برای حذف ماده ضدعفونی‌کننده، داخل آب مقطر سترون ۴ تا ۵ بار خیسانده شد. برای جداسازی باکتری اندوفیت لازم بود که نمونه‌های گیاهی سترون شده، به کمک هاون و دسته هاون سترون در ۳۰۰ میکرولیتر آب مقطر کاملاً له شود. بعد از ۳۰ دقیقه از سوسپانسیون حاصل به مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته و روی چهار محیط کشت مختلف (Nutrient agar with sucrose) *NA+S*، (Nutrient agar) *NA*، (Lysogeny broth) *LB* و (King's medium B) *KB* به کمک لوپ شیشه‌ای در تمام سطح پخش گردید، پتریها به مدت ۱۴ روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و هر روز از کلنیهای

Archive of SID

www.SID.ir

جدید انتخاب و به عنوان جدایه‌های پایه برای آزمایشهای بعدی در نظر گرفته شدند (۱۰).

ارزیابی روش ضدعفونی سطح بافت گیاهی: به منظور اطمینان از سترون شدن، قطعاتی از بافت گیاهی که به روش مذکور ضدعفونی شده بودند در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شستشو داده شدند و بعد از گذشت چند دقیقه، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون، روی هر چهار محیط کشت*S+NA*،*NA*، *LB* و *KB* به کمک لوپ شیشه‌ای در تمام سطح پخش گردید و در انکوباتور مدل *JS Research Inc* با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

شناسایی باکتریهای اندوفیت: تعیین خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها: به منظور بررسی آزمونهای کاتالاز، اکسیداز، گرم و تولید رنگدانه فلورسنت از روش متداول در باکتری‌شناسی گیاهی استفاده شد (۲۸).

جداسازی *DNA* کروموزومی باکتریها: باکتری در محیط کشت مایع نوترینت براث کشت داده شد و بعد از رشد به میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری منتقل و با سرعت ۳۰۰۰ دور به مدت ۱/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر، در ۲۰۰ میکرولیتر بافر *TE* حل گردید. نمونه‌ها پس از اضافه نمودن ۸ میکرولیتر لیزوزیم (از محلول پایه ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس ۴۰ میکرولیتر سدیم پرکلرات ۴ مولار، ۲۴ میکرولیتر *SDS*(*Sodium dodecyl sulfate*) *10%* و ۸ میکرولیتر پروتئیناز *K*(Proteinase K) (از غلظت پایه ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول اضافه و بعد از همزدن (وارونه کردن) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به محلول به دست آمده در مرحله قبل، ۲ حجم اتانول خالص (نگهداری شده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه یا بیشتر در فریزر نگهداری گردید.

محلول به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، اتانول دور ریخته شد و رسوب حاصله با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله چند ثانیه در محیط معمولی اتاق نگهداری شد تا خشک گردد سپس، در ۵۰۰ میکرولیتر بافر *TE* حل گردید.

*DNA*به دست آمده با حجم مساوی ترکیب فنل: کلروفرم: آیزوآمیل الکل (*Phenol:Chloroform:Isoamyl*Alcohol) (۱:۲۴:۲۵) مخلوط شده و در درجه حرارت معمولی اتاق به صورت وارونه کردن همزده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. سپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا سه فاز مجزا تشکیل گردد. فاز رویی به میکروتیوب تمیز و سترون منتقل و مرحله قبل ۳ بار تکرار شد. در هر بار محلول رویی به میکروتیوب سترون منتقل گردید. محلول رویی یک بار نیز با اضافه نمودن کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) رسوب داده شد. محلول رویی به میکروتیوب سترون منتقل و *DNA* با اضافه نمودن ۲ حجم اتانول خالص و ۰/۱ درصد حجم محلول استات سدیم ۳ مولار با PH= 4.8 و سپس نگهداری در فریزر به مدت یک شب، رسوب داده شد. ترکیب به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور رسوب حاصله پس از خشک شدن در ۵۰ میکرولیتر بافر *TE* حاوی (ریبونوکلئاز (*Ribonuclease*) از محلول پایه ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به غلظت نهائی ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) حل گردید (۲۷).

تعیین کیفیت و کمیت *DNA* استخراجی: برای تعیین کمیت و کیفیت *DNA* از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد.

اندازه‌گیری غلظت *DNA* توسط اسپکتروفتومتر: قبل از اندازه‌گیری غلظت *DNA* نمونه‌ها، دستگاه اسپکتروفتومتر کالیبره شد. این کار توسط بافر *TE* یا آب مقطر دوبار سترون در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر صورت گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

برای انجام این‌کار ۴۵ میکرولیتر از بافر *TE* یا آب مقطر به محفظه ویژه اسپکتوفتومتر (کوت) اضافه و سپس در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ کالیبره شد. پس از آن ۲ میکرولیتر از نمونه *DNA* به آن اضافه و میزان جذب نوری (*OD*) اندازه‌گیری شد. در صورتی که نسبت *۲۶۰OD/۲۸۰OD* حدود ۲–۱/۸ بود، نشان‌دهنده کیفیت بالای *DNA* است و *DNA* از کیفیت مطلوبی برای *PCR* برخوردار است. نسبت کمتر از ۱/۶ نمایانگر حضور پروتئین و سایر آلودگیها می‌باشد. نسبتهای بالاتر از ۱/۸ نشان‌دهنده وجود اسیدهای نوکلئیک است. نسبتهای بالاتر از ۲ نشان‌دهنده آلودگی نمونه به *RNA* است. جهت اطمینان بیشتر می‌توان با روش الکتروفورز *DNA* در ژل آگارز کیفیت و غلظت *DNA* را تعیین کرد.

تعیین کیفیت *DNA* توسط ژل آگارز: کیفیت *DNA* با مشاهده شکل باندها مورد بررسی قرار گرفت. وجود باندهای کاملاً تیز، و بدون کمترین کشیدگی حاکی از کیفیت مناسب می‌باشد. وجود کشیدگی در فاصله بین چاهک و باندها حاکی از آلودگی پروتئینی در نمونه‌ها می‌باشد. وجود یک باند اضافی در پایین ژل و در فاصله‌ای زیاد از باند اصلی حاکی از وجود *RNA* در نمونه‌ها است (۳۹).

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (*PCR*): به منظور شناسایی جدایه‌ها از آزمون *Polymerase chain reaction DNA* استفاده گردید تعیین توالی اختصاصی ژن*16S rDNA* با کمک جفت آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس (*Rp1*و *Fd2*) انجام پذیرفت (جدول ۱). سپس محصول *PCR* در ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی گردیدند. و باندها توسط دستگاه *White/ultra violet transilluminator* مدل *Uvitek* کشور انگلستان مشاهده و عکس‌برداری شد. پس از اطمینان از صحت انجام پی‌سی‌آر و عدم وجود آلودگی از طریق الکتروفورز محصولات، سویه‌های مورد نظر جهت تعیین توالی به همراه آغازگرهای رفت و برگشت به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. به کمک توالیهای دو رشته رفت و برگشت و با استفاده از نرم‌افزار*BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0* تطبیق توالیها انجام پذیرفت، سپس توالی توافقی با سایر توالیهای موجود در سایت *NCBI*، مقایسه گردید (۳۹). سانتریفیوژ گردید و رسوب به دست آمده توسط اتانول ۷۰ درصد شسته شد.

جدول۱– آغازگرهای مورد استفاده

نام آغازگرها	توالی آغازگر	قطعه مورد انتظار
Rp 1	*5-AGAGTTTGATCATGGCTCA-G*	*Kb1/5*
Fd 2	*5-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3*	

آزمون تولید ایندول اسید استیک: سویه‌های باکتری در ۲۰ میکرولیتر نوترینت براث در دو حالت (در غیاب و یا به همراه ۰/۲ درصد حجمی ال–تریپتوفان) به مدت ۱۰ روز روی شیکر(مدل *JS Research Inc*) با سرعت ۲۰۰*rpm* در دمای اتاق نگهداری گردید. پس از آن جهت اطمینان از رشد باکتری، با نمونه شاهد مقایسه شد. و بعد از سانتریفیوژ نمودن با سرعت ۵۳۰۰ دور به مدت ۱۲ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی انتخاب شد و به آن ۲ میلی‌لیتر معرف سالکواسکی اضافه گردید بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در اتاق تاریک برخی از سویه‌های باکتری موجب تغییر رنگ محیط گردید. تغییر رنگ نمونه‌ها به قرمز، نشان از حضور ایندول اسید استیک است و برای تعیین میزان

Archive of SID

www.SID.ir

ایندول اسید استیک بعد از کالیبره نمودن دستگاه اسپکتروفتومتری(*Labomed* مدل*uv-3200*، ساخت آمریکا) با محلول حاوی ۱ میلی‌لیتر از محیط نوترینت براث سترون به همراه ۲ میلی‌لیتر معرف سالکوسکی مقدار *OD* جدایه‌ها در ۵۳۰ نانومتر ثبت گردید (۲۴).

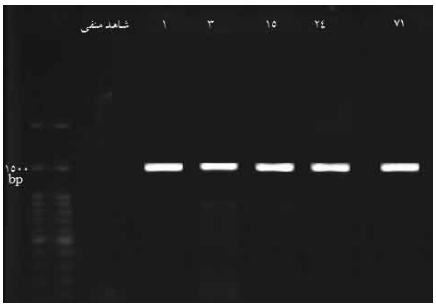
آزمون تولید جیبرلین (*Gibberellin*): سویه‌های باکتری در محیط جنسن براث به مدت ۵ روز به کمک شیکر با (مدل *JS Research Inc*) با سرعت ۲۰۰*rpm* در دمای اتاق نگهداری شد. سپس با سرعت ۵۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی به قیف جداکننده منتقل شد، بعد با اضافه نمودن ۱۰ میلی‌لیتر آب با اسیدیته ۱-۲، ۲۰ میلی‌لیتر اتیل‌استات به مدت ۶۰ ثانیه تکان داده شد تا کاملاً ترکیب شده و دو فاز تشکیل دهد. سپس فاز رویی انتخاب و ۳ بار مراحل قبلی تکرار گردید و ۲۰، ۱۵ و ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات در سه نوبت به آن اضافه شد. در نهایت میزان جیبرلین به کمک دستگاه اسپکتروفتومتری (*Labomed* مدل*uv-3200*، ساخت آمریکا) با طول موج ۲۵۴ نانومتر ثبت گردید (۹).

آنالیز آماری داده‌ها: داده‌های به دست آمده برای هر متغیر، در صورت نرمال نبودن با استفاده از تبدیل آنها به داده‌های مناسب، نرمال گردید سپس داده‌های گردآوری شده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. عملیات آماری شامل تجزیه واریانس داده‌ها، مقایسه میانگینها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن (*Duncan*) با استفاده از نرم افزار آماری *SAS* انجام گردید و برای ترسیم شکلها از نرم افزار *Excel* استفاده شد.

نتایج

از بین سویه‌های باکتریایی، ۵ سویه شامل سودوموناس فلورسنس بود که در این میان *1* سویه از برگ، *2* سویه از ریشه، ۱ سویه از دانه، *1* سویه از ساقه‌های مختلف سویا رقم *L17* جداسازی گردید.

نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی: نتایج تعیین توالی ژن *SrDNA16* به کمک جفت آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس (*Rp1* و *Fd2*) و تطبیق دو رشته رفت و برگشت با استفاده از نرم افزار *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0* انجام پذیرفت. توالیهای به دست آمده با توالیهای موجود در *NCBI* مقایسه شد. نتایج نشان داد که سویه‌های شناسایی شده با قرابت ۹۹ درصد سودوموناس فلورسنس (*Pseudomonas fluorescence*) هستند (شکل ۱).



شکل ۱- نقوش الکتروفورزی محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد

تولید هورمون ایندول اسید استیک: در بعضی مطالعات برای بررسی توانایی تولید ایندول اسید استیک از پیش ماده‌های مختلفی همچون تریپتوفان، تریپتامین، ایندول ۳ پیرویک اسید و ایندول ۳ استامید استفاده گردیده است در پژوهش حاضر از تریپتوفان به عنوان پیش ماده در تولید ایندول اسید استیک استفاده شده است. حضور تریپتوفان منجر به افزایش توانایی تولید هورمون ایندول اسید استیک گردید. میزان هورمون ایندول اسید استیک در ۵ سویه باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان تولید هورمون ایندول اسید استیک در حضور تریپتوفان مربوط به سویه ۵ با مقدار ۵۱/۱۷ و کمترین آن مربوط به سویه ۳ با مقدار ۲۶/۷۶ میکروگرم در میلی‌لیتر که به ترتیب در شکل ۲ و جدول (۲) ملاحظه می گردد. نتایج تجزیه واریانس جدول (۳) نشان می‌دهد بین تیمارها از نظر میزان اکسین، اکسین و تریپتوفان در سطوح ۱ و ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد.

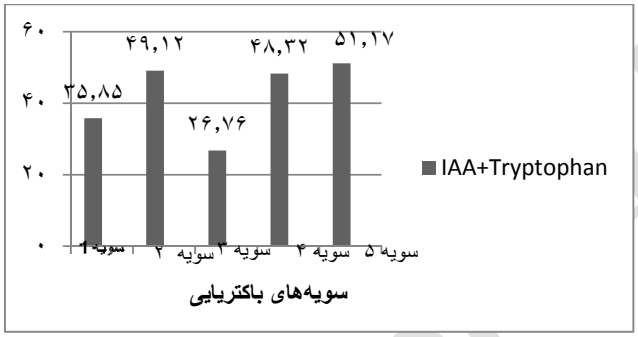
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر اکسین، اکسین +تریپتوفان در بین سویه‌های باکتریایی اندوفیت در سویا رقم *L17*

عوامل آزمایش	میزان اکسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	میزان اکسین + تریپتوفان (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
سویه ۱	۲۹/۲۰*b*	۳۵/۸۵*b*
سویه ۲	۴۳/۱۷*a*	۴۹/۱۲*a*
سویه ۳	۲۰/۰۳*c*	۲۶/۷۶*c*
سویه ۴	۴۴/۲۹*a*	۴۸/۳۲*a*
سویه ۵	۴۵/۳۳*a*	۵۱/۱۷*a*

*اعداد هر گروه در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.



شکل ۲ – مقایسه میانگینهای تیمارهای آزمایش از نظر تولید ایندول اسید استیک و تریپتوفان

جدول ۳ – نتایج تجزیه واریانس اثر میزان اکسین، اکسین+ تریپتوفان در بین سویه‌های باکتریهای اندوفیت سویا

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		اکسین	اکسین+ ال- تریپتوفان
اثر تیمار	۴	۳۸۰/۶۱۰*	۳۳۳/۳۷۷*
خطای آزمایشی	۱۰	۱۹/۵۵	۱۸/۹۶
کل	۱۴		
cv		۱۲/۱۴	۱۰/۳۰

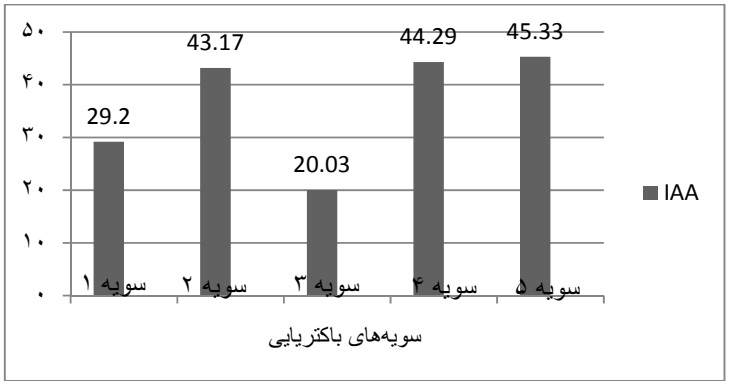
*به مفهوم معنی دار بودن در سطوح احتمال ۵ درصد

نتایج مقایسه میانگین اثر اکسین، در جدول (۱) حاکی از آن است که بین سویه‌ها از نظر میزان تولید اکسین اختلاف معنی‌داری وجود دارد که بیشترین میزان تولید اکسین مربوط به سویه ۵ با مقدار ۴۵/۳۳ و کمترین آن متعلق به سویه ۳ با مقدار ۲۰/۰۳ می‌باشد. میزان توانایی تولید ایندول اسید استیک در تمام سویه‌ها در شکل (۳) نیز قابل ملاحظه است.

نتایج تجزیه واریانس اثر میزان جیبرلین بر سویه‌های باکتریهای اندوفیت در جدول (۴) نشان می‌دهد که بین تیمارها از نظر توانایی تولید جیبرلین در سطح ۱ درصد و ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوری که در جدول (۵) و شکل (۴) مقادیر تولید جیبرلین در بین تیمارها قابل ملاحظه است. نتایج مقایسه میانگین نشان می‌دهد که بیشترین میزان توانایی تولید هورمون جیبرلین مربوط به سویه ۱ با مقدار ۱۷/۱۵ و کمترین میزان تولید هورمون جیبرلین مربوط به سویه ۳ با مقدار ۱۲/۹۷ می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۳- مقایسه میانگینهای تیمارهای آزمایش از نظر تولید ایندول اسید استیک

جدول۴- نتایج تجزیه واریانس اثر میزان جیبرلین، جیبرلین + تریپتوفان بر سویه‌های باکتریهای اندوفیت

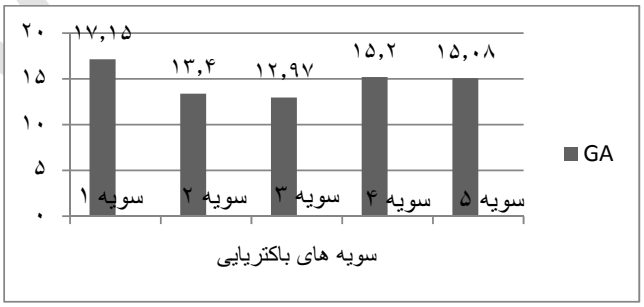
		میانگین مربعات
منابع تغییرات	درجه آزادی	جیبرلین
اثر تیمار	۴	۸/۳۰*
خطای آزمایشی	۱۰	۰/۰۷
کل	۱۴	
ضریب تغییرات		۱/۸۳

* به مفهوم معنی دار در سطوح احتمال ۵ درصد

جدول ۵ – مقایسه میانگین اثر جیبرلین در بین سویه‌های باکتریایی اندوفیت در سویا

عوامل آزمایش	میزان جیبرلین
سویه ۱	۱۷/۱۵*a*
سویه ۲	۱۳/۴۰*c*
سویه ۳	۱۲/۹۷*c*
سویه ۴	۱۵/۲۰*b*
سویه ۵	۱۵/۰۸*b*

*اعداد هر گروه در هر ستون که دارای حروف مشابه هستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد دارای تفاوت معنی‌دار نمی‌باشند.



شکل ۴ – مقایسه میانگینهای تیمارهای آزمایش از نظر تولید جیبرلین

بحث

باکتریها می توانند با کمک مکانیسمهای مختلف قادر به بهبود رشد گیاهان شوند (۴). سودوموناس‌ها از مهم‌ترین باکتریهای اندوفیت هستند که به دلیل توانایی بالای آنها در رقابت با سایر ریزجانداران برای عناصر غذایی و سازگاری سریع با شرایط محیطی مختلف، در بیشتر محیطها مشاهده

Archive of SID

www.SID.ir

می‌شوند (۳۷). مؤثرترین گروه از سودوموناس‌ها، سودوموناس‌های فلورسنس هستند که به دلیل خصوصیات متابولیکی و عملکردی متنوع، نقش بارزی در سلامت خاک ایفاء می‌کنند (۲۶). باقری (*Bagheri*) و همکاران (۱۳۹۵) (۴) هم باکتری سودوموناس فلورسنس را به عنوان باکتری مهم بیوکنترل معرفی نموده‌اند. آنها دریافتند که عصاره، سوسپانسیون و ترکیبات فرار باکتری موجب کاهش ۳۵، ۲۵ و ۸۵ درصدی تفریخ تخم نماند *Meloidogyne javanica* گردید. آنها همچنین ثابت نمودند باکتریهای مذکور قادر به افزایش رشد گیاهان در شرایط گلخانه‌ای هستند (۴). یکی از خصوصیات بارز باکتریهای سودوموناس فلورسنس تولید هورمونهای گیاهی است. از مهم‌ترین هورمونهای گیاهی که بر رشد و توسعه گیاه مؤثرند، اکسین و جیبرلین است (۳۳). اکسین که از معمول‌ترین پیش‌ماده‌های آن اندول اسید استیک است، از هورمونهای گیاهی ضروری برای رشد و توسعه مورفولوژیکی از جمله (طویل شدن سلول، حفظ غالبیت انتهایی، کمک به تشکیل بافت‌های آوندی) است. اندول اسید استیک در غلظتهای پایین قادر به ممانعت از سنتز اتیلن می‌گردد. این در حالی است که غلظتهای بالا در افزایش سنتز اتیلن نقش دارد. بسیاری از باکتریهای اندوفیت قادر به تولید اندول اسید استیک در گیاه میزبان هستند و تولید آن در بهبود افزایش رشد ریشه در گیاهان مختلفی از جمله سویا، سیب‌زمینی، ارکیده، توت‌فرنگی و بسیاری از درختان به اثبات رسیده است. باکتریهای اندوفیت متعلق به جنسهای مختلف مانند *Erwinia*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Flavobacterium* قادر به سنتز اندول اسید استیک هستند (۵). در بررسی انجام شده توسط بنت (*Bent*)و همکاران (۲۰۰۱) مشخص شد که سودوموناس فلورسنس (*Pseudomonas fluorescens*) توانایی تولید مقادیر متغیری از اکسین در حضور غلظتهای مختلف ال-تریپتوفان و عدم حضور آن را دارند (۵). مطالعات سلطانی طولارود (*SoltaniTolarood*) و همکاران (۲۰۰۸) بر روی میزان تولید اکسین ۲۵ جدایهسودوموناس فلورسنس (*Pseudomonas fluorescens*) نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید اکسین را دارند و متوسط میزان تولید ۲/۴۴ میکروگرم در میلی‌لیتر و دامنه آن از۱/۳ تا ۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود (۳۲). خاکی‌پور (*Khakipour*)و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که ۷۲ درصد از سویه‌های سودوموناس (*Pseudomonas*) توانایی تولید ترکیبات اکسین را دارا هستند (۱۲). اومامهسواری (*UmaMaheswari*) و همکاران (۲۰۱۳) سویه‌های از سودوموناس (*Pseudomonas*) با قابلیت تولید اندول استیک اسید را جداسازی نمودند که این سویه‌ها قادر به تولید بیشترین مقدار ۴/۵۶ و کمترین آن ۱/۹۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (۳۵). باکتری اندوفیت سودوموناس *Pseudomonas* شناسایی شده از پنبه قادر به تولید ۲/۸۴ میکروگرم در میلی‌لیتر اندول استیک اسید در حضور تریپتوفان شد. در مطالعه حاضر، بیشترین مقایسه توانایی تولید میزان اکسین در حضور تریپتوفان مربوط به سویه ۵ با مقدار ۵۱/۱۷ و کمترین متعلق به سویه ۳ با مقدار ۲۶/۷۶ است. جیبرلین یکی دیگر از هورمونهای گیاهی است که نقش مهمی در رشد و نمو گیاهان ایفاء می‌کند. این هورمون برای اولین بار در سال ۱۹۲۰ توسط ژاپنیها کشف شده بود. کشاورزان ژاپنی از دیرباز با یک بیماری قارچی که به آن در زبان ژاپنی باکانه یا گیاهچه ابله گفته می‌شود، آشنا بودند در اثر این بیماری ارتفاع گیاه به میزان غیرعادی افزایش می‌یابد اما در نهایت دانه‌ای تولید نمی‌شود. متخصصان گیاه‌پزشکی دریافتند که این نشانه‌ها در برنج، ناشی از یک یا چند ماده شیمیایی از جمله جیبرلاست (اوگا). جیبرلین موجب افزایش رشد گیاه می‌گردد اما یکی از مشخصه‌های کلیدی آن تأثیر بر افزیش طول ساقه است. جیبرلین در رشد زایشی، ظهور گل در گیاه، تولید میوه و به تأخیر انداختن پیری در گیاهان نقش به سزایی دارد (۶ و ۱۱). گزارش شده است که این هورمون در رشد و جوانه‌زنی بذور، کمک به تشکیل غده و

Archive of SID

www.SID.ir

پیاز نقش ایفاء می‌نماید. همچنین با تحریک تشکیل آنزیمهای هیدرولیتیک، شکستن خواب زمستانی را تسهیل می‌کند. تعداد جیبرلینهای شناخته شده اکنون بیش از ۱۰۰ عدد است (۱۳). طبق مطالعات بوتینی و همکاران (۲۰۰۴) باکتریهای اندوفیت متعلق به جنسهای مختلف از قبیل *Azospirillium*، *Gluconacetobacter* و *Herbaspirillum* قادر به تولید هورمون جیبرلین در میزبان خود هستند. باکتری *Pantoeaagglomerans* قادر به تولید هم‌زمان هورمونهای گیاهی آبسیزیک اسید، جیبرلین، سیتوکینین و اندول اسید استیک است. اگر چه در ارتباط با توانایی باکتریهای اندوفیت از نظر میزان تولید جیبرلین، مطالعات زیادی صورت نگرفته‌است، اما گزارش‌ها و تحقیقات دانشمندان مختلف همچون بوتینی (*Bottini*) و همکاران (۱۹۸۹) نقش باکتریهای اندوفیت را در تولید هورمون جیبرلین به خوبی ثابت می‌کند. تحقیقات خان و همکاران (۲۰۱۴) حاکی از آن بود که تولید جیبرلین در باکتری اسفینگوموناس (*Sphingomonassp Lk_{11}*) به میزان معنی‌داری بیش از باکتری بورخولدریا سپاسیا (*B.cepacia SE_4*) است. ریزو باکتریهائی همچون ریزوبیوم فاسئولی (*Rhizobium phaseoli*) قادر به تولید هورمونهای مشابه با جیبرلین همچون GA_9 وGA_{20} و ایندول اسید استیک در محیط کشت می‌باشد. استرین‌های دیگری از جمله باسیلوس پومیلوس (*Bacillus pumilus*) و باسیلوس لیچنی (*B. Licheni*)، باسیلوس سرئوس (*B.Cerus*) باسیلوس مایکرویدس، (*B.macroides*) و باسیلوس پومیلوس (*B.Pumilus*) قادر به تولید هورمون جیبرلین هستند (۱۲). جو (*Joo*) و همکاران (۲۰۰۴) برای اولین بار در مطالعات خود ثابت نمودند که باکتریهای باسیلوس سرئوس (*Bacillus cereus*)، باسیلوس مایکرویدس (*Bacillus. Macroides*) و باسیلوس پومیلوس (*B. Pumilus*) قادر به تولید انواع متفاوتی از هورمون جیبرلین از جمله GA_5، GA_8، GA_{34}، GA_{44}، GA_{53}هستند. به علاوه باکتری ازتوباکتر کروکوسئوم *Azotobacter chroococeum* و باکتری بورخولدریا سپاسیا (*B.cepacia*) قادر به تولید جیبرلین می‌باشند (۱۳). اومامهسواری (*UmaMaheswari*) و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند باکتریهای سودوموناس (*Pseudomonas*) قادر به تولید هورمون اسید جیبرلیک هستند که بیشترین مقدار آن ۲/۶۴ و کمترین مقدار ۰/۸۳ بود. اوتینو (*Oteino*) و همکاران (۲۰۱۵) بیان نمودند که باکتری سودوموناس (*Pseudomonas*) قادر به تولید مقادیر ۱۴ تا ۱۶۹ میلی‌مولار اسید جیبرلیک است. در مطالعه حاضر مقایسه میانگین تیمارها، نشان می‌دهد که بیشترین توانایی تولید هورمون جیبرلین متعلق به سویه ۱ با مقدار ۱۷/۱۵ و کمترین آن مربوط به سویه ۳ با مقدار ۱۲/۹۷ است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، باکتریهای اندوفیت سودوموناس فلورسنس جداسازی شده از این تحقیق در تولید هورمونهای محرک رشد جیبرلین و اکسین موفق عمل نموده است و می‌توان با تکمیل مطالعات در گلخانه و شرایط مزرعه از این سویه‌ها برای تهیه مایه تلقیح و بهبود رشد گیاهان مختلف از جمله سویا استفاده نمود.

منابع

1. Ahmadzadeh, M. (2013), Biological control of plant diseases plant probiotic bacteria.Tehran publication, 474Pp.
2. Alexander, D.B., Zuberer, D. (1993), Responses by iron- efficient oat cultivation with siderophore producing bacteria in a calcareous soil. Biology and Fertility of Soils. 16: 118-124.
3. Ashraf, M.A., Rasool, M., Mirza, M.S. (2011), Nitrogen fixation and indole acetic acid production potential of bacteria isolated from rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). Advances in Biological Research. 5: 348-355.
4. Bagheri, N., Ahmadzadeh, M., Afsharmanesh, H., Saberbaghban, Z. (2016), Assessment of

Archive of SID

www.SID.ir

molecular and biological properties of Pseudomonas fluorescens UTPF5 biological agent of Meloidogyne javanica in tomat. J. cell Molecul Research, 29(1):15-32

5. Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C.P., Enebak, S. (2001), Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology. 47: 793-800.

6. Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P. (1989), Identification of gibberellins A_1.A_3 and iso-A_3 in cultures of *Azospirillumlipoferum*.Plant Physiol. 90: 45-47.

7. Cocking, E.C. (2003), Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria. Plant and Soil. 252: 169-175.

8. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F., Kloepper, J.W. (1997), Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology. 43: 895-914.

9. Hidayati, U., Chaniago, I.A., Munif, A., Andreas Santosa, S., Andreas Santosa, S. (2014), Potency of plant growth promoting endophytic bacteria from rubber plants (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). Journal of Agronomy. 13: 147-152.

10. Jasim, B., Joseph, A.A., John, C.J., Mathew, J., Radhakrishnan,E.K. (2014), Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of Zingiberofficinale. Biotechnol. J. 3(4): 197-204.

11. Joo, G.J., Kim, Y.M., Lee, I.J., Song, K.S., Rhee, I.K. (2004), Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*, Biotechnol. Lett. 26: 191-487.

12. Khakipour, N., Khavazi, K., Mojallali, H., Pazira, E., Asadirahmani, H. (2008), Production of auxin hormone by fluorescent Pseudomonads. American-Eurasian J. Agric.&Environ. Sci. 4: 687-692.

13. Khan, A.L., Waqas, M., Kang, S.M., Al-Harrasi, A., Hussain, J., Al-Rawahi, A., Al-Khiziri, S., Ullah, I., Ali, L., Young Jung, H., Lee, I.J. (2014), Bacterial Endophyte*Sphingomonas* sp. LK11 Produces Gibberellins and IAA and Promotes Tomato Plant Growth. J. Microbiol. 52(8): 689-695.

14. Krey, T., Vassilev, N., Baum, C., Eichler-Lobermann, B. (2013), Effect of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. European Journal of Soil Biology. 55: 124-130

15. Luna, C.L., Mariano,. R.L.R., Souto-Maior, A.M. (2002), Production of a Biocontrol agent for Crucifers Black Rot Disease. Brazilian Journal of Chemical Engineering. 19: 133-140.

16. Mantelin, S., Touraine, B. (2004), Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. Journal of Experimental Botany. 55: 27-34.

17. Meyer, J.M. (2000), Pyoverdins: Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. Archives of Microbiology. 174: 135-142

18. Ngoma, L., Mogatlangane, K., Babalola, O.O. (2014), Screening of endophytic bacteria towards the development of coltage industry: An in vitro study. Journal of Human Ecology. 47: 45-63.

19. Oteino, N., Lally, R.D., Kiwanuka, S., Lioyd, A., Ryan, D., Germaine, K.J., Dowling, D.N. (2015), Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic*Pseudomonas* isolates. Front Microbiol. 6: 1-9.

20. Panchal, H., Ingle, S. (2011), Isolation and characterization of endophytes from the root of medicinal plant *Chlorophytum borivilianum* (Safed musli). Journal of Advances in Developmental Research. 2: 205–209.

21. Patten, C., Glick, B.R. (2002), Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology. 68: 3795-3801.

22. Pirttila, A.M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllyla, R., Hohtola, A. (2000), Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology. 66: 3073-3077.

23. Rafiei, S., Asadi Rahmani, H. (2014), Survey the ability of flavobacterium sp. Bacteria in solubilization of insoluble phosphate. J. cell Molecul Research, 26(4):472-479.

24. Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y., Hashidoko, Y. (2010), Salkowski's reagent test as a primary screening index for functionalities of Rhizobacteria isolated from wild dipterocarp saplings growing naturally on medium-strongly acidic tropical peat soil. BiosciBiotechnolBiochem. 74: 2202–2208.

Archive of SID

www.SID.ir

25. Rodriguez, H., Fraga, R. (1999), Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17: 319-339.

26. Saharan, B.S., Nehra, V. (2011), Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Science and Medicine Research. 21: 1-30.

27. Sambrook, J., Russell, D.W. (2001), Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

28. Schaad, N.W. (2001), Initial identification of common Genra. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W.editors. The American Phytopathological Society. p. 1-15.

29. Schippers, B., Bakker, A.W., Bakker, P.A.H.M. (1987), Intractions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology. 25: 339-358.

30. Schulz, B., Boyle, C. (2006), What are endophytes? Pp. 1–13. In*:* Schulz B, Boyle C and Sieber T.N (eds). Microbial Root Endophytes. Springer-Verlag, Berlin.

31. Schywan, B., Neilands, J.B. (1987), Universal chemical assay for detection and determination of sidrophores. Analytical Biochemistry. 160: 47-56.

32. SoltaniTolarood, A., Salehrastin, N., Khavazi, K., Asadi, H., Abaszadeh, P. (2008), Isolation and study Plant Growth Promoting properties of *Pseudomonas fluorescens* species in soils of Iran. Journal of SoilandWaters Sciences. 21: 187-199.

33. Stepanova, A.N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L.M., Xie, D.Y., Dolezˇal, K., Jurgens, S.G., Alonso, JM. (2008), TAA1-mediated auxinbiosynthesis is essential for hormone crosstalk and plantdevelopment. Cell. 133: 177-191.

34. Sziderics, A.H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., Wilhelm, E. (2007), Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). Canadian Journal of Microbiology. 53: 1195-1202.

35. UmaMaheswari, T., Anbukkarasi, K., Hemalatha, T., Chendrayan, K. (2013), Studies on phytohormone producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2: 127-136.

36. Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N., Kumar, A. (2013), Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. Ecological Engineering. 51: 282-286.

37. Vyas, P., Gulati, A. (2009), Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonas. BMC Microbiology. 22 : 9 -174.

38. Wang, S., Huijun, W., Junqing, Q., Lingli, M., Jun, L., Yanfe, X., Xuewen, G. (2009), Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to *tabacco mosaic virus* by *Bacillus* spp. Journal of Microbiology and Biotechnology. 19: 1250-1258.

39. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. (1991), 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697- 703.

40. Wilcox, J.R. (1987), Soybean: Improvement, Productions and Uses. Madison, Wisconsin, USA.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation gibberellin and auxin production ability by endophytic bacteria *Pseudomonas fluorescens* in soybean L17 cultivar

Etminani F. and Etminani A.

Plant Pathology Dept., Young Researchers and Elite clube, Islamic Azad University of Sanandaj, Sanandaj, I.R. of Iran

Abstract

Endophytic bacteria live inside tissues of *their* plant host without causing visible symptoms, and in more cases are reported as plant growth promoting bacteria. This research was conducted to determine plant growth promoting affects of endophytic bacteria associated with Soybean (cultivar L17). In order to isolate endophytic bacteria from various parts of soybean (cultivar L17), samples were collected from the research farm of Agriculture faculty in this research endophytic bacteria were isolated from leaf, stem, seed and root of. After genomic DNA extraction, 16S rDNA gene was amplified using PCR. Then, the PCR product was sequenced by BLAST. Strains were surveyed for IAA and GA production ability was carried out using a randomized complete design in three replications. Analysisofvariance and mean comparison was performed using Duncan Test with SAS software. The isolated bacteria were able to produce IAA in various amount 20/03 - 45/33 without tryptophan and in the presence of it, 26/76 -51/17 microgram/milt. GA producing abilities were also 12/97-17/15 microgram/milt for these isolates.Based on the 16S rDNA sequence studies, this bacterium belonged to *Pseudomonas fluorescens*and indicated 99% similarity to type strain. This study is the first report of isolation of*Pseudomonas fluorescens*from Soybean (L17 cultivar). The endophytic bacteria isolated in this study can be used to promote plant growth.

Key words: endophytic bacteria, *Pseudomonas fluorescens*, soybean

Archive of SID

www.SID.ir