نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۰، ص. ۶۹-۶۱

Journal of Water and Soil
Vol. 25, No. 1, Mar-Apr 2011, p. 61-69

ارزیابی کمی و کیفی توان تولید هورمون اکسینی (IAA) توسط برخی از سویه‌های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران

حسن اعتصامی[1*] – حسینعلی علیخانی[2]

تاریخ دریافت:۸۸/۹/۱۸
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۰/۱۸

چکیده

اکنون کاملا محقق شده است که می‌توان در بین سویه‌های بیشمار از هر گونه ریزوبیومی، سویه هایی را یافت که علاوه بر کارایی بالا در تثبیت N2 ، توان انجام فرایندهای موثر در تحریک رشد گیاه مانند تولید هورمون‌های محرک رشد گیاهی خصوصا اکسین‌های ایندولی همچون IAA را نیز داشته باشند. لذا هدف از این تحقیق تعیین توان تولید IAA توسط سویه‌های ریزوبیومی بومی برخی از خاکهای ایران به دو روش کمی و کیفی می‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که باکتریهای ریزوبیومی توانایی تولید هورمون اکسین (IAA) را دارند. بعلاوه اینکه این توانایی در بین گونه‌های مختلف ریزوبیومی و در سویه‌های متعلق به هرگونه ریزوبیومی یکسان نیست ($p<0.01$). مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه ای دانکن حاصل از این دو روش نشان می‌دهد که سویه‌های *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* با HD/CD >۳ ، *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* با HD/CD=۲/۵-۳ و *Sinorhizobium meliloti* با HD/CD=۲-۲/۵ که در روش کیفی و کمی توان بالایی از نظر تولید IAA داشته اند. همچنین سویه‌های *Mesorhizobium ciceri* با HD/CD=۱/۵-۲ و *Bradyrhizobium* spp با HD/CD=۱-۱/۵ در هر دو روش توان پایینی از نظر تولیدIAA داشته اند.

واژه های کلیدی: ریزوبیوم، باکتریهای محرک رشد گیاه، اکسین، ایندول استیک اسید، تریپتوفان

مقدمه

ریزوباکتریها، باکتریهایی هستند که آشیان‌های اکولوژیک موجود در خاک فرا ریشه و یا روی سطح ریشه و یا درون ریشه را در مراحل مختلف رشد گیاه اشغال و در آنجا تکثیر پیدا می‌کنند. اصطلاح PGPR به وسیله کلوپر و کروث در سال ۱۹۷۸ برای انواعی از باکتریهای ریزوسفری که اثر معنی داری در افزایش رشد گیاهان نشان داده اند به کار رفته است. PGPR شامل باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت مانند گونه‌ها ویا سویه‌هایی از جنس سودوموناس، برخلدریا، آرتروباکتر، سراشیا، آکروموباکتر، ریزوبیوم، آزوسپریلیوم، باسیلوس و استرپتومایسس می‌باشند. این باکتریها قادرند تا از طریق مکانیسم‌های مختلف اثرات مثبتی را بر گیاهان اعمال کنند. در میان باکتریهای یاد شده، برخی بطور مستقیم موجب تحریک رشد گیاه می‌شوند (۸). آنها این عمل را از طریق تولید و ترشح تنظیم کننده‌های رشد (Plant Growth Regulators)(PGRs) مثل فیتوهورمون ها (اکسین، جیبرلین و سیتوکینین)، سیدروفورها، HCN و یا از طریق فراهم نمودن عناصر غذایی موردنیاز گیاه از جمله فسفر و یا نیتروژن انجام می‌دهند. در چند سال اخیر اهمیت مواد تنظیم کننده رشد گیاهان که توسط باکتریها تولید می‌شود مورد توجه قرار گرفته است (۷و۹). از مهمترین این مواد، ترکیباتی با ساختمانی هورمونی هستند که از جمله می‌توان به گروه اکسین‌ها اشاره کرد. اکسین‌ها در اوایل قرن بیستم به عنوان مواد تنظیم‌گر رشد گیاه شناخته شده اند. ایندول-۳-استیک اسید (IAA) یک اکسین طبیعی دارای اثرات فیزیولوژی گسترده ای می‌باشد. تخمین زده شده است که ۸۰ درصد از باکتری ریزوسفری توان تولید IAA را دارند (۱۵). ریزوبیوم ها به دلیل توان بی مانند خود در برقراری همزیستی با گیاهان خانواده لگومینوز و ایجاد سیستم‌های توانمند در تثبیت نیتروژن مولکولی قادر به تامین بخش قابل توجهی از نیتروژن مولکولی اکوسیستم‌های زراعی در سطح جهانی می‌باشند (۸). در دهه‌های اخیر با اینکه هنوز می‌توان تثبیت نیتروژن توسط این باکتریها و بخصوص ویژگیهای ژنتیکی فرایند همزیستی را به عنوان

۱و۲- دانشجوی دکتری و دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده مهندسی آب و خاک، دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email:salic_etesam@yahoo.com)

محور اصلی پژوهش‌های محققین بیولوژی خاک محسوب داشت معهذا با اثبات توانایی دیگری در ریزوبیوم ها و محسوب داشتن این باکتریها در گروه ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) کارهای پژوهشی در زمینه (PGPR) نیز رو به فزونی گذاشته اند. باکتریهای ریزوبیومی در زمره بهترین ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه بحساب می‌آیند مطالعات زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد تولید هورمون گیاهی بیشتر توسط گروهی از باکتریهای ریزوسفری تحت عنوان PGPR یا ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه و از جمله باکتریهای ریزوبیومی صورت می‌گیرد (۱). یکی از مهمترین راههایی که این باکتریها بر رشد و نمو گیاه اثر می‌گذارند از طریق سنتز فیتوهورمون ایندولی (IAA) می‌باشد که این هورمون باعث توسعه سیستم جذب توسط ریشه ای گیاه و بدنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه می‌گردد (۲ و ۱۸). این باکتریها غالباً جهت تولید اکسین از اسید آمینه تریپتوفان بعنوان پیش نیاز استفاده می‌کنند (۵). در ایران کارهای پژوهشی معدودی در مورد ریزوبیوم ها انجام شده است که اکثرا قدمتی بیش از یک دهه ندارد و تقریبا همه آنها سویه‌های ریزوبیومی را تنها بر اساس کارایی همزیستی در تثبیت N_2 مورد ارزیابی قرار داده اند. پژوهش حاضر مبتنی بر این فرض است که باکتریهای ریزوبیومی بومی خاکهای ایران قادر به تولید مقادیر کافی از هورمون رشد گیاهی IAA می‌باشند. بنابراین این تحقیق به منظور ارزیابی توان تولید فیتو هورمون ایندولی (IAA) توسط سویه‌های ریزوبیومی بومی برخی از خاکهای ایران می‌باشد که می‌تواند به استفاده کاربردی از این باکتریها در سطح وسیعی منجر گردد.

مواد و روش ها

در این تحقیق تعداد ۱۰۰ جدایه باکتری ریزوبیومی مورد استفاده قرار گرفته است. از مجموع ۱۰۰ جدایه باکتری مورد استفاده در این تحقیق ۸۰ جدایه باکتری متعلق به کلکسیون آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشکده کشاورزی تهران می‌باشد و ۲۰ جدایه دیگر از گره‌های ریشه‌ای یونجه مزارع اطراف شهرستان کرج جداسازی و خالص سازی شده است.

خالص سازی و آماده سازی باکتریها

ابتدا ۲۰ ایزوله باکتری ریزوبیومی به آزمایشگاه انتقال و جدا سازی شدند. سویه‌های مذکور بعلاوه سویه‌های انتخاب شده از بانک ژن پس از تجدید کشت بر روی محیط‌های congored-YMA و Bromothymolblue-YMA، رنگ آمیزی گرم و مشاهدات میکروسکپی برای مراحل بعدی آزمایش آماده شدند (۶). باکتری ریزوبیومی متعلق به جنس‌های Sinorhizobium ، Mesorhizobium ، Rhizobium و Bradyrhizobium بودند که، بطور جداگانه برای هر جدایه به دقت از نظر وجود آلودگی‌های احتمالی بررسی و کلنی‌های غیرمعمول مورد جستجو قرار گرفتند. در صورت مشاهده اندکی آلودگی در سطح پلیت مراحل خالص سازی آن نمونه از طریق بازکشت ادامه یافت. پس از طی مراحل یاد شده یک کلنی تیپیک از هر جدایه انتخاب و پس از طی مراحل اجرایی لازم به فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید (۱۲). جدول ۱ تعداد باکتری در هر جنس، گونه و بیووارهای ریزوبیومی را نشان می‌دهد.

برای شروع کار، ابتدا ۱۰۰ باکتری انتخاب شده که قبلاً فریز شده بودند را بر روی محیط YAM تجدید کشت و جوان شدند سپس کلیه ۱۰۰ ایزوله باکتری بر اساس مدت زمان تشکیل کلونی به قطر۲ میلی متر به ۷ کلاس تقسیم بندی شدند این کار کمک می‌کرد که کلونی‌های با قطر تقریباً مشابه بر روی یک ظرف پتری کشت شوند و ارزیابی تولید IAA آنها با دقت بیشتری انجام پذیرد. جدول۲ این تقسیم بندی را نشان می‌دهد.

آزمون اندازه‌گیری کیفی تولید IAA توسط سویه‌های ریزوبیومی خالص شده

سنجش کیفی توانایی تولید IAA توسط سویه‌های ریزوبیومی براساس روش پیشنهادی بریک و همکاران (۷) انجام گردید. در این روش از ظروف پتری ۹ سانتی‌متری یکبار مصرف سترون، استفاده شد. هر ظرف پتری با رسم خطوط مناسب در زیر آن، به ۱۶ مربع کوچک به ابعاد حدود ۱/۷۵ ×۱/۷۵ سانتی‌متر تقسیم گردید. برای هر جدایه ریزوبیومی سه تکرار (سه مربع) در نظر گرفته شد و بدین ترتیب هر ظرف پتری به ۵ جدایه اختصاص یافت. درون هر ظرف پتری ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت سترون شده LB[1] حاوی ۵ mM ماده ال ـ تریپتوفان (L-TRP) ریخته شد. پس از رشد کافی باکتری درون محیط کشت YMB، ابتدا دانسیته نوری (OD) سوسپانسیونهای ریزوبیومی با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل UnicoTM ;1100,USA) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت و آنگاه با استفاده از منحنی رشد (OD – CFU) و براساس فاکتور رقتو از طریق افزودن مقادیر لازم آب مقطر استریل، جمعیت باکتری در تمامی سوسپانسیونهای ریزوبیومی در حد $۲/۴\times۱۰^{۸}$ cfu $ml^{-۱}$ تنظیم گردید. به این ترتیب امکان برداشت و کاربرد تعداد یکسان سلول ریزوبیومی زنده برای انجام هر یک از آزمون های مورد نظر فراهم گردید.

آنگاه سطح هر مربع در قسمت مرکزی آن با یک خلال دندان سترون از زاد مایه هر جدایه مایه‌زنی گردید.

1- Luria - Bertani

جدول۱- تعداد باکتری در هر جنس، گونه و بیووارهای ریزوبیومی بکار برده شده در این تحقیق

محل نمونه برداری	تعداد سویه	گروههای مختلف ریزوبیومی نام گروه (جنس، گونه و بیووار)
اصفهان-جاده مبارکه- ده سرخ	۱۵	*Rizobium.leguminosarum* bv.*phaseoli*
کرج-حیدرآباد	۱۷	*Rizobium.leguminosarum* bv.*viciae*
همدان - کبودرآهنگ	۵۹	*Sinorhizobium meliloti*
جاده تاکستان- هیدج-قمچه آباد	۶	*Mesorhizobium ciceri (& M.mediterraneum)*
گرمسار بطرف کویر	۳	*Bradyrhizobium.* spp(groundnut)
جمع کل	۱۰۰	

سپس یک برگ غشاء نیتروسلولز بر روی محیط کشت مایه زنی شدهٔ LB قرار داده شد. ظروف پتری بصورت واژگون درون انکوباتور (۲۷°C) به مدت ۲ تا ۴ روز خوابانده شدند. زمانیکه قطر کلنی‌های ظاهر شده بر روی LB به حدود ۲ mm رسید، سنجش تولید IAA توسط جدایه‌ها، به شرح زیر انجام گرفت. برگهای غشاء نیتروسلولزی که در بردارنده کلنی‌های رشد یافته (حدود ۲ میلی‌متری) ریزوبیومی بودند، درون ظروف پتری تمیز دیگری حاوی یک برگ کاغذ صافی واتمن شماره ۲، اشباع شده توسط مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول معرف سالکوفسکی[1] تیمار شدند. پس از طی مدت ۰/۵ تا ۲ ساعت اطراف کلنی‌های ریزوبیومی که توان تولید IAA را داشتند هاله قرمز رنگی تشکیل می‌شد که رنگ و اندازهٔ این هاله‌ها بسته به مقدار IAA تولید شده توسط جدایه‌ها، متفاوت بودند. در این زمان قطر هاله (HD) قرمز ناشی از تولید IAA و قطر کلنی (CD) اندازه گیری و نسبت قطر هاله به قطر کلنی HD/CD برای هر ایزوله محاسبه و مبنای درجه بندی کیفی توان تولید IAA قرار گرفت. بطور کلی سویه های مورد آزمایش از نظر توان تولید هورمون IAA در ۴ گروه (۳-۰) به شرح زیر قرار داده شدند. قطر هاله (HD) و قطر کلنی (CD) درسویه هایی که در گروه ۳ قرار داشتند اندازه گیری و متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی HD/CD برای هرجدایه محاسبه و مبنای درجه‌بندی نیمه کمی توان تولید IAA قرار گرفت.

از محلولهای استاندارد IAA در غلظت‌های متفاوت (۰/۱ nM ، ۰/۲ ، ۰/۴ ، ۰/۶، ۰/۸، ۱ ، ۲، ۴، ۸) برای سهولت تشخیص نوع و شدت رنگ هاله‌های قرمز استفاده شد. برای این منظور با قرار دادن ۵۰ میکرولیتر از هر محلول استاندارد (۰/۱ تا ۸nM ، در دو تکرار) بر روی یک برگ غشاء نیتروسلولز، دایره ای مرطوب به قطر تقریبی ۲mm تشکیل می‌شد که تقریباً معادل قطر کلنی‌های ریزوبیومی بود. برگهای نیتروسلولزی لکه گذاری شده با محلولهای استاندارد IAA با معرف سالکوفسکی تیمار گردیده و سپس قطر هاله قرمز تشکیل شده اطراف هر لکه اندازه گیری شد.

آزمون اندازه‌گیری کمی تولید IAA توسط سویه‌های ریزوبیومی خالص شده

اندازه‌گیری کمی تولید IAA نیز بر اساس روش بریک (روش کیفی) منتهی در محیط کشت مایع رنگی در نتیجه استفاده از محلول سالکوفسکی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (*UNICO1100U.S.A*) (به مدت ۴-۲ روز با توجه به جدول۲ مدت زمان سرعت تشکیل کلنی به قطر۲ میلی لیتر) به شرح زیر انجام گرفت (۱۸).

برای انجام این آزمون زاد مایه کشت تازه هر جدایه باکتری به روش زیر تهیه گردید:

ارلن‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری انتخاب و آماده شدند. درون هر ظرف ارلن مقدار ۲۰ml محیط کشت مایع LB-TRP ریخته شد و ارلن ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه درون اتوکلاو سترون شدند. سپس محتوی هر ارلن با یکی از سویه‌های موردنظر مایه زنی گردید. ارلن‌های مذکور با ورقه آلومینیومی پوشانده شدند و به مدت ۷۲ ساعت برای باکتریهای تند رشد و تا ۱۲۰ ساعت (برای انواع کند رشد) در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد بر روی بهم زدن دورانی با سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه هوادهی و خوابانیده شدند. پس از رشد کافی باکتری درون محیط کشت مایعLB با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (معیار) (OD/CFU(ml) جمعیت باکتری در تمامی سوسپانسیون‌های ریزوبیومی در حد cfu/ml ۲/۴×۱۰۸ تنظیم گردید. به این ترتیب امکان برداشت و کاربرد تعداد یکسان سلول ریزوبیومی زنده برای انجام هر یک از آزمون موردنظر فراهم گردید.

1- Salkowski

جدول۲- تقسیم بندی باکتریهای انتخاب شده بر اساس مدت زمان تشکیل کلونی به قطر ۲ میلی متر در محیط کشت YAM

مدت زمان تشکیل کلونی						
ساعت ۳٦	ساعت ٤٨	ساعت ٥٦	ساعت ٦٤	ساعت ۷۲	ساعت ۸۰	ساعت ۹٦
10Sm	11Sm	117Sm	121Sm	128Sm	302Rlp	116Sm
162Sm	122Sm	119Sm	123Sm	139Sm	324Rlv	119Sm
336Rlv	124Sm	126Sm	133Sm	167Sm	325Rlv	135Sm
345Rlv	13Sm	129Sm	136Sm	261Rlp	490Rlv	141Sm
350Rlv	15Sm	148Sm	137Sm	284Rlp	491Rlv	226Bsp
69Sm	160Sm	158Sm	140Sm	310Rlp	492Rlv	297Rlp
7Sm	16Sm	163Sm	143Sm	335Rlv	493Rlv	380Mc
	17Sm	23Sm	144Sm	348Rlv	469Rlv	406Mc
	18Sm	267Rlp	14Sm	377Mc	497Rlv	414Mc
	19Sm	270Rlp	155Sm	497Rlv		
	20Sm	397Mc	159Sm			
	21Sm	47Sm	165Sm			
	239Bsp	5Sm	22Sm			
	240Bsp	64Sm	24Sm			
	254Rlp	68Sm	272Rlp			
	263Rlp	6Sm	279Rlp			
	275Rlp	81Sm	321Rlv			
	277Rlp	127Sm	494Rlv			
	289Rlp	161Sm				
	315Rlv	94Sm				
	341Rlv					
	35Sm					
	384Mc					
	71Sm					
	8Sm					
	9Sm					
	281Rlp					

Rlp: Rhizobium leguminosarum var. phaseoli
Rlv: Rhizobium leguminosarum var. viciae
Sm: Sinorhizobium meliloti
Mc: Mesorhizobium ciceri
Bsp: Bradyrhizobium. spp

برای اندازه‌گیری IAA تولید شده توسط باکتریها باید سلول باکتری و محیط کشت از مواد مترشحه استخراج شوند. روش معمول، جدا کردن سلول باکتری و محیط کشت از مواد مترشحه، به کمک سانتریفوژ می‌باشند. ۴ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به وسیله پی‌پت سترون شده برداشته شد و داخل لوله‌های سانتریفوژ مخصوص ریخته و بمدت ۱۰ دقیقه و چرخش حدود ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید تا باکتری ها کاملاً ته نشین شدند. سپس ۲ میلی لیتر از محلول شفاف رویی که حاوی اکسین است به نسبت ۲ : ۱ یعنی دو حجم عصاره باکتری و یک حجم با محلول سالکوفسکی تیمار شده و پس از مدت ۰/۵ تا ۲ ساعت قرائت انجام شد. رنگ پدید آمده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر که از قبل با محلولهای استاندارد با غلظت‌های صفر، ۵ ، ۱۰ ، ۲۰ ، ۲۵ ، ۳۰ و ... ، ۳۰۰ ppm کالیبره گردیده بود در طول موج ۵۳۰ نانومتر حاصل شده بود. در نهایت غلظت نهایی IAA تولید شده توسط هر یک از سویه‌های ریزوبیومی توسط دستگاه قرائت گردید. این آزمون‌های (کمی و کیفی) بصورت طرح کاملاً تصادفی چند مشاهده‌ای با ۵ تیمار (گروههای مختلف ریزوبیومی Sm ، Rlp ، Rlv ، Mc و Bsp) در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه واریانس (ANOVA) و محاسبات آماری با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری MSTAT و SAS و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای Excel انجام گردید. مقایسه میانگین داده ها به روش آزمون چند دامنه دانکن در سطح ۵٪ انجام پذیرفت.

نتایج

آزمون کیفی و کمی توان تولید هورمونIAA نشان می‌دهد که باکتریهای ریزوبیومی توانایی تولید هورمون اکسین (IAA) را دارند. بعلاوه اینکه این توانایی در بین گونه‌های مختلف ریزوبیومی و در سویه‌های متعلق به هرگونه ریزوبیومی یکسان نیست ($p<0.01$). در آزمون کیفی از نظر توان تولید IAA سویه‌های مختلف ریزوبیومی به ۵ گروه با توان‌های مختلف (گروه ۱ توان تولید خیلی بالا (۳ <HD/CD)، گروه ۲ توان تولید بالا (۳-۲/۵=HD/CD)، گروه ۳ توان تولید متوسط (۲/۵-۲=HD/CD)، گروه ۴ توان تولید پایین

(HD/CD=۱/۵–۳) و گروه ۵ توان تولید خیلی کم (۱/۵–۱ =HD/CD) تقسیم بندی شده اند. در آزمون کمی نیز از نظر توان تولید IAA سویه‌های مختلف ریزوبیومی به ۵ گروه با توان‌های مختلف (گروه ۱ توان تولید خیلی بالا (۲۰۰ < میلی گرم در لیتر IAA)، گروه ۲ توان تولید بالا (۲۰۰–۱۵۰ میلی گرم در لیتر IAA)، گروه ۳ توان تولید متوسط،(۱۵۰–۱۰۰ میلی گرم در لیتر IAA) ، گروه ۴ توان تولید پایین (۱۰۰–۵۰ میلی گرم در لیترIAA)) و گروه ۵ توان تولید خیلی کم (۵۰ >میلی گرم در لیتر IAA) تقسیم بندی شده اند (۱۸). شکل های شماره ۱و۲ درصد باکتریهای ریزوبیومی در گروههای مختلف در این گروه بندی در دو روش کمی و کیفی را نشان می‌دهد. بطوری که مشاهده می‌شود در روش کیفی ۳ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید خیلی بالا، ۱۵ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید بالا، ۲۳ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید متوسط، ۲۷ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید پایین و ۳۲ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید خیلی پایین قرار گرفته اند. بطوریکه مشاهده می‌گردد در روش کمی ۵ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید خیلی بالا، ۹ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید بالا، ۴۴ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید متوسط، ۴۱ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید پایین و ۱ درصد از سویه‌ها در گروه با توان تولید خیلی پایین قرار گرفته اند. تمام سویه‌های مختلف ریزوبیومی آزمون شده در این تحقیق توان رشد بر روی محیط کشت جامد و مایع LB-TRP را داشته اند. بعلاوه اینکه توان تولید IAA در بین سویه‌های ریزوبیومی IAA یکسان نیست. بطوریکه مقدار عددی نسبت قطر هاله به کلنی و نیز غلظت (میلی گرم در لیتر) اندازه‌گیری شده در سویه‌های متعلق به گروههای مختلف ریزوبیومی بسیار متفاوت است. جدول ۳ مقایسه میانگین توان تولید IAA (نسبت HD/CD) و غلظت آن (میلی گرم بر لیتر) در بین گروههای مختلف ریزوبیومی که بوسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ انجام شده را نشان می‌دهد.

جدول۳- مقایسه میانگین تولید IAA به ترتیب بر روی محیط کشت جامدLB-TRP روش کیفی درون ظروف پتری و نیز در محیط LB-TRP مایع (روش کمی) توسط برخی از سویه‌های ریزوبیومی بومی کشور به روش آزمون چند دامنه ای دانکن(۵٪)

مقایسه میانگین ها در آزمون کیفی

گروه	تعداد	میانگین	Duncan grouping
Rlp	۴۵	۷۱/۲	A
Rlv	۵۱	۴۲/۲	A
Sm	۱۷۷	۶۵/۱	B
Mc	9	۵۰/۱	B
Bsp	۱۸	۳۸/۱	B

مقایسه میانگین ها در آزمون کمی

گروه	تعداد	میانگین	Duncan grouping
Rlp	۴۱	۹۲/۱۷۷	A
Rlv	۵۱	۹۲/۱۴۲	B
Sm	۱۷۷	۷۴/۹۶	C
Mc	۹	۷۳/۹۴	C
Bsp	۱۸	۴/۷۳	C

Rlp: Rhizobium leguminosarum var. phaseoli
Rlv: Rhizobium leguminosarum var. viciae
Sm: Sinorhizobium meliloti
Mc: Mesorhizobium ciceri
Bsp: Bradyrhizobium. Spp

نتیجه مقایسه میانگین کیفی داده‌ها نشان می‌دهد که گروههای ریزوبیومی Rlp و Rlv بدون اختلاف معنی‌دار میزان IAA بیشتری نسبت به مابقی گروههای مورد آزمایش (Sm ، Mc و Bsp) تولید کرده‌اند. بین گروههای دسته دوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد هر چند با سویه‌های گروه اول، Rlp و Rlv تفاوت معنی داری دارند. نتیجه مقایسه میانگین کمی داده‌ها نشان می‌دهد که گروههای Rlp با بیشترین مقدار IAA (۹۲/ ۱۷۷ میلی گرم بر لیتر) و سویه‌های ریزوبیومی Bsp با حداقل میزان IAA تولیدی (۷۳/۰۴ میلی گرم بر لیتر) به ترتیب به عنوان برترین و ناتوان ترین سویه‌های ریزوبیومی در بین سویه‌های مورد آزمون معرفی شدند. بین سویه‌های Rlp با Rlv تفاوت معنی‌داری وجود دارد ولی بین مابقی گروهها تفاوت معنی‌داری دیده نمی شود. نسبت قطر هاله به کلنی و مقدار IAA تولیدی در بین سویه‌های مختلف درون گروههای (Rlp ، Rlv ، Sm ، Mc و Bsp) نیز مورد تجزیه‌های آماری قرار گرفت.

جدول ۴ مقایسه میانگین‌های توان تولید IAA سویه‌های مختلف ریزوبیومی را در گروههای مختلف ریزوبیومی (Rlp ، Rlv ، Sm ، Mc و Bsp) در دو روش را نشان می‌دهد.

همانطور که مشاهده می‌گردد بین اکثر سویه‌های گروههای مختلف ریزوبیومی از نظر توان تولید IAA اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود دارد.

بحث

نتایج حاصل از این دو آزمون نشان می‌دهد که باکتریهای ریزوبیومی توانایی تولید هورمون اکسین IAA را دارند. بعلاوه اینکه این توانایی در بین گونه‌های مختلف ریزوبیومی و در سویه‌های متعلق به هرگونه یکسان نیست.

جدول٤- مقایسه میانگین‌های توان تولید IAA سویه‌های مختلف ریزوبیومی را در گروههای مختلف ریزوبیومی (*Rlp* ، *Rlv* ، *Sm* ، *Mc* و *Bsp*) در دو روش به روش کمی و کیفی آزمون دانکن (٥٪)

سویه های مختلف ریزوبیومی	HD/CD		IAA(میلی گرم در لیتر)		سویه‌های مختلف ریزوبیومی	HD/CD		IAA(میلی گرم در لیتر)	
۱۲۸Sm	۳/۰۶۷	a	۱۹۳/۲	a	۳۲۵Rlv	۲/۸۸۳	a	۲۱۸/۸	a
۳۵Sm	۲/۱۶۹	b	۱۲۱/۷	b	۳۲۱Rlv	۲/۷۷۷	b	۱۸۷/۱	b
۱۱۹Sm	۲/۱۹۶	b	۱۱۸/۴	c	۳۱۵Rlv	۲/۵۰۷	c	۱۴۳/۵	c
۱۶۰Sm	۲/۱۹۶	b	۱۱۶/۵	d	۳۳۶Rlv	۲/۵۰۷	c	۱۴۳/۵	c
۱۳۶Sm	۲/۱۱۶	c	۱۱۵/۶	d	۳۴۱Rlv	۲/۵۰۷	c	۱۴۰/۷	d
۱۴۳Sm	۲/۰۷	d	۱۱۴/۴	e	۳۳۵Rlv	۲/۵	c	۱۴۰/۷	d
۱۴۴Sm	۲/۰۷	d	۱۱۴/۴	e	۴۹۰Rlv	۲/۵	c	۱۴۰/۴	d
۱۴۸Sm	۲/۰۷	d	۱۱۳/۷	e	۳۲۴Rlv	۲/۴۳۳	c	۱۴۰/۴	d
۱۴Sm	۲/۰۷	d	۱۱۱/۹	f	۳۵۰Rlv	۲/۴۳۳	c	۱۳۸/۹	e
۱۰Sm	۱/۹۳۷	e	۱۱۱/۱	f	۴۹۴Rlv	۲/۴۳۳	c	۱۳۸/۹	e
۱۲۱Sm	۱/۹۳۷	e	۱۱۰/۵	fg	۴۹۷Rlv	۲/۴۳۳	c	۱۳۴/۴	f
۱۲۹Sm	۱/۹۳۷	e	۱۰۹/۶	gh	۳۴۵Rlv	۲/۲۶۷	d	۱۳۳/۸	fg
۱۳۵Sm	۱/۹۳۷	e	۱۰۹/۶	hi	۳۴۸Rlv	۲/۲۳۳	de	۱۳۲/۷	g
۱۳Sm	۱/۹۳۷	e	۱۰۸/۸	hi	۴۹۱Rlv	۲/۱۹۹	de	۱۲۹/۴	h
۱۱۶Sm	۱/۹۱۱	e	۱۰۸/۸	i	۴۹۲Rlv	۲/۱۸۲	e	۱۲۸/۷	h
۱۲۲Sm	۱/۱۱/۹	e	۱۰۷/۳	i	۴۹۳Rlv	۲/۱۶۷	e	۱۲۵/۶	i
۱۶Sm	۱/۹۱۱	e	۱۰۶/۶	j	۴۹۶Rlv	۲/۱۶۸	e	۱۲۰/۷	j
۱۲۳Sm	۱/۸۴۹	f	۱۰۶/۶	jk					
۱۳۷Sm	۱/۸۳۸	f	۱۰۶/۶	jk	۳۷۷Mc	۱/۸۷۵	a	۸۳/۵۷	a
۲۰Sm	۱/۷۷۳	g	۱۰۵/۸	jk	۳۸۴Mc	۱/۳۷۱	b	۸۰/۵۷	b
۱۳۸Sm	۱/۷۶۱	g	۱۰۵/۸	k	۳۸۰Mc	۱/۳۷۱	b	۷۵/۹	c
۲۲Sm	۱/۷۶۱	g	۱۰۴/۲	k	۳۹۷Mc	۱/۳۵۶	b	۷۰/۱۴	d
۱۶۳Sm	۱/۷۲۴	h	۱۰۴/۲	l	۴۰۶Mc	۱/۲۱۴	c	۶۷/۰۶	e
۱۵۸Sm	۱/۶۳	i	۱۰۲/۷	l	۴۱۴Mc	۱/۱۲۳	d	۶۱	f
۱۵۵Sm	۱/۶۳	i	۱۰۱/۹	m					
۱۲۷Sm	۱/۶۲۳	i	۱۰۰/۹	mn					
۱۴۰Sm	۱/۶۲۳	i	۹۹/۹۴	no	۲۸۱Rlp	۳/۱۶۳	a	۲۵۰/۷	a
۱۴۱Sm	۱/۶۲۳	i	۹۹/۴۵	op	۲۶۷Rlp	۳/۰۶۷	b	۱۴۰/۵	b
۱۱۷Sm	۱/۶۱	i	۹۸/۶۷	pq	۲۷۵Rlp	۲/۸۸۳	c	۲۳۸/۱	c
۱۱Sm	۱/۶۱	i	۹۶/۳	q	۲۹۷Rlp	۲/۸۸۳	c	۲۲۲/۳	d
۱۵Sm	۱/۵۲	j	۹۴/۷۳	r	۲۸۴Rlp	۲/۳۳۸	cd	۱۸۹/۲	e
۱۷Sm	۱/۵۲	j	۹۳/۱۵	s	۲۸۹Rlp	۲/۸	cd	۱۷۸/۹	f
۲۱Sm	۱/۵۲	j	۹۳/۱۵	t	۲۷۰Rlp	۲/۷۷۷	d	۱۶۵/۷	g
۱۵۷Sm	۱/۴۶۸	k	۹۳/۱۵	u	۲۵۴Rlp	۲/۷۵	de	۱۶۵	g
۱۹Sm	۱/۴۶۸	k	۹۱/۶	v	۲۶۱Rlp	۲/۶۶۳	df	۱۵۸/۶	h
۹Sm	۱/۴۶۸	k	۸۹/۸	w	۲۶۳Rlp	۲/۶۲۷	fg	۱۵۲/۸	i
۱۲۴Sm	۱/۴۵۳	k	۸۸/۴	wx	۳۱۰Rlp	۲/۵۹۳	fg	۱۵۲/۲	i
۱۲۶Sm	۱/۴۵۳	k	۷۸/۵۵	xy	۲۷۷Rlp	۲/۵۵۹	g	۱۴۸/۲	j
۱۳۹Sm	۱/۴۵۳	k	۸۶/۷۴	xy	۲۷۲Rlp	۲/۴۳۳	h	۱۳۷	k
۱۶۵Sm	۱/۴۵۳	k	۸۶/۷۴	xy	۲۷۹Rlp	۲/۴۳۳	h	۱۳۶/۵	k
۱۵۹Sm	۱/۴۵۳	k	۸۶/۷۴	xy	۳۰۲Rlp	۲/۲۳۳	i	۱۳۳/۱	l
۱۶۱Sm	۱/۴۱۳	l	۸۶/۷۴	yz					
۱۶۲Sm	۱/۴۱۳	l	۸۶/۰۷	…					
۲۳Sm	۱/۴۱۳	l	۸۵/۱۴	…					
۲۴Sm	۱/۴۱۳	l	۸۵/۱۴	…	۲۲۶Bsp	۱/۵۲	a	۹۶/۳	a
۱۳۳Sm	۱/۳۷۴	m	۸۴/۱۵	…	۲۳۹Bsp	۱/۵۲	a	۹۵/۵۲	a
۱۸Sm	۱/۳۷۱	m	۸۳/۶۵	…	۲۴۰Bsp	۱/۴۶۸	b	۹۲/۳۷	b
۸Sm	۱/۳۷	m	۸۲/۹۷	…					
۶۹Sm	۱/۳۵۳	mn	۸۱/۳۴	…					
۱۶۷Sm	۱/۳۳۵	n	۷۸/۹۸	…	۶۸Sm	۱/۳۳۵	n	۷۳/۷۳	…
۵Sm	۱/۳۳۵	n	۷۸/۹۸	…	۸۱Sm	۱/۳۳۵	n	۷۰/۹۵	…
۶Sm	۱/۳۳۵	n	۷۷/۷۸	…	۷Sm	۱/۲۵۲	o	۶۵/۹۵	…
۷۱Sm	۱/۳۳۵	n	۷۶/۸۶	…	۴۷Sm	۱/۲۱۴	p	۶۹/۱۴	…
۹۴Sm	۱/۳۳۵	n	۷۳/۷۳	…	۶۴Sm	۱/۱۱۱	q	۳/۱۳۵	…

همانطور که در نمودارها و جداول مقایسه میانگین‌ها دو آزمون دیده می‌شود سویه‌های ریزوبیومی مربوط به گروه Rlp دارای بیشترین مقدار HD/CD و تولید IAA (میلی گرم بر لیتر) می‌باشند و بدنبال آن گروههای Rlv ، Sm ، Bsp و Mc در مقامهای بعدی بوده اند. گزارشات متعددی درخصوص توان تولید فیتوهورمونها توسط باکتریهای PGPR دی ازوتروف، از جمله باکتریهای جنس ازتوباکتر (۱۴)، ازوسپریلوم (۱۳) و نیز باکتریهای ریزوبیومی (۱۱) وجود دارد. بر این اساس می‌بایست سویه فوق برتر مولد هورمون را در بین گروههای ریزوبیومی Rlp ، Rlv و سپس Sm ، Mc و Bsp جستجو نمود. با توجه به اینکه ال–تریپتوفان پیش نیاز تولید اکسین در گیاهان و ریزموجودات می‌باشد و از آنجایی که مقدار L-TPR(۵ nM) بکار رفته در محیط LB (مایع و جامد) برای همه سویه‌ها یکسان بوده است ولی مقدار IAA در سویه‌ها متفاوت است. نتیجه دیگر حاصل از این دو آزمون این است که تولید اکسین به خصوصیات ژنوتیپی ریزموجودات (۵ و۱۶) به رشد باکتری، فعالیت متابولیکی، بیان ژنی که مسئول کد کردن آنزیم درگیر در بیوسنتز IAA است، ثابت سنتتیکی ریزموجودات و محیط کشت باکتری بستگی دارد. تین و همکاران (۱۷) مقدار IAA تولید شده توسط باکتریها را تابعی از گونه و سویه باکتری و همچنین نوع محیط کشت مورد استفاده و شرایط کشت باکتری گزارش کردند. اضافه کردن مقدار مناسبی از L-TRP به محیط تا حدی می‌تواند باعث تولید اکسین گردد و افزایش بیش از آن مقدار مناسب تأثیری در تولید اکسین ندارد و سرعت تشکیل اکسین را پایین می‌آورد و می‌تواند موجب تحریک و تولید اتیلن تنشی گردد (۴). مقدار L-TRP استفاده شده در این محیط (LB)، مناسب برای تولید اکسین برای سویه‌های ریزوبیومی آزمون شده در این تحقیق بود (۳). با کاهش مقدار TRP، تولید اکسین نیز کاهش پیدا می‌کند (۲) و افزودن TRP به محیط نیز تولید اکسین را چندین برابر افزایش می‌دهد (۹). تین و همکاران (۱۷) نشان دادند که کاهش غلظت TRP از ۱۰۰میکروگرم در لیتر به ۱ میکروگرم در لیتر باعث کاهش تولید اکسین در سویه‌ها گردید. و نیز گزارش کردند بیوسنتز اکسین در بعضی از ازتوباکترها با کاهش مقدار TRP در محیط باکتری باعث کاهش کارائی تبدیل TRP به اکسین می‌گردد که یکی از دلایل این کاهش به علت تغییر مسیر بیوسنتز اکسین می‌باشد (۱۶). همچنین مطالعات دیگر نشان داده است که تولید اکسین توسط باکتریها وقتی که L-TRP به محیط اضافه گردید از ۲/۴۲ میکروگرم در لیتر به ۲۴/۶ میکروگرم در لیتر افزایش یافته است که این مقدار افزایش در تولید اکسین در سویه‌های مختلف فرق می‌کرد که در توافق با نتایج اکثر محققین می‌باشد. گزارشات متعددی نشان داده‌اند که شرایط محیطی همچنین غلظت باکتریهای تولیدکننده IAA نیز می‌توانند بر مقدار تولید اکسین تأثیر داشته باشند (۴، ۵ و ۱۸).

منابع

1- Anton H., Gossard N., Chabot R., and Lalande R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (Raphanus sativus L.). Plant and Soil. 204: 57-67.
2- Antoun H., and Prevost D. 2001. PGPR avtivity of *Rhizobium* with nonleguminous plants.Agriculture and Agri-food Canada. Canada GIV 2J3.
3- Arshad M., and Frankenberger W.T.Jr. 1991. Microbial production of plant hormones. Plant and Soil, 133: 1-8.
4- Asghar H.N., Zahir Z.A., and Arshad M. 2004. Screeninig rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). Australian Journal of Agricultural research. 55: 187-194.
5- Asghar H.N., Zahir Z.A., Arshad M., and Khaliq A. 2002. Relationship between in invitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea L*. Biol Fertil Soils. 35: 231-237.
6- Beck D.P., Materun L.A., and Afandi F. 1993. Practical Rhizobium-legume Technology Manual. Technical manual, No: 19, ICARDA.
7- Bric J.M., Bostok R.M. and Silverston S.A. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrance. Appl. Environ. Microbiol. 57(2): 535-538.
8- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free – living bacteria. Can. J. Microbiol .41: 109 –117.
9- Kloepper J.W. and Schroth M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In proceeding of the International conference on plant pathogenic Bacteria. pp. 879-882.
10- Kravchenko L.V., Leonova E.I., Tikhonovich I.A. 1994. Effect of root exudates of non-legume plants on the response of auxin production by associated diazotrophs. Microb. Releases, 2:267-271.
11- Lambrecht M., Okon Y., Vande Broek A. and Vanderleyden J. 2000. Indole-3-acetic acid: a reciprocal signaling molecule in bacteria-plant interactions. Trends in Microbiology, 8(7):298-300.
12- Malik K.A. 2003. A new freezing-drying method for the preservation of nitrogen- fixing and other fragile bacteria. Journal of Microbiological methods. 8: 259-271.
13- Mayak S., Tirosh T. and Glick B.R.1999. Effect of wild-type and mutant plant growth- Promoting rhizobacteria on the rooting of mung bean cuttings. J. Plant Growth Regul. 18: 49-53.
14- Nieto K.F. and Frankenberger W.T.Jr. 1989. Biosynthesis of cytokinins in soil. Soil Sci. Soc. Am. J. 53: 735-740.

15- Riov J. and Yang S.F. 1989. Ethylene and auxin – ethylene interaction in adventitious root formation in mung bean (*Vigna radiata*) cuttings. J. Plant Growth Regul. 8: 131-141.
16- Sarwar M. and Frankenberger W.T.1994. Influence of L-Tryptophan and auxins applied to the rhizosphere on the vegetative growth of *Zea mays* L. Plant and Soil.160: 97-104.
17- Tien T.M., Gaskins M.H. and Hubbell O.H. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. Appl. Env. Microbiol. 37: 1016-1024.
18- Torres-Rubio M.G., Astrid S., Castillo J. and Martiners P. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter sp*. And *Pseudomonas sp*., producers of indole-3-acetic acid and Siderophores, from colombian rice rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiologia. 42: 171-176.

Journal of Water and Soil
Vol. 25, No. 1, Mar-Apr 2011, p. 61-69

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۰، ص. ۶۹-۶۱

The Quantitative and Qualitative Assessment of Auxin Hormone Production Ability of Same of the Iranian Soils Indigenous Rhizobial Strains

H. Etesami[1]*- H.A. Alikhani[2]
Received:9-12-2009
Accepted:8-1-2011

Abstract

Now, it's completely proved that we can find strains among many strains of each rhizobial group that can also do effective process in plant growth promoting as plant growth hormones production (IAA), in addition of their ability in N_2 fixation .therefore, the aim of this research is to determinate the ability of IAA production of some of the indigenous rhizobial strains by two quantitative and qualitative methods. The results obtained from this study show that Rhizobial bacteria enable to produce auxin hormone (IAA). Moreover, this ability is not the same among various rhizobial species and among the strains belonging to each rhizobial species ($p<0.01$). The mean comparison performed by Duncan range test, in both methods, showed that the strains of *Rhizobium leguminosarum bv. Phaseoli* (with HD/CD >3), *Rhizobium leguminosarum bv. Viciae* (with HD/CD = 2.5 – 3) and *Sinorhizobium meliloti (*with HD/CD = 2 – 2.5) had the same production ability in both methods and also the strains of *Mesorhizobium ciceri* (with HD/CD= 1.5 – 2) and *Bradyrhizobium* spp (with HD/CD= 1 – 1.5) produced the small amount of IAA in both two methods.

Keywords: *Rhizobbium*, PGPR, IAA, Auxin, Tryptophan

1,2- PhD Student and Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Soil and Water Engineering College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran
(*- Corresponding Author Email:salic_etesam@yahoo.com)