مجله دنیای میکروب‌ها
سال نهم شماره سوم (پیاپی ۲۸) پاییز ۱۳۹۵
صفحات ۲۳۵-۲۲۶

Original Article

بررسی توانایی تولید هورمون‌های محرک رشد جیبرلین و اندول اسید استیک در باکتری‌های اندوفیت *سودوموناس پوتیدا* در سویا

فایقه اطمینانی*[۱]، ادیبه اطمینانی[۲]، شعله درویشی[۳]

[۱] کارشناس ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، [۲]دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، [۳] دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های اندوفیت بدون ایجاد علایم مشخص قادر به زندگی در بخش‌های داخلی گیاه میزبان هستند و در بسیاری از موارد به عنوان باکتری‌های محرک رشد گزارش شده‌اند. این مطالعه با هدف بررسی توانایی تولید هورمون‌های محرک رشد در باکتری‌های اندوفیت سویا انجام شد.

مواد و روش ها: به منظور جداسازی باکتری اندوفیت از بخش‌های مختلف سویا رقم TMS، نمونه‌برداری از مزرعه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج انجام شد. پس از استخراج DNA ژنومی، به منظور تکثیر ژن *16S rDNA* از روش PCR استفاده گردید. برای شناسایی باکتری جداسازی شده، محصول PCR تعیین توالی و ترادف بازی آن BLAST گردید. سویه‌ها از نظر تولید هورمون اندول اسید استیک و جیبرلین به صورت آماری در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: باکتری‌های جداسازی شده قادر به تولید هورمون اندول اسید استیک در حضور تریپتوفان در مقادیر ۷/۲ تا ۱۵/۱٤ میکروگرم در میلی‌لیتر و در غیاب تریپتوفان در محدوده ۳/۲ تا ۱۲/۱٤ میکروگرم در میلی‌لیتر بودند. باکتری‌ها توانایی تولید هورمون جیبرلین در مقادیر ۰/۱۱ تا ۰/۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را داشتند. نتایج تعیین توالی نشان داد که باکتری جداسازی شده متعلق به *سودوموناس پوتیدا* است که با سویه تیپ شباهت ۹۹ درصدی دارد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه اولین گزارش جداسازی باکتری اندوفیت *سودوموناس پوتیدا* از سویارقم TMS است. باکتری‌های اندوفیت جدا شده می‌توانند در افزایش رشد گیاه به کار روند.

واژگان کلیدی: باکتری اندوفیت، *سودوموناس پوتیدا*، سویا.

دریافت مقاله: خرداد ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹۵

مقدمه

باکتری‌های اندوفیت به باکتری‌هائی گفته می‌شوند که در داخل بافت گیاه سالم، بدون ایجاد علایم و آسیب حضور دارند و از آنجایی که علایم آشکاری بروز نمی‌دهند تخمین صحیح از جمعیت آن‌ها مشکل است (۱). این ریزموجودات از ریشه، برگ، ساقه، بذر، غده، گل‌آذین و میوه‌های گیاهان مختلف جدا شده‌اند (۲). باکتری‌های اندوفیت قادر به افزایش عملکرد گیاه میزبان از راه‌های مختلف هم‌چون تثبیت نیتروژن، حل فسفات، تولید سیدروفور و هورمون‌های گیاهی، توانائی کنترل زیستی ریزموجودات بیمارگر و افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی و زیستی هستند.

اکسین که از معمول‌ترین پیش‌ماده‌های آن اندول اسید استیک است، از هورمون‌های گیاهی ضروری برای رشد و توسعه مورفولوژیکی به ویژه (طویل شدن سلول، حفظ غالبیت انتهایی، کمک به تشکیل بافت‌های آوندی) است (۳). اندول

*) آدرس برای مکاتبه: کردستان، دانشگاه کردستان، گروه بیماری شناسی گیاهی.
تلفن: ۰۸۷۳۳۲٤۱۱۷۳ پست الکترونیک: agriculture.student@yahoo.com

اسید استیک در غلظت‌های پائین 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 *اروینیا* (*Erwinia*)، *باسیلوس* (*Bacillus*)، *سودوموناس* (*Pseudomonas*) و *فلاوباکتریوم* (*Flavobacterium*) قادر به سنتز اندول اسید استیک هستند (۵-۳).

یکی دیگر از هورمون‌های شناخته شده، جیبرلین است که یکی از مشخصه‌های کلیدی آن تاثیر بر افزایش طول ساقه است. جیبرلین در رشد زایشی، ظهور گل در گیاه، تولید میوه و به تاخیر انداختن پیری در گیاهان نقش به سزایی دارد. گزارش شده است که این هورمون در رشد و جوانه‌زنی بذور، کمک به تشکیل غده و پیاز نقش ایفا می‌نماید. هم‌چنین با تحریک تشکیل آنزیم‌های هیدرولیتیک، شکستن خواب زمستانی را تسهیل می‌کند (٦).

باکتری‌های اندوفیت از گروه‌های آلفا، بتا و گاما پروتئوباکتر، اکتینومیست‌ها و فرمیکوت‌ها گزارش شده است. تنوع باکتری‌های اندوفیت نه تنها در بین تاکسون‌های باکتریایی، بلکه حتی در بین گیاهان مختلف، قابل ملاحظه است. بیش از ۳۰۰ هزار گونه گیاهی روی زمین وجود دارد. محققان برآورد کرده‌اند که هر گیاه حداقل میزبان یک یا چند اندوفیت است (۷). باکتری‌های اندوفیت ممکن است دارای هزاران گیاه میزبان باشند و یا احتمال دارد که دامنه میزبانی آن‌ها محدود به خانواده گیاهی مشخصی باشد (۸).

سویا، سوژا یا لوبیای روغنی (*Glycine max*) گیاهی از خانواده بقولات، زیر تیره‌ی پاپیلونایسه و طایفه فازیولی یکی از گیاهان قدیمی و بومی آسیای شرقی است و هم اکنون نیز در این بخش از جهان به عنوان یک گیاه زراعی اصلی به شمار می‌آید. این محصول زراعی در درجه اول به منظور تولید روغن، کشت می‌شود. کشت آن به عنوان علوفه، سیلو و کود سبز در درجه بعدی اهمیت قرار دارد. اسیدهای چرب ضروری روغن سویا بیش‌تر از سایر دانه‌های روغنی است و به سبب برخورداری از اسیدهای چرب به ویژه اسید لینولئیک، درمیان دانه‌های روغنی، دارای مقام برجسته‌ای است. این محصول با ارزش به دلیل غنی بودن از ترکیبات پروتئینی و اسیدهای چرب، مستعد ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها می‌باشد و همین امر موجب کاهش عملکرد مطلوب آن می‌گردد (۹).

از آن جا که باکتری‌های اندوفیت با توانائی تولید ترکیبات محرک رشد همانند هورمون اندول اسید استیک و جیبرلین می‌توانند در افزایش عملکرد این محصول زراعی نقش مهمی را ایفا نمایند، هدف از این مطالعه بررسی توانائی تولید هورمون‌های محرک رشد جیبرلین و اندول اسید استیک در باکتری‌های اندوفیت *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*) در سویا رقم TMS بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه‌برداری، ضدعفونی بافت گیاهی و جداسازی باکتری اندوفیت: در اواخر تابستان سال ۱۳۹۳ نمونه‌برداری از بخش‌های مختلف بافت گیاهی (برگ، ساقه، ریشه، دانه) سویا رقم TMS 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 شدند. پس از خشک کردن با کاغذ صافی، نمونه‌های مورد نظر به قطعات کوچک‌تر ۳×۵/۲ سانتی‌متری خرد گردید. سپس توسط هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به مدت ٤ دقیقه شستشو داده شد و برای حذف ماده ضدعفونی‌کننده، داخل آب مقطر سترون ٤ تا ٥ 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 شوند. بعد از ۳۰ دقیقه از سوسپانسیون حاصل به مقدار ۵۰ میکرولیتر برداشته و بر روی چهار محیط کشت مختلف نوترینت آگار+سوکروز (NA+S)، نوترینت آگار (NA)،

لیزوزنی براث (LB) و King's medium B (KB) به کمک لوپ شیشه‌ای در تمام سطح پخش گردید. پتری‌ها به مدت ١٤ روز در دمای ٢٨ °C نگهداری شدند. هر روز از کلنی‌های جدید انتخاب و به عنوان جدایه‌های پایه برای آزمایش‌های بعدی در نظر گرفته شدند (١٠).

ب) ارزیابی روش ضدعفونی سطح بافت گیاهی: به منظور اطمینان از سترون شدن، قطعاتی از بافت گیاهی که به روش یاد شده، ضدعفونی شده بودند در ٥ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شستشو داده شدند و پس از گذشت چند دقیقه، ٥٠ میکرولیتر از سوسپانسیون، بر روی هر چهار محیط کشت NA ،NA+S LB و KB به کمک لوپ شیشه‌ای در تمام سطح پخش گردید و در انکوباتور مدل JS Research Inc با دمای ٢٨ °C نگهداری شد (١٠).

ج) شناسائی باکتری‌های اندوفیت: به منظور تعیین ویژگی های بیوشیمیایی اولیه جدایه‌ها از آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، رنگ آمیزی گرم و تولید رنگدانه فلورسنت از روش متداول در باکتری‌شناسی گیاهی استفاده شد (١١).

د) جداسازی DNA کروموزومی باکتری‌ها: باکتری در محیط‌کشت مایع نوترینت براث (مرک، آلمان) کشت داده شد. پس از رشد به میکروتیوب ١/٥ میکرولیتری منتقل و با سرعت ٣٠٠٠ دور به مدت ١/٥ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب به دست آمده پس از نگه‌داری به مدت ٣٠ دقیقه در فریزر، در ٢٠٠ میکرولیتر بافر TE حل گردید. نمونه‌ها پس از اضافه نمودن ٨ میکرولیتر لیزوزیم (از محلول پایه ١٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ٣٠ دقیقه در دمای ٣٧ درجه سلیسیوس نگه‌داری شدند. سپس ٤٠ میکرولیتر سدیم پرکلرات ٤ مولار، ٢٤ میکرولیتر *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) (١٠ درصد) و ٨ میکرولیتر پروتئیناز K (از غلظت پایه ٢٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول اضافه و بعد از هم زدن (وارونه کردن) به مدت ٢ ساعت در دمای ٤٥ °C نگه‌داری شد. به محلول به دست آمده در مرحله قبل، ٢ حجم اتانول خالص (نگه‌داری شده در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد) اضافه و به مدت ٣٠ دقیقه یا بیش‌تر در فریزر نگه‌داری گردید. محلول به مدت ٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سلیسیوس با سرعت ١٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس، اتانول دور ریخته شد و رسوب حاصله با ١ میلی‌لیتر اتانول ٧٠ درصد شستشو داده شد و دوباره به مدت ٥ دقیقه با سرعت ١٣٠٠٠ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله چند ثانیه در محیط معمولی اتاق نگه‌داری شد تا خشک گردد. سپس، در ٥٠٠ میکرولیتر بافر TE حل گردید. DNA به دست آمده با حجم مساوی ترکیب فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل (١:٢٤:٢٥) مخلوط و در درجه حرارت معمولی اتاق به صورت وارونه کردن هم‌زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. سپس به مدت ٣ دقیقه سانتریفیوژ گردید تا سه فاز مجزا تشکیل گردید. فاز رویی به میکروتیوب تمیز و سترون منتقل و مرحله قبل ٣ بار تکرار شد. در هر بار روماند به میکروتیوب سترون منتقل گردید. روماند یک بار نیز با اضافه نمودن کلروفرم: ایزوآمیل الکل (١:٢٤) رسوب داده شد. روماند به میکروتیوب سترون منتقل و DNA با اضافه نمودن ٢ حجم اتانول خالص و ٠/١ درصد حجم محلول استات سدیم ٣ مولار با pH ٤/٨ و سپس نگه‌داری در فریزر به مدت یک شب، رسوب داده شد. ترکیب به مدت ٥ دقیقه با سرعت ١٣٠٠٠ دور سانتریفیوژ گردید و رسوب به دست آمده توسط اتانول ٧٠ درصد شسته شد. رسوب حاصله پس از خشک شدن در ٥٠ میکرولیتر بافر TE حاوی (ریبونوکلئاز) از محلول پایه ١٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به غلظت نهائی ٢٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر) حل گردید (١٢).

ه) واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR): به منظور تکثیر ژن *16S rDNA* از پرایمرهای اختصاصی با توالی Fd2: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' و Rp1: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' استفاده گردید (١٣). واکنش PCR در حجم ٢٥ میکرولیتر شامل ١٢/٥ میکرولیتر از Master Mix (حاوی $Mgcl_2$، dNTPs و Taq DNA Polymerase)، ٠/٥ میکرولیتر از هر پرایمر (١٠ پیکومولار)، ١ میکرولیتر از DNA الگو (غلظت تقریبی ٥٠ نانوگرم بر میکرولیتر) و ١٠ میکرولیتر آب مقطر سترون و دیونیزه انجام گرفت (١٢). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، در

دستگاه ترمال سایکلر مدل MJ Research ساخت شرکت BioRad کشور آمریکا با شرایط دمایی ٤ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۲ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۱ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد (۱۳). محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور (Uvitek کشور انگلستان) مورد بررسی قرار گرفتند. پس از اطمینان از صحت انجام PCR 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 (۱۳). 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.

و) آزمون تولید اندول 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 گردیدند. پس از آن جهت اطمینان از رشد باکتری، با نمونه شاهد مقایسه شد. پس از سانتریفیوژ نمودن با سرعت ۵۳۰۰ دور به مدت ۱۲ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر از روماند انتخاب و به آن ۲ میلی‌لیتر معرف سالکواسکی اضافه گردید. پس از ۳۰ دقیقه نگه‌داری در اتاق تاریک برخی از سویه‌های باکتری موجب تغییر رنگ محیط شدند. تغییر رنگ نمونه‌ها به قرمز، نشان از حضور اندول اسید استیک است و برای تعیین میزان 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 (۱٤).

ز) آزمون تولید جیبرلین: 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 روماند به قیف جداکننده منتقل شد. سپس با اضافه نمودن ۱۰ میلی‌لیتر آب با اسیدیته‌ی ۱-۲، ۲۰ میلی‌لیتر اتیل‌استات به مدت ٦۰ ثانیه تکان داده شد تا کاملاً ترکیب شده و دو فاز تشکیل دهد. سپس فاز روئی 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 با طول موج ۲۵٤ نانومتر ثبت گردید (۱۵).

ح) آنالیز آماری داده‌ها: داده‌های به دست آمده برای هر متغیر، در صورت نرمال نبودن با استفاده از تبدیل آن‌ها به داده‌های مناسب، نرمال 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.

یافته‌ها

الف) نتایج شناسایی مولکولی سویه‌های باکتریایی: نتایج تعیین توالی ژن *16S rDNA* به کمک آغازگرهای اختصاصی 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 شدند. نتایج نشان داد که سویه‌های شناسایی شده با قرابت ۹۹ درصد *سودوموناس پوتیدا* هستند. از بین سویه‌های باکتریایی، ۱۰ سویه شامل *سودوموناس پوتیدا* بود. از این میان ۲ سویه از برگ، ۵ سویه از ریشه، ۱ سویه از دانه، ۲ سویه از ساقه‌های مختلف سویا رقم TMS جداسازی گردید.

ب) تولید هورمون اندول اسید استیک: میزان هورمون ایندول اسید استیک در ۱۰ سویه باکتریائی مورد مطالعه قرار گرفت.

جدول ۱: مقایسه میانگین اثر اکسین، اکسین+تریپتوفان در بین سویه‌های باکتریائی اندوفیت در سویا رقم TMS.

عوامل آزمایش	میزان اکسین	میزان اکسین + تریپتوفان
سویه ۱	5/29h	12/01ed
سویه ۲	3/20i	7/20h
سویه ۳	10/09c	12/97bc
سویه ۴	9/26e	11/54ed
سویه ۵	8/23f	10/85gf
سویه ۶	12/14a	15/14a
سویه ۷	9/60d	12/26cd
سویه ۸	11/21b	13/56b
سویه ۹	7/17g	10/42g
سویه ۱۰	8/33f	11/23egf

*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.

جدول ۲: 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	۹	٦٥/١٦٢**	٤٠/١٧٢**
خطای آزمایشی	۲۰	۰/۰٥٤	۰/۷٦
خطای نمونه برداری	٦۰	۰/۰۲	۰/۰٤
کل	۸۹		
cv		۱/۹۹	۱/۸۸

ns. *و** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول۳: نتایج تجزیه واریانس اثر میزان جیبرلین، جیبرلین + تریپتوفان بر سویه‌های باکتری‌های اندوفیت.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
		جیبرلین
اثر تیمار	۹	۰/۰۰٦٥**
خطای آزمایشی	۲۰	۰/۰۰۰۰۱۱
خطای نمونه برداری	٦۰	۰/۰۰۰۰۱٥۱۷
کل	۸۹	
ضریب تغییرات		۲/۸۱

ns. *و** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطوح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ٤: مقایسه میانگین اثر جیبرلین در بین سویه‌های باکتریایی اندوفیت در سویا.

عوامل آزمایش	میزان جیبرلین
سویه ۱	0/161b
سویه ۲	0/131c
سویه ۳	0/117e
سویه ۴	0/126d
سویه ۵	0/134c
سویه ۶	0/127d
سویه ۷	0/132c
سویه ۸	0/127d
سویه ۹	0/118e
سویه ۱۰	0/207a

*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.

تولید هورمون اندول اسید استیک در حضور تریپتوفان معادل ۷/۲ تا ۱۵/۱٤ میکروگرم در میلی‌لیتر بود (جدول ۱). نتایج تجزیه واریانس نشان می‌دهد که بین تیمارها از نظر میزان اکسین، اکسین و تریپتوفان در سطوح ۱ و ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین اثر اکسین، اکسین و تریپتوفان در جدول ۱ حاکی از آن است که بین سویه‌ها از نظر میزان تولید اکسین اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به طوری که بیش‌ترین میزان تولید اکسین مربوط به سویه ٦ با مقدار ۱۲/۱٤ و کم‌ترین آن متعلق به سویه ۲ با مقدار ۳/۲۰ می‌باشد. 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 اندول اسید استیک گردید. بیش‌ترین توانایی تولید میزان اکسین در حضور تریپتوفان مربوط به سویه ٦ با مقدار ۱۵/۱٤ و کم‌ترین متعلق به سویه ۲ با مقدار ۷/۲۰ است. نتایج تجزیه واریانس اثر میزان جیبرلین بر سویه‌های باکتری‌های اندوفیت در جدول ۳ نشان می‌دهد که بین تیمارها از نظر توانایی تولید جیبرلین در سطح ۱ و ۵ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به طوری که مقادیر تولید جیبرلین در بین تیمارها قابل ملاحظه است. بیش‌ترین میزان توانایی تولید هورمون جیبرلین مربوط به سویه ۱۰ با مقدار ۰/۲۰۷ و کم‌ترین میزان تولید هورمون جیبرلین مربوط به سویه ۳ با مقدار ۰/۱۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (جدول ٤).

بحث

سودوموناس به عنوان جنس غالب اندوفیتی با توانایی تولید ترکیبات محرک رشد در این پژوهش معرفی گردید. باکتری‌های جنس *سودوموناس* به طور وسیعی در طبیعت گسترش پیدا کرده‌اند و می‌توانند از بیش‌تر محیط‌ها جدا شوند. باکتری‌های یاد شده از لحاظ طیف متنوع متابولیت‌های محرک رشد گیاهی مانند تولید سیانید هیدروژن، تولید سیدروفور حل‌کنندگی فسفات و تولید اکسین حائز اهمیت‌اند (۵).

اومامهسواری (UmaMaheswari) و همکاران در سال ۲۰۱۳ *سودوموناس* را به عنوان باکتری اندوفیت محرک رشد در

گیاهان زراعی آرابیدوپسیس و سویا معرفی نمودند. بیش‌ترین و کمترین مقدار تولید هورمون اندول استیک اسید توسط این باکتری به ترتیب معادل ٤/٥٦ و ١/٩٣ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (١٧). در بررسی انجام شده توسط پیرتلا (Pirttila) و همکاران در سال ٢٠١١ مشخص شد که *سودوموناس فلورسنس* (*Pseudomonas fluorescens*) توانایی تولید مقادیر متغیری از اکسین را دارند (١٨).

مطالعات ازاکتان (Ozaktan) و همکاران در سال ٢٠١٥ بر روی باکتری های اندوفیت برگ، ساقه و ریشه خیار نشان داد که بیش از ٣٠ درصد جدایه ها قادر به تولید هورمون اندول اسید استیک هستند (١٩). خاکی‌پور (Khakipour) و همکاران در سال ٢٠٠٨ گزارش کردند که ٧٢ درصد از سویه‌های *سودوموناس* توانایی تولید ترکیبات اکسین را دارا هستند (٢٠). جسیم (Jasim) و همکاران در سال ٢٠١٤ موفق به شناسایی باکتری اندوفیت سودوموناس از ریزوم زنجبیل گردیدند. سویه های شناسایی شده قادر به تولید اندول اسید استیک بودند (٢١). شکری (Shokri) و امتیازی (Emtiazi) در سال ٢٠١٢ با روش کروماتوگرافی لایه نازک موفق به خالص سازی اندول استیک اسید گردیدند. بهترین سویه مربوط به نخود بود. به طوری که مقدار تولید هورمون اندول استیک اسید معادل ٤٣٩ ppm بود. آنها دریافتند که بیش‌ترین مقدار این هورمون در دمای ٣٠ درجه سلیسیوس تولید می‌گردد. همچنین استفاده از مانیتول به عنوان منبع کربن و نیترات پتاسیم به عنوان منبع نیتروژن در حضور ٣ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تریپتوفان، بهترین شرایط ممکن برای تولید ماکزیمم هورمون اندول اسید استیک در شرایط آزمایشگاهی است (٢٢).

در مطالعه حاضر بیش‌ترین توانایی تولید میزان اکسین در حضور تریپتوفان مربوط به سویه ٦ با مقدار ١٥/١٤ و کم‌ترین متعلق به سویه ٢ با مقدار ٧/٢٠ بود. تریپتوفان، تریپتامین، ایندول ٣ پیرویک اسید و ایندول ٣ استامید به عنوان پیش‌ماده‌های تولید اکسین، به شمار می‌روند و حضور آن ها در افزایش تولید این هورمون توسط باکتری‌ها موثر است. این امر در مطالعه حاضر نیز تایید گردید. تولید اکسین، به خصوصیات ژنوتیپی ریزموجودات، میزان رشد باکتری، فعالیت‌های متابولیکی، بیان ژنی که مسئول کد کردن آنزیم درگیر در بیوسنتز IAA، ثابت سنتیکی ریزموجودات و محیط کشت باکتری بستگی دارد (٢١). باکتری‌های از نظر میزان تولید هورمون‌های IAA اکسیداز و IAA پراکسیداز با همدیگر اختلاف دارند و این امر بر توانائی تجزیه تولید این هورمون اثر می‌گذارد. اختلاف در مقدار هورمون‌های تولیدی احتمالاً به توانایی متفاوت باکتری‌ها در تولید این قبیل آنزیم‌ها مرتبط است (٢٢).

اگر چه در ارتباط با توانائی باکتری‌های اندوفیت از نظر میزان تولید جیبرلین، مطالعات زیادی صورت نگرفته‌است، اما گزارش‌ها و تحقیقات دانشمندان مختلف هم‌چون امامهسواری (UmaMaheswari) و همکاران نقش باکتری های اندوفیت را در تولید هورمون جیبرلین به خوبی ثابت می کند (١٧). به طوری که بیش‌ترین مقدار تولید هورمون اسید جیبرلیک معادل ٢/٦٤ و کم‌ترین مقدار معادل ٠/٨٣ بود. تحقیقات خان (Khan) و همکاران در سال ٢٠١٤ حاکی از آن بود که تولید جیبرلین در باکتری *اسفینگوموناس* (*Sphingomonas* sp Lk_{11}) به میزان معنی‌داری بیش از باکتری *بورخولدریا سپاسیا* (*B.cepacia* SE_4) است (٢٣). ریزو باکتری‌هائی هم‌چون *ریزوبیوم فاسئولی* (*Rhizobium phaseoli*) قادر به تولید هورمون‌های مشابه با جیبرلین هم‌چون GA_9 و GA_{20} و ایندول اسید استیک در محیط کشت می‌باشد.

سویه های دیگری مانند *باسیلوس پومیلوس* (*Bacillus pumilus*)، *باسیلوس لیکنی فورمی* (*Bacillus licheniformis*) ، *باسیلوس سرئوس* (*B. cereus*)، *باسیلوس مایکرویدس* (*B. macroides*) و *باسیلوس پومیلوس* قادر به تولید هورمون جیبرلین هستند (٢٤).

جو (Joo) و همکاران برای اولین بار در سال ٢٠٠٤ در مطالعات خود ثابت نمودند که باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *باسیلوس مایکروئیدس* و *باسیلوس پومیلوس* قادر به تولید انواع متفاوتی از هورمون جیبرلین مانند GA_5، GA_8، GA_{34}، GA_{44}، GA_{53} هستند. به علاوه باکتری *ازتوباکتر کروکوم* (*Azotobacter chroococeum*) و باکتری *بورخولدریا سپاسیا*

(*B. cepacia*) قادر به تولید جیبرلین می‌باشند (۲۵). اوتینو (Oteino) و همکاران ۲۰۱۵ بیان نمودند که باکتری *سودوموناس* قادر به تولید مقادیر ١٤ تا ١٦٩ میلی‌مولار اسید جیبرلیک است (٢٦).

اعتصامی (Etesami) و علیخانی (Alikhani)، مقدار هورمون های محرک رشد تولید شده توسط باکتری را تابعی از گونه، سویه باکتری، نوع محیط کشت مورد استفاده و شرایط کشت باکتری گزارش کردند (۲۷). از مقایسه مطالعات پیشین با پژوهش حاضر چنین برداشت می‌شود که جمعیت باکتری‌های اندوفیت در بافت‌های گیاهی ناهمگن است. به طوری که اختلافاتی در فراوانی جنس‌های مختلف باکتری‌های اندوفیت در بافت‌های گیاهی ملاحظه شده است که حتی بسته به فصل مطالعه نتایج متغیر بوده است (۲۸).

توانایی تولید متابولیت‌ها و ترکیبات محرک رشد، تحت تاثیر نوع باکتری، دمای رشد، ژنتیک گیاه میزبان، شرایط متفاوت اقلیمی، میزان دی اکسید کربن، گرما و خشکی خاک قرار می‌گیرد (۲۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، باکتری‌های اندوفیت *سودوموناس پوتیدا* 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.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Schulz B, Boyle C. What are endophytes. In: Schulz B, Boyle C, Sieber TN, editors. Microbial Root Endophytes. Springer-Verlag, Berlin; 2006: 1–13.

2. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol. 1997; 43: 895-914.

3. Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism plant signaling. FEMS Microbiol Rev. 2007; 31: 425-448.

4. Ali SZ, Sandhya V, Grover M, Kishore N, Rao LV, Venkateswarlu B. *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. Biol Fert Soils. 2009; 46: 45-55.

5. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes. Curr Opin Plant Biol. 2011; 14: 435-443.

6. Martin DN, Proebsting WM, Hedden P. Mendels dwarfing gene: cDNAs from the Le alleles and function of the expressed proteins. Proc. Natl Acad Sci USA. 1997; 94: 8907-8911.

7. Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiol Mol Biol Rev. 2003; 67: 491-502.

8. Kobayashi DY, Palumbo JD. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in |agriculture. In: Bacon CW, White JF, editors. Microbial endophytes. Marcel Dekker, New

York; 2000: 199-233.

9. Wilcox JR. Soybean: Improvement, productions and uses. Madison, Wisconsin, USA; 1987.

10. Jasim B, Joseph AA, John CJ, Mathew J, Radhakrishnan EK. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. Biotechnol J. 2014; 3(4): 197-204.

11. Schaad NW. Initial identification of common genra. In: Schaad NW, Jones JB, Chun W, editors. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society; 2001: 1-15.

12. Sambrook J, Russell, DW. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 2001.

13. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991; 173: 697-703.

14. Rahman A, Sitepu IR, Tang SY, Hashidoko Y. 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. Biosci Biotechnol Biochem. 2010; 74: 2202-2208.

15. Hidayati U, Chaniago IA, Munif A, Andreas Santosa S, Andreas Santosa S. Potency of plant growth promoting endophytic bacteria from rubber plants (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). J Agron. 2014; 13: 147-152.

16. UmaMaheswari T, Anbukkarasi K, Hemalatha T, Chendrayan K. Studies on phytohormone producing ability of indigenous endophytic bacteria isolated from tropical legume crops. Int J Current Microbiol Appl Sci. 2013; 2: 127-136.

17. Panchal H, Ingle S. Isolation and characterization of endophytes from the root of medicinal plant *Chlorophytum borivilianum* (*Safed musli*). J Adv Dev Res. 2011; 2: 205-209.

18. Pirttila AM. Endophytic bacteria in tree shoot tissues and their effects on host. In: Pirttila AM, Frank AC, editors. Endophytes of forest trees. Springer Science and Business; 2011: 139-172.

19. Ozaktan H, Caklr B, Gul A, Yolageldi L, Akkopru A, Fakhraei D, Akbaba M. Isolation and evaluation of endophytic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* infecting cucumber plants. Austin J Plant Biol. 2015; 1: 1003-1009.

20. Khakipour N, Khavazi K, Mojallali H, Pazira E, Asadirahmani H. Production of auxin hormone by fluorescent *Pseudomonads*. Am Eurasian J Agric Environ Sci. 2008; 4: 687-692.

21. Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A. Relationship between in invitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea L*. Biol Fertil Soils. 2002; 35: 231-237.

22. Shokri D, Emtiazi G. Purification and optimization of auxin (Indole-3-Acetic Acid) hormone in Rhizobium Bacterium. Iran Biol J. 2012; 25(2): 194-204. [In Persian]

23. Khan AL, Waqas M, Kang SM, Al-Harrasi A, Hussain J, Al-Rawahi A, Al-Khiziri S, Ullah I, Ali L, Young Jung H, Lee IJ. Bacterial Endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 Produces Gibberellins

and IAA and Promotes Tomato Plant Growth. J Microbiol. 2014; 52(8): 689-695.

24. Kang SM, Khan AL, Waqas M, You YH, Kim JH, Kim JG, Hamayun M, Lee IJ. Plant growth promoting *rhizobacteria* reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. J Plant Interact. 2014; 9(1): 673-682.

25. Joo GJ, Kim YM, Lee IJ, Song KS, Rhee IK. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*. Biotechnol Lett. 2004; 26: 191-487.

26. Oteino N, Lally RD, Kiwanuka S, Lioyd A, Ryan D, Germaine KJ, Dowling DN. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. Front Microbiol. 2015; 6: 1-9.

27. Etesami H, Alikhani HA. The quantitative and qualitative assessment of auxin hormone production ability of same of the Iranian soils indigenous Rhizobial strains. J Water Soil. 2011; 25(1): 61-69. [In Persian]

28. Drigo B, Kowalchuk GA, Van Veen JA. Climate change goes underground: effects of elevated atmospheric CO_2 on microbial community structure and activities in the rhizosphere. Biol Fertil Soils. 2008; 44: 667-679.

29. Kuklinsky-Sobral J, Araujo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environ Microbiol. 2004; 6: 1244-1251.

Journal of Microbial World
Volume 9, No. 3, September 2016

Original Article

Evaluation of gibberellin and auxin production ability by endophytic bacteria *Pseudomonas putida* in soybean TMS cultivar

Faegheh Etminani[1], Adibeh Etminani[2], Shole Darvishi[3]

[1]MS.c., Young Researchers and Elite Club, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[2]Ph.D. student, Department of Agronomy, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Food Science & Technology, Sanandaj branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Abstract

Background & Objectives: 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 study was conducted to determine plant growth promoting affects of endophytic bacteria associated with Soybean (cultivar TMS).

Materials & Methods: In order to isolate endophytic bacteria from various parts of soybean (cultivar TMS), samples were collected from the farm of Islamic Azad University of Sanandaj. 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.

Results: The isolated bacteria were able to produce IAA in various amount 3.2 -12.14 µg/ml without tryptophan and in the presence of it, 7.2 -15.14 µg/ml. GA producing abilities were also 0.11-0.20 µg/ml for these isolates. Based on the *16S rDNA* sequence, the isolated bacteria was belonged to *Pseudomonas putida* with 99% similarity.

Conclusion: This study is the first report of isolation of *P. putida* from Soybean (TMS cultivar). The endophytic bacteria isolated in this study can be used to promote plant growth.

Keywords: Endophytic bacteria, *Pseudomonas putida*, Soybean.

Correspondence to: Faegheh Etminani

Tel: +98 8733241173

E-mail: agriculture.student@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 9(3): 226-235.