پانزدهمین کنگره علوم خاک ایران

۶ تا ۸ شهریور ۱۳۹۶ محور مقاله: بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک

تعیین شرایط بهینه تولید هورمون اکسین در باکتری *باسیلوس*

سمیه امامی*، حسینعلی علیخانی، احمدعلی پورابایی، حسن اعتصامی، فریدون سرمدیان و بابک متشرع‌زاده

گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

Email: emamisomaye@ut.ac.ir

چکیده

انیدول- ۳- استیک اسید (IAA) یکی از مهمترین هورمون های گیاهی است که توسط بسیاری از ریزسازواره‌ها تولید می‌شود. جهت تعیین شرایط بهینه تولید هورمون IAA تعداد ۱۰۰ جدایه از خاک ریزوسفری گندم جداسازی شده و تولید IAA در آنها بررسی شد. نتایج حاصل از آزمون تولید IAA در محیط رشدی حاوی یک میلی‌گرم بر میلی لیتر ال تریپتوفان نشان داد که ۸۸ درصد باکتری‌های ریزوسفری دارای توان تولید اکسین هستند. سپس تاثیر غلظت‌های مختلف تریپتوفان، دوره گرماگذاری، منبع کربن و نیتروژن و شرایط محیطی در تولید IAA توسط سویه *باسیلوس* که دارای بهترین راندمان تولید هورمون IAA بود، مورد بررسی قرار گرفت. زمان گرماگذاری به مدت ۹۶ ساعت، تحت دمای ۳۲ درجه سانتیگراد، استفاده از ساکاروز به عنوان منبع کربن و عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن در حضور ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تریپتوفان، بهترین شرایط ممکن برای تولید ماکزیمم هورمون IAA در شرایط آزمایشگاهی شناخته شد.

واژه های کلیدی: انیدول- ۳- استیک اسید، ال تریپتوفان، *باسیلوس*

مقدمه

هورمون اکسین یکی از مهمترین عوامل تحریک کننده رشد در گیاهان می‌باشد و طیف گسترده‌ای از واکنش‌های رشد و نموی را در آنها سبب می‌شود. اما توان بیوسنتز اکسین تنها محدود به گیاهان عالی نمی‌باشد، ثابت شده است که ریزسازواره‌های مختلف شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و حتی جلبک‌ها نیز توانایی بیوسنتز اکسین را دارند (Patten and Glick, 1996). مطالعات زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد ریزسازواره‌های متعددی در سنتز اکسین در کشت‌های خالص و خاک درگیرند (Vessey, 2003). طیف وسیعی از ریزسازواره که در ارتباط نزدیک با گیاهان هستند، توانایی دارند که سطوح هورمون‌ها را در بافت‌های گیاهی تغییر دهند. آنها ممکن است یا پیش ماده هورمون‌ها را سنتز و یا فیتوهورمون‌های مشابه را تولید و ترشح کنند. تخمین زده شده است که ۸۰ درصد از باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر توان تولید تنظیم‌گر رشد گیاهی ایندول- ۳- استیک اسید را دارند. عموماً ریزوباکتری‌های مستقر در ریزوسفر و ریزوپلان در مقایسه با خاک‌های غیر ریزوسفری توانایی بیشتری در بیوسنتز اکسین‌ها از خود نشان می‌دهند.

تولید مقادیر بیشتر اکسین در ریزوسفر به احتمال زیاد ناشی از فراوانی ترکیبات آلی متفاوت و جمعیت‌های متنوع میکروبی می‌باشد. اصغر و همکاران (۲۰۰۲) توانایی تولید هورمون‌های اکسین توسط ریزوباکتری‌های جدا شده از ریزوسفر گونه‌های مختلف شلغم روغنی را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. ایزوله‌های مورد بررسی در این آزمون توانایی‌های متفاوتی در تولید IAA (از ۰/۳۳ تا ۱۱/۴ میکروگرم در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری) از خود نشان دادند (Asghar et al., 2002). تولید مقدار بسیار جزئی از مواد شبه جیبرلینی و هورمون‌های دیگر علاوه بر IAA نیز در تعدادی از ریزموجودات شناسایی شده است. ولی بطور کلی نتایج حاصل از مطالعات مختلف نشان می‌دهد که سنتز IAA در بین ریزموجودات ریزوسفری نسبت به تولید ترکیبات شبه جیبرلینی متداولتر و بیشتر است (Laslo et al., 2012). هورمون‌های

گیاهی نقش حیاتی در کنترل رشد گیاهان دارند. تولید فیتوهورمون به عنوان محتمل‌ترین مکانیسم افزایش رشد گیاه توسط انواع ریزوباکتری های محرک رشد گیاه PGPR[1] در نظر گرفته می‌شود.

نتایج حاصل از آزمایش گلخانه‌ای بر روی جدایه‌های مولد IAA نشان می‌دهد که تلقیح گیاه شلغم روغنی با این جدایه‌ها موجب افزایش معنی‌داری در شاخص‌های رشد همچون ارتفاع گیاه (تا ۵۶/۶٪)، قطر ساقه (تا ۱۱٪) ،تعداد غلاف‌ها در گیاه (تا ۲۶/۷٪) و عملکرد دانه (تا ۴۵/۵٪) نسبت به گیاهان شاهد تلقیح نشده گردیده است (Vessey, 2003). همچنین بکارگیری PGPR موجب افزایش چشمگیری در عملکرد محصولاتی مثل برنج، گندم، ذرت و سیب زمینی شده است (Vessey, 2003). بطور کلی، مهمترین مکانیسمی که بهتر می‌تواند اثر تحریک کنندگی رشد گیاه توسط انواع مختلف PGPR را توضیح دهد همان تولید فیتوهورمون ایندولی IAA می‌باشد که نتیجه آن توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه و به دنبال آن افزایش جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه و افزایش رشد می‌باشد (Glick, 2012). بنابراین با توجه به آنچه که ذکر شد بررسی شرایط بهینه تولید هورمون IAA دارای اهمیت زیادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق به منظور جداسازی باکتری‌های محرک رشد گیاه گندم، نمونه برداری از خاک ریزوسفری گندم انجام شد. نمونه‌ها تا قبل از فرایند جداسازی باکتری در دمای 4^{o} C نگهداری شدند و در کوتاه‌ترین زمان بعد از نمونه‌برداری مراحل جداسازی انجام گرفت. به منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری ۱۰ گرم خاک ریزوسفری به ارلن های حاوی ۹۰ میلی لیتر بافر فسفات استریل منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شد. پس از تهیه رقت‌های ده دهی[2] از نمونه، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های 10^{-4} تا 10^{-8} بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت NA پخش گردیدند. پلیت‌های تلقیح شده به صورت واژگون به مدت ۳ الی ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند و کلنی‌های ظاهر شده بر روی پلیت‌ها جدا سازی شدند. مراحل خالص‌سازی این جدایه‌ها پس از کشت مجدد روی همان محیط از طریق بازکشت انجام گرفت.

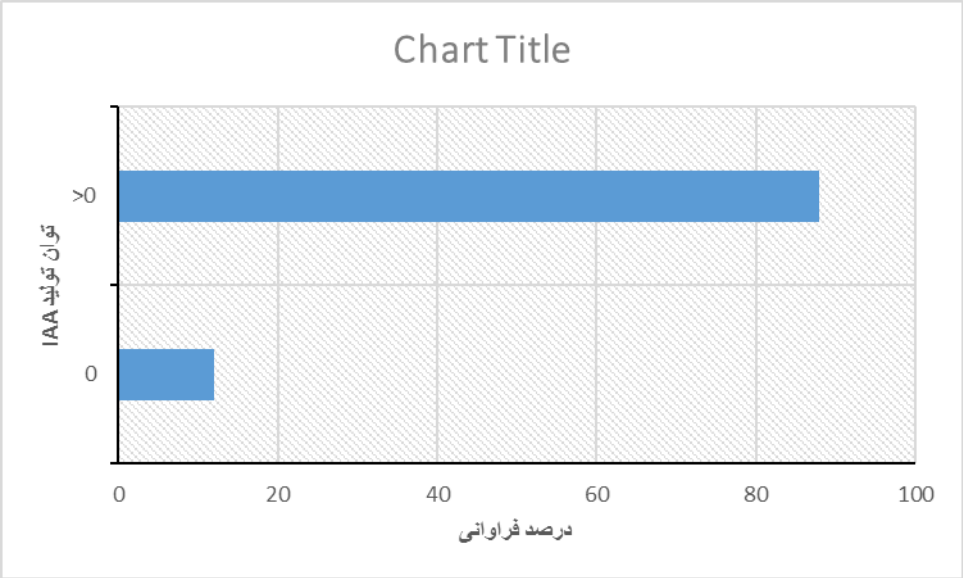
اندازه‌گیری کمی تولید IAA نیز به روش بریک در محیط کشت مایع با استفاده از محلول سالکوفسکی با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت (Brick et al., 1991). برای انجام این آزمون درون هر ظرف ارلن مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال تریپتوفان ریخته شد و پس از استریل، محتوی هر ارلن با یکی از جدایه‌های مورد نظر تلقیح 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 ۳۰ درجه سانتی‌گراد بر روی بهم زدن دورانی با سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه هوادهی و گرماگذاری[3] شدند. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون‌های مذکور سانتریفیوژ گردیدند. سپس محلول رویی با معرف سالکوسکی به نسبت ۱:۱ با هم مخلوط گردید محلول حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه‌ی جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر IAA محاسبه گردید.

بعد از بررسی سویه‌های مختلف، یک سویه باکتری که دارای بهترین راندمان تولید هورمون بود، جهت انجام مراحل بهینه‌سازی برای تولید این هورمون انتخاب شد. تاثیر پیش ماده تریپتوفان در تولید IAA در شش سطح (صفر تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، منبع کربن در چهار سطح (گلوکز، ساکارز، لاکتوز و فروکتوز)، منبع نیتروژن (پپتون، سویابن ، عصاره مخمر و تریپتون)، زمان گرماگذاری به مدت پنج روز (اندازه گیری روزانه)، دمای محیط کشت در شش سطح (۳۸، ۳۵، ۳۲، ۲۹، ۲۶، ۲۳ درجه سانتیگراد) و pH محیط کشت در شش سطح (۹و ۸، ۷، ۶، ۵، ۴) مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت نتایج در قالب طرح فاکتوریل با سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

[1] Plant growth promoting rhizobacteria
[2] Ten fold
[3] Incubation

نتایج.

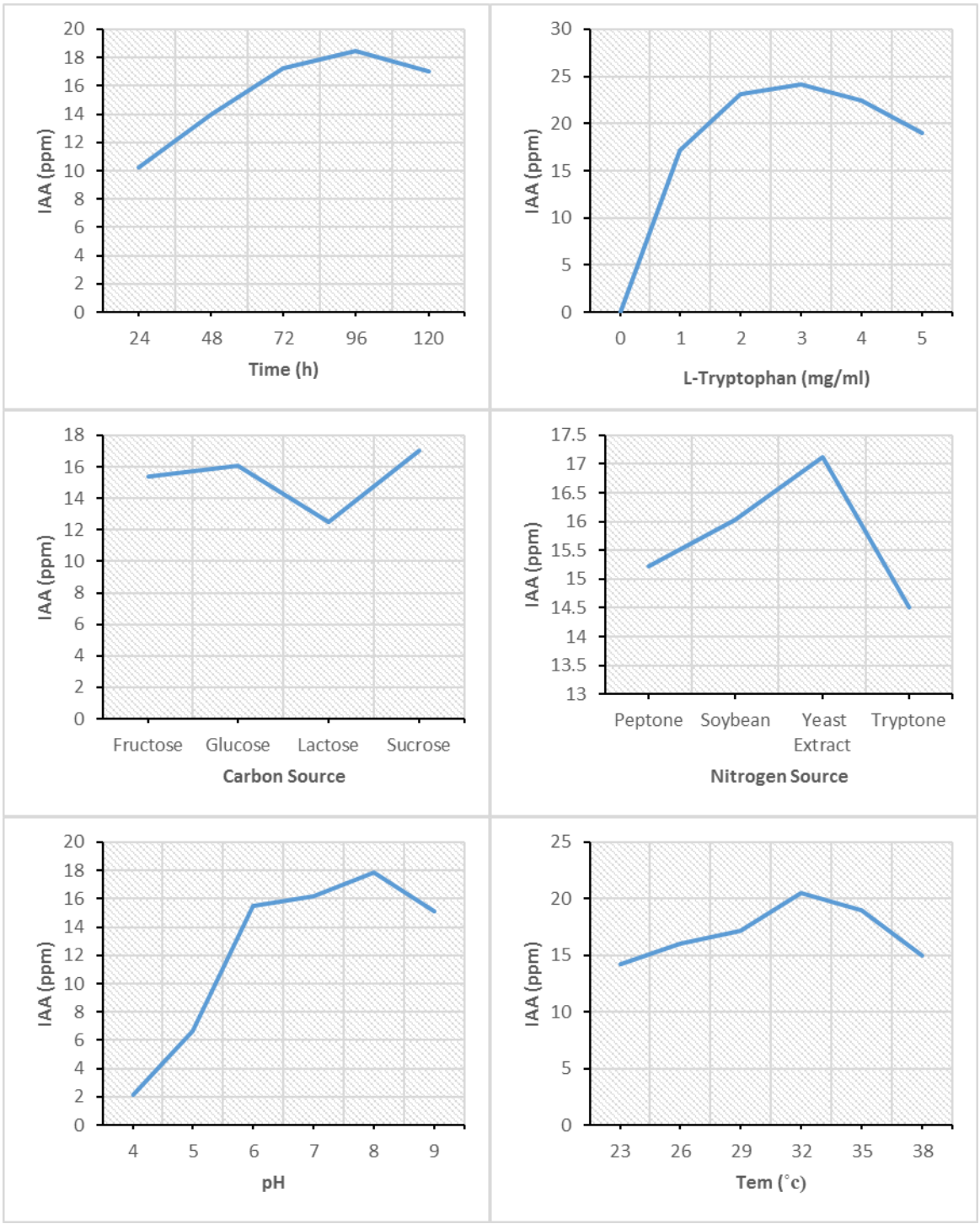
تعداد ۱۰۰ جدایه ریزوسفری با خصوصیات ظاهری متفاوت در محیط NA جداسازی و خالص سازی شدند. نتایج حاصل از آزمون تولید IAA در محیط رشدی حاوی یک میلی‌گرم بر میلی لیتر ال تریپتوفان نشان داد که ۸۸ درصد باکتری‌های ریزوسفری دارای توان تولید اکسین هستند (شکل۱). گزارش شده است که ۸۰ درصد از باکتری‌های ریزوسفری، توانایی تولید اکسین را دارند که برای تولید آن از ال- تریپتوفان به عنوان پیش ماده استفاده می‌کنند (Asghar et al., 2004).



شکل۱- درصد فراوانی باکتری های مولد هورمون IAA توسط سویه‌های ریزوسفری

بعد از بررسی سویه‌های مختلف، یک سویه باکتری (متعلق به جنس *باسیلوس*) که دارای بهترین راندمان تولید هورمون IAA بود، جهت انجام مراحل بهینه‌سازی برای تولید این هورمون انتخاب شد. اثر ۶ عامل مقدار تریپتوفان، مدت زمان گرماگذاری، منبع کربن، دما، منبع نیتروژن و pH در تولید IAA در شکل ۲ آورده شده است. شرایط بهینه برای تولید IAA در غلظت ۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان در انتهای روز چهارم در دمای ۳۲ درجه سانتیگراد و در pH برابر ۸ در حضور عصاره مخمر و ساکارز به ترتیب به عنوان منبع نیتروژن و کربن در محیط کشت تعیین شد. تریپتوفان برای تولید هورمون اکسین یک پیش ماده محسوب می‌شود و با افزایش غلظت تریپتوفان میزان تولید IAA افزایش می‌یابد با این وجود در غیاب تریپتوفان (سطح صفر) نیز مقدار کمی اکسین تولید می‌شود که نشانگر وجود مسیرهای مستقل از تریپتوفان در تولید اکسین است. در غلظت‌های بیش از ۳ میکروگرم بر میلی لیتر تریپتوفان میزان تولید هورمون تا حدودی روند کاهشی در پیش می‌گیرد که نشان می‌دهد تولید هورمون IAA ارتباط مستقیم با غلظت پیشروی سنتز آن یعنی تریپتوفان ندارد و در میزان بالای غلظت تریپتوفان این باکتری قادر نیست مقادیر بالایی از هورمون IAA را تولید کند بلکه یک غلظت بهینه برای تولید حداکثر مورد نیاز می‌باشد. احتمالاً مقدار بالای تریپتوفان بازدارنده تولید هورمون به صورت فیدبک منفی است. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط اسریدوی و همکاران (۲۰۰۷) و نیز داتا و همکاران (۲۰۰۰) مطابقت دارد. از نظر دوره گرماگذاری، در پایان روز چهارم حداکثر تولید IAA مشاهده شد که پس از آن سطح هورمون کاهش می‌یابد. این کاهش میزان هورمون می‌تواند در اثر تولید آنزیم‌های تجزیه کننده IAA مثل IAA اکسیداز و یا IAA پراکسیداز باشد که بعد از زمان ۹۶ ساعت از باکتری ترشح می‌شود و سبب تجزیه شدن IAA و کم شدن میزان آن در محیط می‌شود (Datta and Basu, 2000). نتایج حاصله همچنین نشان داد دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد در آزمون دمای بهینه گرماگذاری نسبت به دماهای دیگر بکار رفته مناسبترین دما بوده است. خامنا و همکاران (۲۰۱۰) دمای ۳۰ درجه و pH ۷ را شرایط بهینه جهت تولید هورمون IAA توسط باکتری *استرپتومایسس* گزارش کرده‌اند (Khamna, et al., 2010). همچنین یورکلی و همکاران (۲۰۰۳) ماکزیمم تولید

IAA را در pH ۷/۵ گزارش کرده‌اند (Yurekli et al., 2003). در نهایت می‌توان گفت که در این تحقیق جداسازی و بهینه سازی تولید هورمون انیدول- ۳ -استیک اسید در باکتری *باسیلوس* از ریزوسفر گیاه گندم به انجام رسید.



شکل ۲- اثر ۶ عامل غلظت تریپتوفان، مدت زمان، منبع کربن و نیتروژن، دما و pH در سطوح مختلف در تولید هورمون IAA

منابع

Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M, Khaliq A (2002) Relationship between in ritro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in brassicajunceal. Biol Fertil Soils 35:231-237.

Asghar HN. Zahir ZA. Arshd M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yeild and oil content of canola (Brassica nappus L.). Aust J Agr Res. 55:187-194.

Brick JM. Bostock RM. Silverstone S.E. 1991. Rapid in-situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on nitrocellulose membrane. Appl. Environ. Microbiol. 57, 535–538.

Datta, C. and Basu, PS. 2000. Indole acetic acid production by a Rhisobium species from root nodules of a leguminoue shrub. Microbiol. 155: 123-127.

Glick BR (2012) Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica 2012:1- 15.

Khamna, S., Yokota, A., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. (2010) Indole-3-acetic acid production by Streptomyces sp. isolated from some Thai medicinal plant rhizosphere soils. EurAsia J Biosci 4, 23–32.

Laslo E, György E, Mara G, Tamás Eea (2012) Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. Crop Prot 40:43–48.

Patten C, Glick B (1996) Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can J Microbiol 42:207–220

Sridevi, M., and Mallaiah, K. V. 2007. Production of indole-3-acetic acid by Rhizobium isolates from sesbania species. African Journal of Microbiology Research. 1(7): 125-28.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255:571–586.

Yurekli F, Geckil H, Topcuoglu F. The synthesis of indole-3-acetic acid by the industrially important white-rot fungus Lentinus sajorcaju under different culture conditions. Mycol Res. 2003; 1 07: 305-309.

Determination of the optimum conditions for the production of IAA in *Bacillus*

S. Emami, H. A. Alikhani, A.A. Pourbabaei, H. Etesami, F. Sarmadian, B. Motashare zadeh
Department of Soil Science, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
Email: emamisomaye@ut.ac.ir

Abstract

The indole-3-acetic acid (IAA) is one of the most important plant hormone that produces by many microorganisms. To determine the optimum conditions for the IAA production, 100 strains were isolated from wheat rhizosphere and their IAA production ability was investigated. The results of the IAA production test in growth medium containing 1 mg /ml L-tryptophan showed that 88 percent of rhizospheric bacteria are able to produce auxin. The effect of L-tryptophan concentration, incubation period, carbon and nitrogen sources and environmental conditions in the production of IAA by Bacillus strain (with high efficiency) was studied. The time of incubation for 96 hours under 32 ° C, using sucrose as a carbon source and yeast extract as the nitrogen source in the presence of 3 mg L-tryptophan, were the optimum condition for production of IAA in vitro.

Keywords: Indole-3 Acetic Acid, L-Tryptophan, *Bacillus*