محور مقاله: بیولوژی خاک و کودهای زیستی

جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ایندول استیک اسید از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری

اسماعیل بخشنده[۱*]، سید محمد علوی[۱]، مهدی حسینی[۲]، مجتبی زراعت‌پیشه[۳]

[۱] پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[۲] گروه علوم خاک دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

[۳] گروه علوم خاک دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی رامین، اهواز، ایران

چکیده

پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولیدکننده ایندول استیک اسید (IAA) از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری اجرا گردید. تعداد ۱۰۸ نمونه خاک (عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر) در بهمن‌ماه سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. برای تعیین باکتری‌های تولیدکننده IAA از معرف سالکوسکی و روش اسپکتوفتومتری (قرائت در طول موج ۵۳۰ نانومتر) استفاده گردید. از مجموع ۱۲۰ جدایه به‌دست آمده از این اراضی حدود ۶۱/۷ درصد (۷۴ جدایه) قابلیت تولید IAA در محیط کشت LB مایع حاوی ۰/۱ درصد اسیدآمینه تریپتوفان را داشتند. توانایی تولید IAA این جدایه‌ها از ۲ تا ۲۷/۱ میلی‌گرم در لیتر بعد از گذشت سه روز در دمای ۱±۲۹ درجه سلسیوس متغیر بود. جدایه‌های IAA3 و IAA13 با میزان تولید IAA به‌ترتیب ۱۶/۸ و ۲۷/۱ میلی‌گرم در لیتر انتخاب و شناسایی شدند. بلاست توالی‌ها نوکلئوئیدی 16S rDNA نشان داد که دو جدایه برتر بیش از ۹۹ درصد به‌ترتیب به باکتری‌های *Vogesella indigofera* و *Ensifer* sp. شباهت داشتند. این جدایه‌ها می‌توانند به‌عنوان نماینده‌های مناسبی از باکتری‌های افزاینده رشد در تولید کودهای زیستی جهت استفاده در سیستم‌های کشاورزی پایدار مبتنی بر محیط زیست مد نظر قرار گیرند.

کلمات کلیدی: باکتری تولیدکننده ایندول استیک اسید ، باغات مرکبات، ، جنگل، مزارع برنج، مزارع خشکه‌کاری

مقدمه

تولید اکسین (ایندول استیک اسید/IAA) به عنوان یک متابولیک ثانویه توسط بسیاری از باکتری‌های جداسازی شده از منطقه ریزوسفر ریشه گیاهان مختلف گزارش شده است (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۴). به‌طور کلی، IAA ترشح‌شده توسط باکتری‌های ریزوسفری ممکن است بر بسیاری از فرایندهای رشد و نمو گیاه مانند تقسیم سلولی، رشد و تمایز، تحریک بذر و جوانه‌زنی، افزایش رشد و نمو ریشه، کنترل فرایندهای رشد رویشی، تشکیل ریشه‌های فرعی و مویین، واکنش به نور، زمین، فلورسانس، فتوسنتز، تشکیل رنگدانه، تولید متابولیت‌های مختلف و ایجاد مقاومت به شرایط تنش‌زا تأثیرگذار باشد (Ahemad and Kibret, 2014؛ Rivera و همکاران، ۲۰۱۸). IAA ممکن است به عنوان یک مولکول دوگانه بر برخی از مسیرهای علامت‌دهی (Signaling) اثر گذاشته و بیان ژن در برخی از میکروارگانیسم‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر این، کاهش غلظت IAA به عنوان یک علامت با مکانیسم دفاعی گیاه در برابر تعدادی از باکتری‌های بیماریزای گیاهی ارتباط داشته به طوری که در این زمان افزایش حساسیت گیاهان به بیمارگرهای باکتریایی توسط کاربرد خارجی IAA یا IAA تولیدشده توسط بیمارگر به اثبات رسیده است (Spaepen and Vanderleyden, 2011). حضور IAA می‌تواند باعث افزایش سطح و طول ریشه و در نتیجه افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه شود. همچنین، افزایش غلظت اکسین در منطقه ریشه باعث نرم‌شدن دیوارهای سلولی ریشه و در نتیجه افزایش ترشحات ریشه گیاه میزبان شود. افزایش ترشحات خود باعث سهولت و افزایش دسترسی باکتری‌های موجود در منطقه ریزوسفر به عناصرغذایی و در نتیجه افزایش رشد و جمعیت آن‌ها خواهد شد (Glick, 2012).

*ایمیل نویسنده مسئول: e.bakhshandeh@sanru.ac.ir & bakhshandehesmail@gmail.com

بیشتر گونه‌های ریزوبیوم قادر به تولید IAA می‌باشند (Ahemad and Khan, 2011). در لگوم‌ها غلظت IAA تعیین‌کننده میزان تشکیل گره در ریشه حبوبات می‌باشد (Spaepen و همکاران، ۲۰۰۷؛ Glick, 2012). در زمان تلقیح گیاه ماش با باکتری *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* توانایی تثبیت نیتروژن گیاه نسبت به گیاهان شاهد افزایش یافته بود (Camerini و همکاران، ۲۰۰۸). علت این افزایش به توانایی تولید IAA توسط این باکتری نسبت داده شده است. تاکنون، جنس‌های مختلفی از باکتری‌ها از قبیل *Acinetobacter*، *Rhizobium*، *Enterobacter*، *Azotobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Bradyrhizobium* به‌عنوان باکتری‌های تولیدکننده IAA در دنیا جداسازی و به ثبت رسیدند (Bakhshandeh و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ahemad and Kibret, 2014). کارایی این باکتری‌های به تعامل بین باکتری و خصوصیات خاک منطقه جداسازی شده (گیاه میزبان) وابسته است. بنابراین، بهتر است برای یافتن باکتری‌هایی با توانایی بالاتر، نمونه‌برداری‌هایی متناسب با منطقه و گیاهان هدف آن منطقه انجام و جدایه‌های پر جمعیت و دارای توانایی بالاتر انتخاب گردند که از اهداف اصلی مطالعه حاضر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

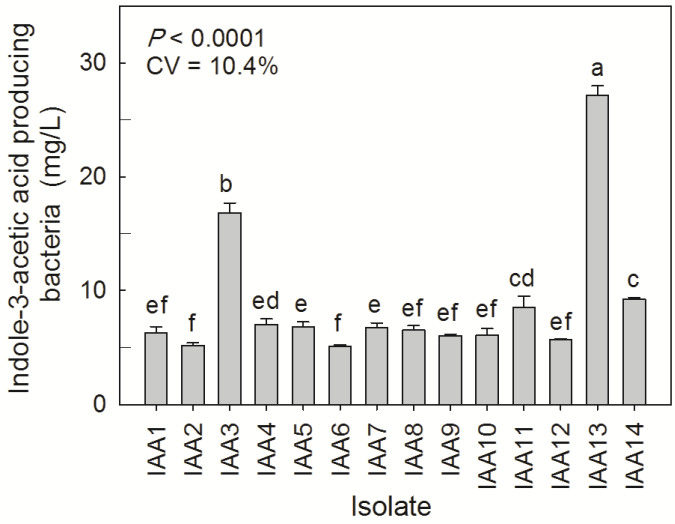
تعداد ۱۰۸ نمونه خاک از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری در بهمن‌ماه سال ۱۳۹۶ جمع‌آوری شد. این اراضی شامل جنگل، باغات مرکبات، مزارع برنج و اراضی خشکه‌کاری بودند. نمونه‌برداری از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متر انجام و نمونه‌های درون کیسه‌های پلاستیکی استریل قرار گرفته و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان منتقل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا انجام مراحل بعدی آزمایش نگهداری شدند. برای جداسازی باکتری‌ها، ابتدا پنج گرم خاک از هر نمونه به ۴۵ میلی‌لیتر آب نمک استریل (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد) در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری (استریل شده) اضافه و سوسپانسیونی به نسبت (۱:۹) تهیه گردید. سوسپانسیون‌ها به مدت دو ساعت روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) و در دمای اتاق تکان داده شد. در پایان، رقت‌دهی تا 10^{-4} و 10^{-5} در آب مقطر استریل انجام شد. از هر رقت به مقدار ۶۰ میکرولیتر با دو تکرار بر روی تشتک‌های (با قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت آگار غذایی سوکروزدار (NAS) پخش شد. تشتک‌ها در دمای ۱±۲۹ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شده و جداسازی باکتری‌ها بر اساس اندازه، رنگ و ارتفاع کلنی، ۴۸ ساعت بعد از زمان کشت انجام شد.

برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده IAA، از روش پیشنهاد شده توسط Bakhshandeh و همکاران (۲۰۱۴) استفاده گردید. به این صورت که هر ایزوله به طور جداگانه در محیط کشت مایع LB حاوی ۰/۱ درصد از اسیدآمینه تریپتوفان با سه تکرار کشت داده شد. پس از کشت باکتری در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) و در دمای ۱±۲۹ درجه‌سانتی‌گراد، ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت از هر فالکون برداشته و به فالکون‌های جدید ۱۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس برای رسوب باکتری در محیط کشت، فالکون‌های به مدت ۵ دقیقه، در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. بعد از سانتریفوژ، یک میلی‌لیتر از روشناور برداشته و با دو میلی‌لیتر محلول سالکوسکی (۱ میلی‌لیتر محلول کلریدآهن(III) نیم مولار در ۵۰ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۳۵ درصد) به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد واکنش داد. در نهایت، مقدار تولید IAA در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد. از منحنی استاندارد برای تخمین دقیق مقدار تولید IAA استفاده گردید.

برای شناسایی ایزوله‌های برتر از کیت شرکت سیناژن جهت استخراج دی ان ای استفاده شد. در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر ناحیه 16S از جفت آغازگر fD1 ('5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و rP2 ('5-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') استفاده گردید که قطعه‌ای به طول حدود ۱۵۰۰ جفت باز را تکثیر می‌کند (Weisburg و همکاران، ۱۹۹۱). جهت انجام PCR از ۱ میکرولیتر دی ان ای (استخراج شده از باکتری)، ۱۰ میکرولیتر کیت 2X PCR Master Mix شرکت ترمو (Thermo Scientific, USA)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ میکرومول در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. شرایط به کاربرده شده برای انجام واکنش عبارت بود از: ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس، ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و پس از آن ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در آخر نگهداری در ۴ درجه سلسیوس بود. بعد از انجام PCR از کیت خالص‌سازی (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo, Germany) جهت خالص‌سازی محصول PCR استفاده شد. محصول PCR خالص‌سازی شده جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت Microsynth_Swiss ارسال گردید. توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزار BLAST با توالی‌های موجود در NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) همردیف‌سازی و مورد مقایسه قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

از بین ۱۲۰ جدایه باکتری مورد بررسی که از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری جداسازی و خالص‌سازی شد. ۷۴ جدایه (۶۱/۷ درصد) توانایی تولید IAA را داشتند. از نظر مقدار تولید IAA بین جدایه‌های به دست آمده اختلاف آماری معنی‌داری وجود داشت ($P < ۰/۰۰۰۱$). در این بین، ۶۰ جدایه کمتر از ۵ میلی‌گرم در لیتر، ۱۲ جدایه بین ۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و ۲ جدایه بالای ۱۰ میلی‌گرم در لیتر IAA تولید نمودند که در سه گروه به‌ترتیب ضعیف، متوسط و خوب گروه‌بندی شدند. توانایی تولید هر یک از جدایه‌ها متعلق به گروه متوسط و خوب (۱۴ جدایه) در شکل ۱ ارائه شده است. از مجموع ۱۴ جدایه، چهار جدایه متعلق به اراضی جنگلی (IAA3، IAA4، IAA5 و IAA12)، سه جدایه متعلق به مزارع برنج (IAA11، IAA13 و IAA14)، سه جدایه متعلق به باغات مرکبات (IAA6، IAA7 و IAA10) و چهار جدایه متعلق به اراضی خشکه‌کاری (IAA1، IAA2، IAA8 و IAA9) بودند (شکل ۱). تنها جدایه‌های IAA3 و IAA13 به عنوان جدایه‌های برتر و با قابلیت تولید IAA به‌ترتیب ۱۶/۸ و ۲۷/۱ میلی‌گرم در لیتر بعد از گذشت ۳ روز در دمای ۲۹±۱ درجه سلسیوس انتخاب و شناسایی شدند. نتایج تعیین توالی و هم‌ردیفی توالی‌ها نشان داد که دو این دو جدایه بیش از ۹۹ درصد به‌ترتیب به باکتری‌های *Vogesella indigofera* و *Ensifer* sp. شباهت داشتند.



شکل ۱- نتایج تجزیه واریانس جدایه‌های به دست آمده از اراضی جنگلی و کشاورزی شهرستان ساری بر اساس مقدار تولید IAA در پایان دوره آزمایش (بعد از گذشت سه روز در محیط کشت مایع LB حاوی ۰/۱ درصد اسیدآمینه تریپتوفان). SE، خطای استاندارد می‌باشد.

به طور مشابه، Basu and Ghosh (2001) گزارش نمودند که ایزوله *Rhizobium* sp. در زمان کاربرد اسیدآمینه تریپتوفان قادر به تولید ۴۵/۶ میلی‌گرم بر لیتر IAA می‌باشد و بهترین شرایط برای تولید IAA زمانی است که محیط کشت حاوی ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اسیدآمینه تریپتوفان بود. Rameshkumar و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که جدایه *V. indigofera* DSM 3303 توانایی تولید IAA را دارد اما مقدار آن را کمّی‌سازی نکردند. Cimmino و همکاران (۲۰۰۶) مشاهده کردند که چهار جدایه *Pantoea agglomerans* قادر به تولید ۵/۴ تا ۱۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA بعد از چهار روز رشد در دمای ۲۶ درجه سلسیوس می‌باشند. عباس‌زاده‌دهجی و همکاران (۱۳۸۷) پس از جداسازی باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* تولیدکننده IAA از ریشه گیاه کلزا محدود تولید IAA این ریزجانداران را بین ۰ تا ۶۳/۷ میلی‌گرم بر لیتر گزارش نمودند. همچنین، کاربرد این باکتری‌ها بر رشد گیاهچه کلزا در شرایط گلدانی اثر مثبت داشت. در آزمایشی دیگر، به طور مشابه عرب و همکاران (۱۳۸۷) اثر مثبت کاربرد باکتری‌های جنس *Azospirillum* sp.، تولیدکننده IAA بر رشد گیاه ذرت شیرین در شرایط گلخانه‌ای را گزارش کردند.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان جدایه‌های برتر را به‌عنوان نماینده‌های مناسبی از باکتری‌های افزاینده رشد با قابلیت تولید IAA در تولید کودهای زیستی جهت استفاده در سیستم‌های کشاورزی پایدار مبتنی بر محیط زیست توصیه نمود. البته ابتدا انجام مطالعات گلدانی و مزرعه‌ای جهت تایید کارایی این ریزجانداران در شرایط طبیعی پیشنهاد می‌گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش بخشی از پروژه تحقیقاتی مصوب پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان و دانشگاه علوم کشاورزی منابع طبیعی ساری به شماره ۹۶/۴۲۳/پ (T237-97) می‌باشد. بدین‌وسیله از این مراکز بابت حمایت‌های مالی از این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

عباس‌زاده‌دهجی، پ.، اسدی رحمانی، ه.، صالح راستین، ن.، خاوازی، ک. و سلطانی طولارود، ع.ا. ۱۳۸۷. ارزیابی توان تولید اکسین توسط سودوموناس های فلورسنت و اثرات آنها در رشد گیاهچه های کلزا (*Brassica napus* L.)، علوم خاک و آب، ۲۲(۲): ۲۱۵-۲۰۳.

عرب، س.م.، اکبری، غ.؛ علیخانی، ح.، ارزانش، م.ح. و اله‌دادی. ۱. ۱۳۸۷. بررسی توانایی تولید اکسین توسط باکتری های جداسازی شده بومی جنس آزوسپیریلوم و ارزیابی اثرات محرک رشدی جدایه برتر بر گیاه ذرت شیرین. پژوهش‌های زراعی ایران، ۶(۲): ۲۲۵-۲۱۷.

Ahemad, M., and Khan, M.S. 2011. Effect of tebuconazole-tolerant and plant growth promoting *Rhizobium* isolate MRP1 on pea–Rhizobium symbiosis. Scientia Horticulturae, 129:266-272.

Ahemad, M., and Kibret, M. 2014 Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. Journal of King Saud University-Science, 26:1-20.

Bakhshandeh, E., Rahimian, H., Pirdashti, H., and Nematzadeh, G. A. 2014. Phosphate solubilization potential and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30:2437-2447.

Basu, P.S., Ghosh, A.C., 2001. Production of indole acetic acid in culture by a *Rhizobium* species from the root nodules of a monocotyledonous tree, *Roystonea regia*. Acta Biotechnologica, 21:65-72.

Camerini, S., Senatore, B., Lonardo, E., Imperlini, E., Bianco, C., Moschetti, G., Rotino, G.L., Campion, B., and Defez, R. 2008. Introduction of a novel pathway for IAA biosynthesis to rhizobia alters vetch root nodule development. Archives of Microbiology, 190:67-77.

Cimmino, A., Andolfi, A., Marchi, G., Surico, G., and Evidente, A. 2006. Phytohormone production by strains of *Pantoea agglomerans* from knots on olive plants caused by *Pseudomonas savastanoi* pv. savastanoi. Phytopathologia Mediterranea, 45:247-252.

Glick, B.R. (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Scientifica 2012:1-15.

Rameshkumar, N., Lang, E., and Tanaka, N. 2016. Description of *Vogesella oryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of saline tolerant pokkali rice. Systematic and Applied Microbiology, 39:20-24.

Rivera, D., Mora, V., Lopez, G., Rosas, S., Spaepen, S., Vanderleyden, J., and Cassan, F. 2018. New insights into indole-3-acetic acid metabolism in *Azospirillum brasilense*. Journal of Applied Microbiology, 125:1774-1785.

SAS Institute Inc 2013. SAS/STAT user's guide. SAS Institute Inc., Cary.

Spaepen, S., and Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 3: a001438. doi:10.1101/cshperspect.a001438.

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

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173:697-703.

16th Iranian Soil Science Congress

University of Zanjan, Iran, August 27-29, 2019

Topic for submission: Soil Biology and Biofertilizers

Isolation and identification of indole acetic acid producing bacteria from the forest and agricultural lands in Sari

Bakhshandeh[*1], E., Alavi[1], S.M., Hosseini[2], M., Zeraatphisheh[3], M.

[1] Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan and Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

[2] Department of Soil Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

[3] Department of Soil Science, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Ahvaz, Iran

Abstract

The present study was carried out to isolate and identify indole-3-acetic acid (IAA) producing bacteria from forest and agricultural lands in Sari. 108 soil samples (0-30 cm depth) were collected in January 2018. The Salkowsky reagent and a spectrophotometry method (read at 530 nm) was used to determine IAA producing bacteria in this study. A total of 120 bacteria strains were isolated from those lands, ~61.7% (74 strains) were able to produce IAA in the liquid Luria broth medium supplemented with 0.1% L-tryptophan. The ability of these strains was ranged from 2 to 27.1 mg l^{-1} after 3 days of growth at 29±1 °C. Two isolates IAA3 (16.8 mg l^{-1}) and IAA13 (27.1 mg l^{-1}) were selected for identifying using 16S rDNA sequencing method. The isolates were identified as *Vogesella indigofera* and *Ensifer* sp. with similarity more than 99% based on the BLAST tool in the NCBI database. Therefore, these bacteria can be introduced as appropriate candidates of plant growth promoting bacteria for producing biofertilizer to apply in agricultural environment systems.

Keywords: Commercial *Citrus* gardens, Dryland, Forest, Rice field, Indole acetic acid producing bacteria.

[*] Corresponding author, Email: bakhshandehesmail@gmail.com & e.bakhshandeh@sanru.ac.ir