

## بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد گیاهی و سطوح هورمون بر ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای پیرومیا (*Peperomia magnoliifolia*)

سحر مهدوی<sup>۱</sup>، احمد علیمددی<sup>۲\*</sup>، بهاره کاشفی<sup>۳</sup>  
سید علی قائم‌مقامی<sup>۴</sup> و احمد اصغرزاده<sup>۵</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۲۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۲۰)

### چکیده

باکتری‌های محرک رشد گیاهی به‌عنوان یکی از راه‌های بهبود رشد گیاه محسوب می‌شوند. اطلاعات ناچیزی در ارتباط با امکان استفاده از این موجودات در تحقیقات ریزازدیادی درون‌شیشه‌ای گیاهان موجود است. هدف از این تحقیق بررسی اثرات باکتری محرک رشد گیاهی و سطوح هورمون بر روی تکثیر گیاه پیرومیا از طریق کشت بافت بود. آزمایش به‌صورت طرح فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور باکتری محرک رشد شامل سطوح: شاهد (بدون باکتری)، *Pseudomonas fluorescent* و *Azospirillum lipoferum* و فاکتور هورمون شامل: بدون هورمون، سطح هورمون برابر با ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر IAA و ۱ میلی‌گرم در لیتر 2ip و مقدار هورمون دو برابر غلظت قبلی بودند. قبل از کشت، سوسپانسیون باکتری‌ها، بر روی محیط کشت و زیر ریزنمونه تلقیح شد. نتایج نشان داد اثر متقابل هورمون و باکتری بر کل طول ریشه و میانگین طول ریشه معنی‌دار بود. تیمار *Azospirillum* بدون باکتری دارای بیشترین طول ریشه بود. در دو هفته اول، اثر اصلی باکتری بر طول ساقه و تعداد برگ معنی‌دار بود. تلقیح ریزنمونه‌ها با هر دو باکتری نسبت به شاهد باعث افزایش معنی‌دار طول متوسط شاخه‌های باززا شده گردید. افزایش طول ساقه در تیمارهای باکتری نسبت به شاهد در حدود ۱/۵ برابر بود. استفاده هم‌زمان از باکتری و هورمون باعث کاهش تعداد برگ شد. در کل نتایج نشان داد تلقیح ریزنمونه‌ها با باکتری، اثرات یکسانی بر صفات مختلف نداشت و اثرات مثبت باکتری بیشتر در ارتباط با خصوصیات ریشه بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری محرک رشد گیاهی، کشت بافت، هورمون، پیرومیا

۱ و ۳. به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، رشته بیوتکنولوژی، گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

۲ و ۴. به‌ترتیب استادیار و مربی، گروه تولیدات گیاهی و کشاورزی پایدار، پژوهشکده کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

۵. استادیار، بخش تحقیقات بیولوژی خاک، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، کرج

\*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: alimadadi.a@gmail.com

## مقدمه

تولید آنزیم ACC دامیناز مؤثر در کاهش اثرات سوء اتیلن تنشی، به رشد بهتر گیاه کمک می‌کند (۵).

در ارتباط با کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه در کشت بافت گیاهی گزارش‌های اندکی موجود است. لارابرو و همکاران (۸) دو باکتری محرک رشد گیاه شامل *Azospirillum brasilense* و *Azotobacter chroococcum* را در کشت بافت گیاه فوتینیا (*Photinia × fraseri*) در مرحله ریشه‌زایی به‌کار بردند. باکتری *A. brasilense* اثرات مثبتی بر روی زمان ریشه‌دهی، وزن خشک و تر ریشه و وزن خشک و تر گیاه داشت. درحالی‌که *A. chroococcum* اثر معنی‌داری بر روی خصوصیات گیاه نداشت. استفاده از باکتری *Pseudomonas sp.* در گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت سیب‌زمینی باعث بهبود تعداد ریشه (۲۴ - ۱۹ درصد)، وزن خشک ریشه (۴۴ - ۲۱ درصد) و طول ساقه (۲۸ - ۲۶ درصد) شد (۴). کاپور و همکاران (۷) بیان نمودند تلقیح گیاهچه‌های کشت بافتی در گیاهان مختلف با قارچ میکوریزا می‌تواند باعث توسعه سیستم ریشه‌ای، افزایش کارایی فتوسنتز، بهبود جذب آب و مواد غذایی، کاهش عوامل بیماری‌زا و کاهش اثرات تنش‌های محیطی شود. جایز می‌وگا و همکاران (۶) مشاهده نمودند استفاده از *Bacillus spp.* بر روی گیاهچه‌های کشت بافتی موز، باعث بهبود رشد و غلظت عناصر غذایی در برگ شد. هم‌چنین راسو و همکاران (۱۳) مشاهده نمودند *Azospirillum brasilense* اثرات مفیدی بر ریشه‌زایی و سازگاری گیاه کشت بافتی گلابی داشت. کاربرد این باکتری باعث بهبود وزن ریشه، فعالیت ریشه، رشد گیاه و حمایت گیاه در برابر بیماری ریشه شد.

گیاه پیرومیا رقم گرین (*Peperomia magnoliifolia*) یکی از گیاهان زینتی پر مصرف در دنیا و ایران می‌باشد. پیرومیا گیاهی است گرمسیری با برگ‌های چرمی شکل و قاشقی، دارای نیاز آبی و نوری کم و رشد سریعی ندارد. رشد کم این گیاه اهمیت تکثیر از طریق کشت بافت را توجیه می‌نماید. گیاه پیرومیا به‌عنوان یک گیاه زینتی با رشد کم، نمونه خوبی برای

کشت بافت گیاهی عبارت است از رشد سلول، بافت و یا اندام گیاهی در یک محیط غذایی مصنوعی استریل که به‌صورت جامد یا مایع تهیه می‌شود. این روش به‌عنوان یکی از شاخه‌های زیست‌فناوری، کاربرد گسترده‌ای در کشاورزی دارد. در کشت بافت، قسمتی از گیاه به نام ریزنمونه که ممکن است بخشی از ساقه، برگ، جوانه و یا یک سلول باشد، در محیط کنترل شده کشت می‌شود. در واقع در کشت درون‌شیشه‌ای محیط کشت بستری برای رشد گیاه است و ترکیبی از مواد شیمیایی و آلی برای رشد سلول‌ها و بافت‌ها می‌باشد (۱۵).

استفاده از ریزجانداران خاک‌زی در تولید کودهای زیستی در دهه‌های پیش، توسعه بسیاری یافته است و امروزه طیف وسیعی از باکتری‌های خاک‌زی (انواع ریزوبیوم، سودوموناس، ازتوباکتر، آزوسپریلوم، باسیلوس و غیره)، قارچ‌ها (همزیست و غیرهمزیست) و جلبک‌ها با مکانیسم‌های مختلف برای تولید کودهای زیستی استفاده می‌شوند (۱۶). امروزه کودهای زیستی در فرمولاسیون‌های متفاوت برای محصولات مختلف کشاورزی استفاده می‌شوند و اهمیت آنها هر روزه در حال افزایش می‌باشد، اما اطلاعات بسیار کمی در ارتباط با امکان استفاده از این موجودات در تحقیقات درون‌شیشه‌ای از جمله کشت بافت گیاهی در دسترس می‌باشد. با توجه به اینکه این ریزجانداران انواع مواد را به محیط اضافه می‌کنند، احتمال اینکه بر روی مراحل مختلف کشت بافت از ایجاد کالوس تا مرحله انتقال به خاک اثرات مثبتی داشته باشند، وجود دارد. این باکتری‌ها ممکن است ریزوسفر، سطح ریشه و یا حتی فضای بین سلولی را کلونیزه نمایند (۹). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه می‌توانند با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی از جمله تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی (اکسین، سیتوکینین، جیبرلین)، انواع ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه، افزایش حالیت ترکیبات نامحلول مثل فسفر و پتاسیم، تولید سیدروفورها و

به‌میزان ۵/۸ توسط HCl و NaOH تنظیم شد و محیط کشت در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، فشار ۱ اتمسفر و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو گردید.

مایه تلقیح باکتری در محیط کشت اختصاصی هر کدام از باکتری‌ها در ارلن‌های ۱۵۰ میلی‌لیتر بر روی شیکر دورانی با ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت تعداد باکتری در واحد حجم به روش شمارش کلونی شمارش شده و مقدار ۰/۰۸ میلی‌لیتر از باکتری (۱۰<sup>۷</sup> c.f.u. ml) در زیر هر ریزنمونه استفاده شد (۸ و ۱۳). مایه تلقیح باکتریایی قبل از انجام کشت ریزنمونه درون‌شیشه (در سطح محیط کشت) به‌وسیله سمپلر تلقیح شدند (شکل ۱). کلیه مراحل کشت به‌صورت کاملاً استریل و با رعایت اصول ایمنی آزمایشگاهی انجام گرفت که به‌عنوان مثال می‌توان استفاده از لامپ UV در اتاق کشت به مدت ۱۰ دقیقه قبل از شروع کار، هم‌چنین ضدعفونی سطوح با الکل طبی و نیز ضدعفونی تمام وسایل و مواد مورد استفاده به‌وسیله اتوکلاو و رعایت اصول حرفه‌ای کشت بافت در زیر هود لامینار را نام برد. ریزنمونه ضدعفونی شده آماده کشت، با رعایت شرایط گفته شده، طوری که به‌خوبی با محیط کشت در تماس باشد، کشت داده شد. کشت‌ها در شرایط ۲۵ درجه سانتی‌گراد در اتاق کشت با طول روز ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شدت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند (۱۵).

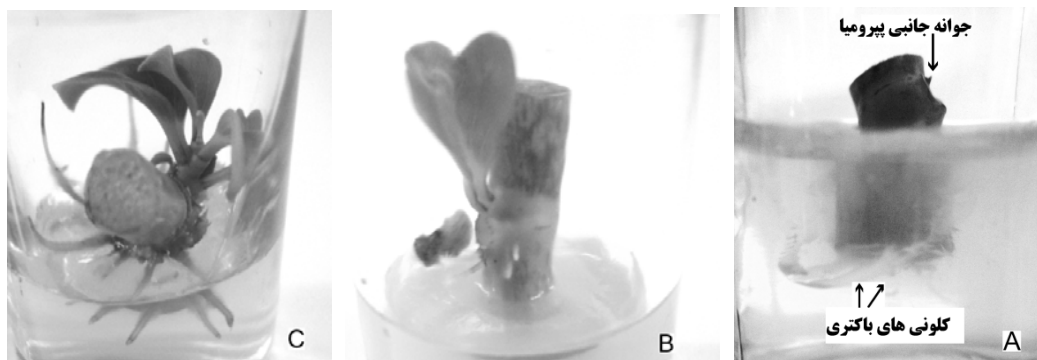
داده‌برداری از نمونه‌ها شامل اندازه‌گیری تعداد برگ، تعداد ریشه، طول ریشه، طول ساقه، تعداد جوانه جانبی و نابه‌جا و توسعه برگ‌ها انجام شد. اندازه‌گیری خصوصیات، دو هفته و چهار هفته بعد از کشت صورت گرفت. کالوس‌زایی و جوانه‌های نابه‌جا در آزمایش مشاهده نشد. داده‌ها توسط نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و نمودارها توسط نرم‌افزار Excel رسم گردید. آنالیز آماری با استفاده از خطای آزمایشی انجام شد و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد صورت گرفت.

بررسی تأثیر درون‌شیشه‌ای این باکتری‌ها بود (۳). در مورد اثرات درون‌شیشه‌ای باکتری‌های محرک رشد گیاهی در کشت بافت، گزارش‌های بسیار اندکی موجود است و تحقیق بر روی این موضوع ضروری به‌نظر می‌رسد. این تحقیق با هدف ارزیابی اثرات باکتری‌های محرک رشد گیاهی و سطوح هورمون بر رشد ریزنمونه‌های پیرومیا در شرایط درون‌شیشه‌ای انجام شد.

### مواد و روش‌ها

گیاه پیرومیا رقم گرین (*Peperomia magnoliifolia*) جهت نمونه‌برداری در گلخانه و تحت شرایط نور، آب و مواد غذایی مناسب نگهداری شده، ریزنمونه‌ها از گیاه جدا شده و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در انتخاب ریزنمونه‌ها دقت لازم به‌منظور انتخاب ریزنمونه‌های سالم و عاری از بیماری و یا آسیب دیدگی به‌عمل آمد. ریزنمونه‌ها شامل جوانه جانبی پیرومیا از گیاه جدا شده و ضدعفونی گردیدند. ضدعفونی ریزنمونه‌ها شامل مراحل آبخوبی با آب شیر به مدت ۲۰ دقیقه، اتانول ۷۰٪ به مدت ۱ دقیقه و هم‌چنین محلول هیپوکلریت سدیم (با ۵٪ کلر فعال) با غلظت ۲۰ درصد به‌همراه چند قطره از محلول تویین به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفته و سپس سه مرتبه آبخوبی با آب مقطر استریل انجام شد. کلیه مراحل بعد از آبخوبی اولیه، در زیر هود لامینار انجام پذیرفت.

آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و در هر تکرار ۷ نمونه صورت گرفت. کشت نمونه‌ها در شیشه‌های مک‌کارتی انجام شد. فاکتورها عبارت بودند از: ۱- تلقیح با باکتری شامل سه سطح (شاهد) (بدون باکتری)، *Azospirillum lipoferum* و *Pseudomonas fluorescent* (۲- مقدار هورمون شامل سه سطح (شاهد) (بدون هورمون)، ترکیب ۰.۵ mg/l + 2ip و IAA 0.2 mg/l و غلظت دو برابر تیمار قبلی). برای انجام آزمایش، از محیط کشت پایه (MS (1962 که دارای ۲/۵٪ (w/v) ساکارز و ۰/۶٪ (w/v) آگار بود استفاده شد. pH



شکل ۱. مراحل مختلف آزمایش A: کشت ریزنمونه و باکتری، B: رشد جوانه و C: رشد شاخساره و ریشه زایی

## نتایج

که تمامی تیمارهای باکتری مختلفی با یکدیگر نداشتند، داشت (شکل ۲). به نظر می‌رسد استفاده هم‌زمان از باکتری و هورمون باعث افزایش بیش از حد سطح هورمون‌ها در محیط کشت شده و این عامل تأثیر منفی در تعداد برگ داشته است. نتایج به‌دست آمده بعد از یک ماه، روند مشابهی نسبت به اندازه‌گیری اول داشت.

نتایج تجزیه واریانس اثرات تلقیح باکتری و سطوح هورمون بر خصوصیات رشدی ریزنمونه جوانه جانبی گیاه پیرومیا در هفته دوم و چهارم بعد از کشت در جداول ۱ و ۲ مشاهده می‌گردد. جدول ۳ نیز بیانگر مقایسه اثرات اصلی هورمون و باکتری می‌باشند.

### طول ساقه باززایی شده از جوانه جانبی

همانند تعداد برگ، اثر تلقیح با باکتری بر طول شاخه باززا شده پیرومیا در تاریخ اول معنی‌دار شد ( $P < 0/01$ ) و اثر سطوح هورمون و هم‌چنین اثر متقابل غیر معنی‌دار بود (جدول ۱). برخلاف تعداد برگ، تلقیح با هر دو نوع باکتری باعث افزایش طول ساقه گردید (جدول ۳). هر دو نوع باکتری به‌طور متوسط باعث افزایش ۶۰ درصدی طول شاخساره شدند. افزایش طول ساقه از دو طریق شامل افزایش تعداد میان‌گره و یا افزایش طول میان‌گره امکان‌پذیر است. با توجه به اثر منفی باکتری بر تعداد برگ، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از باکتری باعث افزایش طول میان‌گره و در نتیجه طول شاخساره شده است.

در تاریخ دوم، اثر تلقیح با باکتری و اثر متقابل، غیر معنی‌دار و اثر هورمون بر طول ساقه‌های باززا شده معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ؛ جدول ۲). افزایش سطح هورمون به‌مقدار دو برابر ( $3/76$  سانتی‌متر) باعث افزایش طول ساقه نسبت به شاهد و

### تعداد برگ

نتایج تجزیه واریانس نشان داد در تاریخ اول، اثر تلقیح با باکتری بر تعداد برگ پیرومیا معنی‌دار شد ( $P < 0/01$ ) و اثر هورمون و هم‌چنین اثر متقابل غیر معنی‌دار بود (جدول ۱). تلقیح با هر دو نوع باکتری باعث کاهش معنی‌دار تعداد برگ نسبت به شاهد گردید که این امر نشان‌دهنده اثر منفی باکتری بر ظهور برگ می‌باشد (جدول ۳). تأثیر باکتری بر تعداد برگ دقیقاً برعکس تأثیر بر طول شاخه بود و این نتیجه نشان می‌دهد که تلقیح با باکتری باعث افزایش طول میان‌گره گردیده است. در تاریخ دوم، اثر تلقیح با باکتری و هم‌چنین اثر متقابل بر تعداد برگ باززا شده پیرومیا معنی‌دار شد (به‌ترتیب  $P < 0/05$  و  $P < 0/01$ ؛ جدول ۲). در تیمار بدون باکتری، با افزایش سطح هورمون از صفر به ۲ (به‌ترتیب  $2/3$  و  $3/4$ ) اختلاف معنی‌دار در تعداد برگ مشاهده شد. در هر دو سطح ۱ و ۲ هورمون، استفاده هم‌زمان از باکتری و هورمون باعث کاهش معنی‌دار تعداد برگ شد و روند مخالفی نسبت به سطح صفر هورمون،

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف هورمون و باکتری بر صفات مربوط به رشد درون‌شیشه‌ای ریزنمونه جوانه جانبی پیرومیا (تاریخ اول)

اثرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)					
		تعداد برگ	طول ساقه	تعداد ریشه	کل طول ریشه	میانگین طول ریشه	تعداد جوانه توسعه برگی
هورمون	۲	۰/۲۳ <sup>ns</sup>	۴/۳۲ <sup>ns</sup>	۰/۱۸ <sup>ns</sup>	۱۲/۹۵ <sup>*</sup>	۱/۴۱ <sup>**</sup>	۱۴/۸۶ <sup>ns</sup>
باکتری	۲	۱۱/۷۰ <sup>**</sup>	۱۵/۱۱ <sup>**</sup>	۰/۰۳ <sup>ns</sup>	۴/۸۲ <sup>ns</sup>	۰/۳۷ <sup>ns</sup>	۰/۹۴ <sup>ns</sup>
هورمون × باکتری	۴	۱/۶۷ <sup>ns</sup>	۱/۰۷ <sup>ns</sup>	۸/۶۲ <sup>ns</sup>	۷/۷۹ <sup>*</sup>	۰/۴۱ <sup>*</sup>	۷/۸۴ <sup>ns</sup>
خطای آزمایشی	۱۸	۰/۷۵	۱/۵۹	۳/۱۷	۲/۳۰	۰/۱۴	۶/۲۹
خطای نمونه‌برداری	۶۵	۰/۳۱	۰/۲۹	۰/۵۲	۳/۳۳	۰/۰۴	۰/۷۹

\*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد، \*\*: معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ns: غیر معنی‌دار

جدول ۲. تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف هورمون و باکتری بر صفات مربوط به رشد درون‌شیشه‌ای ریزنمونه جوانه جانبی گیاه پیرومیا (تاریخ دوم)

اثرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)					
		تعداد برگ	طول ساقه	تعداد ریشه	کل طول ریشه	میانگین طول ریشه	تعداد جوانه توسعه برگی
هورمون	۲	۰/۰۷ <sup>ns</sup>	۹/۷۱ <sup>*</sup>	۴۳/۸۱ <sup>*</sup>	۳۰۸/۴۷ <sup>**</sup>	۶/۸۴ <sup>*</sup>	۲۵/۴۹ <sup>*</sup>
باکتری	۲	۳/۸۴ <sup>*</sup>	۱/۵۳ <sup>ns</sup>	۶۷/۲۰ <sup>**</sup>	۳۰۶/۳۲ <sup>**</sup>	۱/۷۸ <sup>ns</sup>	۱۷/۱۶ <sup>ns</sup>
هورمون × باکتری	۴	۳/۸۳ <sup>**</sup>	۱/۹۵ <sup>ns</sup>	۴/۶۴ <sup>ns</sup>	۵۶/۹۷ <sup>ns</sup>	۱/۱۹ <sup>ns</sup>	۲۹/۲۰ <sup>ns</sup>
خطای آزمایشی	۱۸	۰/۸۳	۲/۱۰	۸/۳۸	۲۹/۱۰	۱/۳۷	۱۱/۴۴
خطای نمونه‌برداری	۵۶	۰/۴۲	۰/۴۱	۱/۴۵	۲۸/۴۸	۰/۹۰	۷/۹۲

\*: معنی‌دار در سطح ۵ درصد، \*\*: معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ns: غیر معنی‌دار

معنی‌دار بود (جدول ۲). سطوح هورمون صفر و یک اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند و سطح هورمون دو برابر، باعث کاهش ۵۰ درصدی تعداد ریشه باززا شده گردید (جدول ۳). تیمار باکتری *Azospirillum* و تیمار بدون باکتری نیز اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند اما تلقیح با باکتری *Pseudomonas* باعث کاهش معنی‌دار (در حدود ۴۵ درصد) نسبت به دو تیمار دیگر شد (جدول ۳). با مقایسه این دو اثر می‌توان مشاهده نمود که تأثیر تیمار *Pseudomonas* شبیه تیمار هورمون دو برابر می‌باشد و این کاهش تعداد ریشه می‌تواند به علت افزایش بیش از حد سطح هورمون در حضور باکتری *Pseudomonas* باشد.

هورمون یک گردید (به‌ترتیب ۲/۵۱ و ۲/۵۶ سانتی‌متر) (جدول ۳). این افزایش در حدود ۵۰ درصد نسبت به دو تیمار دیگر بود.

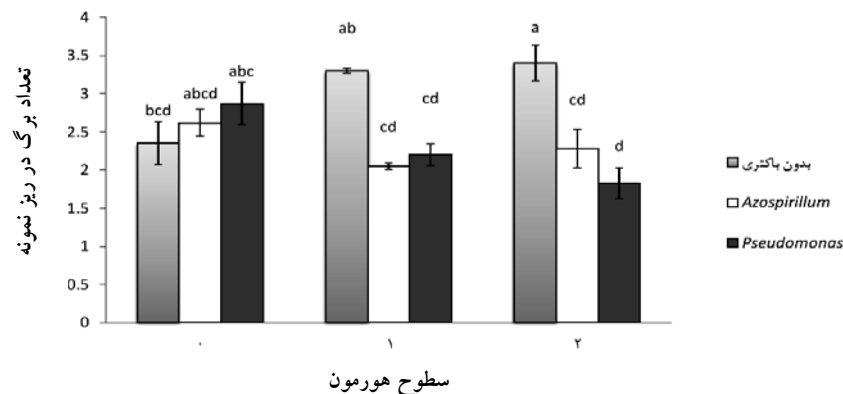
#### تعداد ریشه باززا شده

نتایج تجزیه واریانس نشان داد در تاریخ اول، هیچ‌کدام از اثرات اصلی و متقابل تیمارها بر تعداد ریشه معنی‌دار نبود (جدول ۱). میانگین تعداد ریشه در ریزنمونه ۲/۴ ریشه در شاخه بود. در تاریخ دوم، اثرات اصلی تلقیح با باکتری و سطوح هورمون بر تعداد ریشه باززا شده معنی‌دار (به‌ترتیب  $P < ۰/۰۱$  و  $P < ۰/۰۵$ ) و اثر متقابل این دو فاکتور غیر

جدول ۳. مقایسه میانگین اثرات سطوح باکتری و هورمون بر صفات مورد مطالعه بعد از دو و چهار هفته

فاکتور	تیمار	صفات مورد بررسی												
		تعداد برگ	طول ساقه (cm)	تعداد ریشه	کل طول ریشه (cm)	میانگین طول ریشه (cm)	تعداد جوانه جانی	توسعه برگ	تعداد جوانه جانی	توسعه برگ	تعداد ریشه	کل طول ریشه (cm)	میانگین طول ریشه (cm)	
سطوح هورمون	بدون هورمون	۲ هفته	۲/۱۷ <sup>a</sup>	۲/۵۴ <sup>a</sup>	۲/۸۵ <sup>a</sup>	۲/۲۲ <sup>a</sup>	۴/۸۵ <sup>a</sup>	۲/۲۲ <sup>a</sup>	۸/۸۴ <sup>a</sup>	۰/۷۶ <sup>a</sup>	۱/۹۱ <sup>a</sup>	۲/۰۷ <sup>a</sup>	۲/۳۸ <sup>b</sup>	۶/۵۱ <sup>a</sup>
		۴ هفته	۲/۳۶ <sup>a</sup>	۲/۵۱ <sup>a</sup>	۲/۴۲ <sup>a</sup>	۰/۹۳ <sup>b</sup>	۸/۸۵ <sup>a</sup>	۰/۳۳ <sup>b</sup>	۱/۵۲ <sup>ab</sup>	۳/۴۵ <sup>a</sup>	۴/۱۹ <sup>ab</sup>	۲/۳۸ <sup>b</sup>	۳/۴۵ <sup>a</sup>	۵/۳۷ <sup>a</sup>
	هورمون سطح ۱	۲ هفته	۲/۴۲ <sup>a</sup>	۳/۸۷ <sup>a</sup>	۲/۸۰ <sup>b</sup>	۱/۱۲ <sup>b</sup>	۲/۸۸ <sup>b</sup>	۰/۴۰ <sup>b</sup>	۱/۰۸ <sup>b</sup>	۲/۹۰ <sup>a</sup>	۴/۳۸ <sup>a</sup>	۲/۹۰ <sup>a</sup>	۴/۳۸ <sup>a</sup>	۵/۳۵ <sup>a</sup>
		۴ هفته	۲/۵۵ <sup>a</sup>	۲/۸۱ <sup>a</sup>	۳/۷۶ <sup>a</sup>	۱/۱۲ <sup>b</sup>	۲/۸۸ <sup>b</sup>	۰/۴۰ <sup>b</sup>	۱/۰۸ <sup>b</sup>	۲/۹۰ <sup>a</sup>	۴/۳۸ <sup>a</sup>	۲/۹۰ <sup>a</sup>	۴/۳۸ <sup>a</sup>	۵/۳۵ <sup>a</sup>
	هورمون سطح ۲	۲ هفته	۲/۹۸ <sup>a</sup>	۳/۰۳ <sup>a</sup>	۲/۴۵ <sup>a</sup>	۱/۴۷ <sup>a</sup>	۷/۸۷ <sup>a</sup>	۰/۵۱ <sup>a</sup>	۱/۵۰ <sup>ab</sup>	۲/۳۱ <sup>a</sup>	۴/۲۵ <sup>a</sup>	۲/۳۱ <sup>a</sup>	۴/۲۵ <sup>a</sup>	۵/۸۰ <sup>a</sup>
		۴ هفته	۱/۹۷ <sup>b</sup>	۲/۳۲ <sup>b</sup>	۲/۳۱ <sup>a</sup>	۱/۵۹ <sup>a</sup>	۱۰/۵۸ <sup>a</sup>	۰/۵۳ <sup>a</sup>	۲/۰۶ <sup>a</sup>	۳/۲۱ <sup>a</sup>	۳/۲۶ <sup>a</sup>	۳/۲۱ <sup>a</sup>	۳/۲۶ <sup>a</sup>	۵/۹۶ <sup>a</sup>
سطوح باکتری	<i>Azospirillum</i>	۲ هفته	۱/۸۵ <sup>b</sup>	۲/۲۷ <sup>b</sup>	۲/۴۸ <sup>a</sup>	۰/۹۸ <sup>a</sup>	۳/۰۰ <sup>b</sup>	۱/۱۹ <sup>b</sup>	۳/۱۶ <sup>a</sup>	۳/۳۹ <sup>a</sup>	۳/۱۶ <sup>a</sup>	۳/۳۹ <sup>a</sup>	۳/۱۶ <sup>a</sup>	۵/۸۰ <sup>a</sup>
		۴ هفته	۱/۸۵ <sup>b</sup>	۲/۲۷ <sup>b</sup>	۲/۴۸ <sup>a</sup>	۰/۹۸ <sup>a</sup>	۳/۰۰ <sup>b</sup>	۱/۱۹ <sup>b</sup>	۳/۱۶ <sup>a</sup>	۳/۳۹ <sup>a</sup>	۳/۱۶ <sup>a</sup>	۳/۳۹ <sup>a</sup>	۳/۱۶ <sup>a</sup>	۵/۸۰ <sup>a</sup>

مقایسه میانگین با روش دانکن انجام شد. میانگین‌های دارای حرف مشابه در یک ستون و در یک فاکتور در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی دار با یکدیگر ندارند.



شکل ۲. اثر متقابل سطوح هورمون و باکتری بر تعداد برگ گیاه پیرومیا درون شیشه، مقایسه میانگین با روش دانکن و خطوط روی نمودار بیانگر خطای استاندارد می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

### میانگین طول ریشه

مشابه کل طول ریشه، اثر اصلی هورمون و اثر متقابل هورمون در باکتری بر میانگین طول ریشه در تاریخ اول معنی‌دار گردید (به ترتیب  $P < 0/01$  و  $P < 0/05$ ) (جدول ۱). بیشترین میانگین طول ریشه در تیمار باکتری *Azospirillum* تنها و شاهد (بدون باکتری) به مقدار به ترتیب  $1/08$  و  $0/79$  سانتی‌متر بود که نسبت به دیگر ترکیب‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۴). اختلاف بین دیگر تیمارها معنی‌دار نبود.

در تاریخ دوم، هورمون اثر معنی‌داری بر میانگین طول ریشه داشت ( $P < 0/05$ ) و اثر اصلی باکتری و اثر متقابل هورمون در باکتری بر میانگین طول ریشه معنی‌دار نگردید (جدول ۲). اختلاف معنی‌دار بین سطوح ۰ و ۲ هورمون مشاهده شد (به ترتیب  $1/91$  و  $1/08$  سانتی‌متر) و تیمار سطح یک بینابین این دو تیمار بود (جدول ۳). در حقیقت با افزایش سطح هورمون از میانگین طول ریشه کاسته شد.

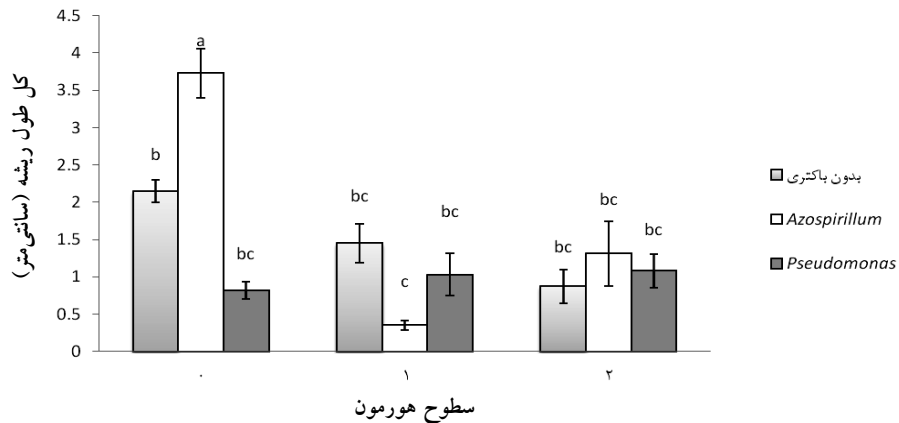
### تعداد جوانه رشد کرده

در تاریخ اول، هیچ‌کدام از اثرات اصلی و متقابل تیمارها بر تعداد جوانه رشد کرده در ریزنمونه معنی‌دار نبود (جدول ۱). در تاریخ دوم، اثر هورمون معنی‌دار گردید ( $P < 0/05$ ) (جدول ۲). سطح هورمون دو با  $4/38$  جوانه در ریزنمونه، بیشترین تعداد جوانه و اختلاف معنی‌دار با شاهد ( $2/38$ ) داشت (جدول ۳).

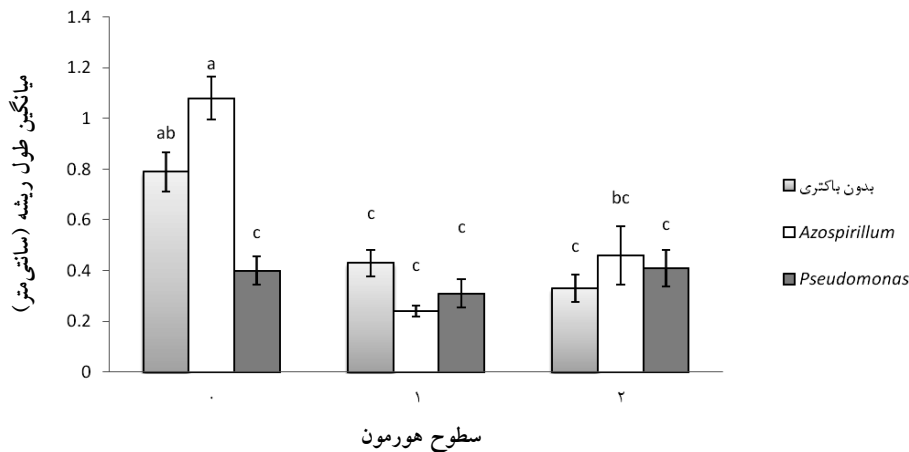
### کل طول ریشه باززا شده

نتایج نشان داد اثر اصلی هورمون و اثر متقابل هورمون در باکتری بر کل طول ریشه در تاریخ اول معنی‌دار گردید ( $P < 0/05$ ) و باکتری اثر معنی‌داری بر کل طول ریشه نداشت (جدول ۱). بیشترین طول ریشه در تیمار باکتری *Azospirillum* تنها به مقدار  $3/73$  سانتی‌متر مشاهده گردید که نسبت به دیگر ترکیب‌ها اختلاف معنی‌داری داشت (شکل ۳).

در تاریخ دوم، اثرات اصلی تلقیح با باکتری و سطوح هورمون بر کل طول ریشه باززا شده در ریزنمونه پیرومیا معنی‌دار ( $P < 0/01$ ) و اثر متقابل این دو فاکتور غیر معنی‌دار بود (جدول ۲). سطوح هورمون صفر و یک اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند (به ترتیب  $8/84$  و  $8/85$  سانتی‌متر) و سطح هورمون دو برابر باعث کاهش طول ریشه باززا شده ( $2/88$  سانتی‌متر) شد (جدول ۳). تیمار باکتری *Azospirillum* و تیمار بدون باکتری نیز اختلاف معنی‌دار با یکدیگر نداشتند (به ترتیب  $7/87$  و  $10/58$  سانتی‌متر) اما تلقیح با باکتری *Pseudomonas* باعث کاهش معنی‌دار ( $3$  سانتی‌متر) نسبت به دو تیمار دیگر شد (جدول ۳). مقایسه این دو شکل نشان می‌دهد که تأثیر تیمار *Pseudomonas* شبیه تیمار هورمون دو برابر می‌باشد و این کاهش تعداد ریشه می‌تواند به علت افزایش بیش از حد سطح هورمون در حضور باکتری *Pseudomonas* باشد.



شکل ۳. اثر متقابل سطوح هورمون و باکتری بر کل طول ریشه در گیاه پیرومیا درون شیشه، مقایسه میانگین با روش دانکن و خطوط روی نمودار بیانگر خطای استاندارد می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند.



شکل ۴. اثر متقابل سطوح هورمون و باکتری بر میانگین طول ریشه در گیاه پیرومیا درون شیشه، مقایسه میانگین با روش دانکن و خطوط روی نمودار بیانگر خطای استاندارد می‌باشد. میانگین‌های دارای حرف مشابه در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند.

## بحث

اهمیت استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاهی (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) برای گیاهان مختلف به‌عنوان کود زیستی هر روزه در حال افزایش می‌باشد و تحقیقات وسیعی در این مورد در حال اجراست. با توجه به اینکه این ریزجانداران انواع مواد را به محیط اضافه می‌کنند، احتمال اینکه بر روی مراحل مختلف کشت بافت از ایجاد کالوس تا مرحله انتقال به خاک اثرات مثبتی داشته باشند

## توسعه برگ‌گی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد در اندازه‌گیری اول، هیچ‌کدام از اثرات اصلی و متقابل تیمارها بر توسعه برگ ریزنمونه پیرومیا معنی‌دار نبود (جدول ۱). در تاریخ دوم، اثر هورمون بر توسعه برگ‌گی معنی‌دار گردید ( $P < 0.05$ ) (جدول ۲). افزایش سطح هورمون باعث کاهش سطح برگ شده و هورمون دو برابر، کمترین مقدار سطح برگ (۵/۳۴) و اختلاف معنی‌دار با شاهد (۶/۸۴) داشت (جدول ۳).



ریشه در شاخساره‌های گیاه فوتینیا شد. هم‌چنین باکتری *A. brasilense* به‌همراه هورمون IBA باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه (۱۰۵ و ۱۳۷ درصد)، سطح ریشه (۶۵ درصد) و وزن تر و خشک هوایی (۳۲ و ۶۲ درصد) گردید. آنها نتیجه گرفتند استفاده از باکتری‌های محرک رشد به‌همراه هورمون اکسین باعث بهبود اندام‌زایی خواهد شد. در آزمایش حاضر، استفاده از هر دو باکتری به‌همراه سطوح هورمونی باعث کاهش تعداد برگ شد که این مسأله می‌تواند به‌علت افزایش سطح هورمونی باشد.

کارلتی و همکاران (۲) نتیجه گرفتند زمان و درصد ریشه‌دهی در گیاه جوجوبا با استفاده از تلقیح با باکتری *A. brasilense* بهبود یافت. هم‌چنین استفاده از باکتری *Burkholderia* باعث افزایش تعداد ریشه (۲۴ تا ۱۹۶ درصد)، وزن خشک ریشه (۴۴ تا ۲۰۱ درصد) و ریشه‌های فرعی نسبت به شاهد گردید (۴ و ۱۱).

پیوندی و همکاران (۱۲) مشاهده نمودند تیمار شاخساره‌های کشت بافتی زیتون با دو سویه باکتری *Pseudomonas fluorescent* در گلدان، باعث افزایش طول و تعداد ریشه‌های جانبی و نابه‌جا گردید. افزایش طول و تعداد ریشه بیشتر از تیمار IBA بود. زیرا تولید هورمون اکسین در تیمارهای باکتریایی به‌صورت مداوم صورت می‌گیرد. آنها نتیجه گرفتند در مورد گیاهانی مثل زیتون که ریشه‌زایی به‌سختی صورت می‌گیرد و معمولاً از هورمون اکسین و درون شیشه استفاده می‌شود، می‌توان هورمون را با باکتری‌های تولید کننده اکسین جایگزین نمود.

باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاهی با استفاده از مکانیزم‌هایی شامل القاء مقاومت در گیاه، تحریک رشد گیاه و بهبود شرایط تغذیه، باعث بهبود رشد گیاه می‌شوند (۱۱). یانگ و همکاران (۱۹) مشاهده نمودند کشت هم‌زمان درون‌شیشه‌ای ریزنمونه‌های کتیلدون سویا با دو سویه *pseudomonas maltophilia* باعث تحریک تشکیل کالوس با پتانسیل باززایی بالا شد و پیشنهاد نمودند کشت هم‌زمان باکتری

وجود دارد. در این مورد گزارش‌های بسیار اندکی موجود است و تحقیق بر روی این موضوع ضروری به‌نظر می‌رسد.

اطلاعاتی در مورد اثرات مفید میکروارگانیسم‌ها از جمله بر روی ریشه‌زایی، بهبود رشد و کاهش شیشه‌ای شدن در گیاهان کشت بافتی وجود دارد (۱، ۴ و ۱۰). باکتری‌های محرک رشد گیاهی که طیف وسیعی از مواد شیمیایی را ترشح می‌نمایند، باعث افزایش رشد گیاه و القاء مقاومت در گیاه می‌شوند. این باکتری‌ها از جنس *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas* و دیگر باکتری‌ها می‌باشند. گیاهان کشت بافتی تلقیح شده با این باکتری‌ها می‌توانند در برابر بسیاری از تنش‌های زیستی و غیر زیستی محافظت شوند (۱۱ و ۱۷).

در این آزمایش با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان بیان نمود که باکتری‌ها بر رشد هوایی و ریشه گیاه به‌ویژه بر رشد و توسعه ریشه‌ای گیاه تأثیرگذار بودند. این تأثیر در هر دو باکتری آزوسپریلیوم و سودوموناس مشاهده شد و این تأثیر در صفات مختلف متفاوت بود. جنس، گونه و ژنوتیپ گیاهی، میزان پاسخ‌گویی گیاه به کشت درون‌شیشه‌ای، نوع باکتری و مقدار استفاده از آن، ظرف محیط رشد گیاه، نور، دما و سایر شرایط محیطی می‌توانند در نتیجه به‌دست آمده مؤثر باشند. در این آزمایش اثرات متقابل باکتری و مقدار هورمون نیز مشاهده گردید. کاپور و همکاران (۷) رشد و توسعه ریشه‌ای و افزایش رشد در گیاهان سوبابل و توت‌فرنگی را به تأثیر مثبت باکتری‌های محرک رشد نسبت داده‌اند.

هر دو باکتری استفاده شده در این تحقیق، به‌تنهایی و در مواردی در ترکیب با هورمون، تأثیر مثبتی بر رشد قسمت‌های هوایی و ریشه داشت. تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاهی لزوماً در همه شرایط نمی‌تواند مثبت باشد و باید به‌دنبال تیمارهایی بود که دارای اثر متقابل مثبت با باکتری بوده و اثری هم‌افزا با باکتری داشته باشند. تیمارهای هورمونی (نوع هورمون و مقدار آن) در محیط‌های کشت گیاهی در نحوه عمل یا عدم عملکرد باکتری‌ها می‌توانند تأثیرگذار باشند. لارابورا و همکاران (۸) مشاهده کردند تلقیح با باکتری باعث تسریع در پیدایش

تلقیح ریزنمونه‌های گیاه با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن باعث افزایش وزن خشک ریشه و ساقه گردید.

با توجه به نتایج به دست آمده و مرور نتایج قبلی می‌توان تأثیرگذاری مثبت باکتری‌های محرک رشد گیاه بر گیاهان کشت بافتی را تأیید نمود. نظر به اینکه شرایط محیطی تأثیر زیادی بر رشد و در نتیجه اثر آنها بر گیاه دارد و همچنین این نکته که باکتری‌ها در سطح جنس، گونه و سویه اثرات متقابلی با گیاهان دارند و در حقیقت به نوعی اختصاصی هستند، آزمایش‌های متعددی لازم است تا بهترین تیمارها برای بهبود رشد گیاهان مختلف کشت بافتی تعیین شوند.

و گیاه می‌تواند بسیاری از مشکلات مربوط به باززایی سویا را برطرف نماید. همچنین جنین‌زایی سوماتیکی در ژنوتیپ‌هایی از سویا که باززایی خوبی نداشتند با تلقیح باکتری بهبود یافت (۱۸). شتی و همکاران (۱۴) در مطالعه‌ای مشاهده کردند تلقیح ریزنمونه‌های شاخه مرزنجوش (*Origanum vulgare*) با باکتری *Pseudomonas sp.* از شیشه‌ای شدن، جلوگیری نمود. ریزنمونه‌های مرزنجوش دارای مواد فنولیک و کلروفیل بالاتر نسبت به تیمارهای غیرباکتریایی بودند. در مطالعات متعدد مشخص شده است که گیاهان تلقیح شده با باکتری، سبزتر و دارای سطح بالاتر سیتوکنین، مواد فنولیک و لیگنین بودند (۱۱). میرزا و همکاران (۱۰) گزارش نمودند در کشت بافت نیشکر،

#### منابع مورد استفاده

1. Barka, E. A., A. Belarbi, C. Hachet, J. Nowak and J. Audran. 2000. Enhancement of *in vitro* growth and resistance to gray mould of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 186: 91-95.
2. Carletti S. M., B. Llorente, E. Rodr'iguez C'aceres and J. Tandecarz. 1998. Jojoba inoculation with *Azospirillum brasilense* stimulates in vitro root formation. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4: 165-174.
3. Figueiredo, R. A. and M. Sazima. 2007. Phenology and pollination biology of eight *Peperomia* species (*Piperaceae*) in semideciduous forests in Southeastern Brazil. *Plant Biology* 9(1): 136-141.
4. Frommel, M., J. Nowak and G. Lazarovits. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of in vitro grown potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) as affected by a non-fluorescent *Pseudomonas sp.* *Plant Physiology* 96: 928-936.
5. Glick, B. R., D. M. Penrose and W. Ma. 2001. Bacterial promotion of plant growth. *Biotechnology Advances* 19: 135-138.
6. Jaizme-Vega M. D. C., A. S. Rodríguez-Romero and M. S. P. Guerra. 2004. Potential use of rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated bananas. *Fruits* 59: 83-90.
7. Kapoor, M., D. Sharma and A. K. Bhatnagar. 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. *Scientia Horticulturae* 116: 227-239.
8. Larraburu, E. E., S. M. Carletti, E. A. Rodriguez Caceres and B. E. Llorente. 2007. Micropropagation of *Photinia* employing rhizobacteria to promote root development. *Plant Cell Report* 26: 711-717
9. McCully, M. E. 2001. Niches for bacterial endophytes in crop plants: a plant biologist's review. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 983-990.
10. Mirza, M. S., E. Ahmad, F. Latif, J. Haurat, R. Bally, P. Normand and K. A. Mallik. 2001. Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micropropagated sugarcane *in vitro*. *Plant and Soil* 237: 47-54.
11. Nowak, J. and J. Shulaev. 2003. Priming for transplant stress resistance in *in vitro* propagation. *In Vitro Cell Developmental Biology- Plant* 39: 107-124.
12. Peyvandi, M., F. Farahani, M. Hosseini Mazinani, Z. Noormohamadi, S. Ataii and A. Asgharzade. 2010. *Pseudomonas fluorescens* and its ability to promote root formation of olive microshoots. *International Journal of Plant Production* 4(1): 63-66.
13. Russo, A., L. Vettori, C. Felici, G. Fiaschi, S. Morini and A. Toffanin. 2008. Enhanced micropropagation response and biocontrol effect of *Azospirillum brasilense* Sp245 on *Prunus cerasifera* L. clone Mr. S 2/5 plants. *Journal of Biotechnology* 134(3): 312-319.
14. Shetty, K., O. F. Curtis, R. E. Levin, R. Witkowsky and W. Ang. 1995. Prevention of vitrification associated with *in vitro* shoot culture of oregano. (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. *Journal of Plant Physiology* 147: 447-

- 451.
15. Trigiano R. N. and D. J. Gray. 2010. *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology*. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
  16. Vessey, J. K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571–586.
  17. Vestberg, M., S. Kukkonen, K. Saari, P. Parikka, J. Huttunen, L. Tainio, N. Devos, F. Weekers, C. Kevers, P. Thonart, M. C. Lemoine, C. Cordier, C. Alabouvette and S. Gianinazzi. 2004. Microbial inoculation for improving the growth and health of micropropagated strawberry. *Applied Soil Ecology* 27: 243–258.
  18. Visser-Tenyeuhuis, C., B. N. S. Murthy, J. Odumeru and P. K. Saxena. 1994. Modulation of somatic embryogenesis in hypocotyl-derived cultures of geranium (*Pelargonium X hortorum* bailey) CV ringo rose by a bacterium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 30: 140-143.
  19. Yang, Y. S., K. Wada, M. Goto and Y. Futsuhara. 1991. *In vitro* formation of nodular calli in soybean (*Glycine max* L.) induced by co-cultivated *Pseudomonas maltophilia*. *Japanese Journal of Breeding* 41:595–604.