

اثر تلفیقی مایهزنی باکتری‌های محرک رشد مولد اکسین و تریپتوфан بر رشد گندم در شرایط نتش رطوبتی

اسماعیل کریمی^{۱*}، زهرا محمدی^۲ و عزت الله اسفندیاری^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۲)

چکیده

اکسین تولید شده توسط باکتری‌های محرک رشد در ریزوسفر گندم می‌تواند به بهبود عملکرد آن در شرایط بروز نتش کم‌آبی کمک کند. با توجه به وقوع نتش‌های کم‌آبی در کشور و تأثیر سوء آن بر عملکرد گندم، جهت بررسی این موضوع آزمایشی گلخانه‌ای به روش هیدروپونیک به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با تیمارهای شامل دو نوع باکتری محرک رشد (*Bacillus simplex* 40 و *Bacillus simplex* 52)، دو سطح رطوبتی (۵۰ و ۸۰ درصد ظرفیت نگهداری آب در پرلیت) و دو سطح تریپتوfan (کاربرد و عدم کاربرد) در سه تکرار در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه مراغه طراحی شد. نتایج به دست آمده نشان دادند که در شرایط نتش رطوبتی ۵۰ درصد ظرفیت زراعی کاربرد تریپتوfan بدون مایهزنی باکتری‌ای باعث افت ۵ درصد عملکرد ماده خشک گندم شد. مایهزنی باکتری *Bacillus simplex* 40 بدون کاربرد تریپتوfan در حالی باعث افزایش ۲۵ درصد این صفت شد، که افزودن تریپتوfan باعث کاهش ۱۷ درصد عملکرد این صفت نسبت به این تیمار شد. تحت شرایط نتش فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای مایهزنی شده با باکتری *Bacillus simplex* 40 نسبت به شاهد ۳۳ درصد و فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز $\frac{2}{3}$ برابر افزایش فعالیت داشت. از این رو، با استناد به یافته‌های این پژوهش به لحاظ فیزیولوژیکی باکتری مذکور توانست با بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانی در شرایط بروز نتش اکسیداتیو منتج از نتش رطوبتی باعث بهبود عملکرد ماده خشک شود. کاربرد تریپتوfan تأثیر چشمگیری بر افت عملکرد داشت که می‌توان این موضوع را ناشی از زیادی کاربرد غلط آن ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر و ایجاد اختلال هورمونی در گندم دانست.

واژه‌های کلیدی: اکسین میکروبی، وزن خشک برگ، کاتالاز، گایاکول پراکسیداز

۱ و ۲. بهترتب استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

۳. استاد، گروه مهندسی تولید و زنگنه‌گیاهی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

*. مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: sm_ka80@yahoo.com

مقدمه

خالص، هدایت روزنهاي، مقدار تعرق و کاراچي کربوکسیلاسيون در گیاهان زراعی تحت تنفس کم آبی می شود (۱۶). بالغ بر ۸۰ درصد باکتری های ریزوسفری قادر به تولید اکسین هستند (۳). میزان تولید اکسین در ریزوسفر به نوع باکتری، گیاه میزبان و وجود تریپتوфан به عنوان پیش ماده ساخت اکسین بستگی داشته و تغییرپذیری تولید آن در پاسخ به این عوامل به ویژه تریپتوfan می تواند به عنوان یک نکته مهم و کاربردی در زمینه بهره برداری از این متابولیت میکروبی بسیار مورد توجه قرار گیرد (۳۱). مصطفی و همکاران (۱۸) معتقدند که تحت شرایط تنفس، تریپتوfan با تنظیم باز و بسته شدن روزنها سبب مقاومت گیاه به تنفس می شود. بنابراین سبب کاهش افت آب به وسیله تعرق و کمک به حفظ فشار آماز گیاه برای حفظ فتوستتر در شرایط تنفس می شود. گزارش شده است که کاربرد تریپتوfan به میزان ۱۵ میلی گرم در لیتر سبب تحمل گیاهچه های ذرت به تنفس کم آبی آزمایشی در تولید اکسین به همراه باکتری *Pseudomonas* بر گیاه افزایش یافت (۲۲). حسن و بانو (۱۰) در طی آزمایشی اثر کاربرد اسید آمینه تریپتوfan به میزان ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر در تولید اکسین به همراه باکتری *Pseudomonas* بر گیاه گندم را مثبت ارزیابی کردند و مشاهده کردند که ارتفاع بوته، وزن تر برگ، وزن خشک برگ و میزان کلروفیل در برگ ها افزایش معنی دار نسبت به شاهد داشته است. نوید و همکاران (۱۹) در آزمایش مشابهی بر گیاه ذرت با استفاده از مقدار ۱۰^{-۵} مولار تریپتوfan به همراه باکتری محرک رشد افزایش قابل توجهی را در ارتفاع بوته، زیست توده خشک اندام هوایی، زیست توده خشک ریشه و مقدار عنصر غذایی نیتروژن در گیاه نسبت به شاهد گزارش کردند. همچنین، اعتضامی و همکاران (۹) با کاربرد باکتری ریزوپیوم به همراه تریپتوfan به مقدار ۱ گرم در کیلو گرم بر روی گیاه گندم در شرایط تنفس آزمایشی را انجام دادند و افزایش معنی دار در تیمارهای اعمال شده نسبت به شاهد در مقدار عناصر غذایی پر مصرف نظری نیتروژن، پتاسیم و فسفر، وزن خشک ریشه و اندام هوایی نتیجه گرفتند. هیدرولیز پروتئین های

مطابق برآوردهای انجام شده در حدود ۴۰ درصد از اراضی کره زمین در مناطق نیمه خشک قرار گرفته اند که خشکسالی و تنفس ناشی از آن مهم ترین و رایج ترین تهدید محیطی محسوب شده و با کاهش تولید محصولات کشاورزی امکان به خطر افتادن امنیت غذایی مردم در این مناطق را افزایش می دهد (۱۲). استفاده از پتانسیل باکتری های محرک رشد گیاهان برای حفظ و تولید بهینه محصولات کشاورزی، از جمله گندم، در شرایط کمبود آب از سوی دانشمندان کشاورزی به دلیل ارزانی و پاسخ دهنده سریع، یکی از راهکارهای مطرح شده است که احتمال می رود با تغییرات هورمونی در گیاه، بهبود عملکرد سازوکارهای دفاعی گیاه، افزایش تجمع اسمولیت ها و یا ترشح پلیمرهای خارج سلولی توسط باکتری، سبب سازگاری بیشتر گیاهان به خشکی شوند (۲۱ و ۲۴). باکتری های محرک رشد گیاه ا نوع هورمون ها مانند آبسیزیک اسید، اتیلن، جیبریلین، اکسین، سیتوکینین و سالسیلیک اسید را تولید می کنند، که می توانند رشد گیاه را به صورت مستقیم تحت تأثیر قرار دهند (۲ و ۲۰). تولید هورمون اکسین در بین سازوکارهای مذکور بسیار مورد توجه است چرا که اکسین رابطه قابل توجهی با توسعه سیستم ریشه گیاه در شرایط تنفس های محیطی مانند کم آبی داشته و تغییر در متابولیسم آن نقش مهمی در تغییرات وابسته به تنفس در مورفولوژی ریشه بازی می کند (۱۵). تنفس کم آبی سبب کاهش تولید اکسین و افزایش تولید اتیلن و آبسیزیک اسید درونی در گیاهان زراعی می شود. برای کاهش اثرات تنفس کم آبی، گزارش شده است که کاربرد خارجی تریپتوfan سبب افزایش سطوح درونی اکسین شده، بنابراین به طور غیرمستقیم سبب افزایش بقای گیاه در شرایط تنفس کم آبی می شود (۲۲ و ۲۳)، تریپتوfan پیش ماده ساخت اکسین است. اکسین یک نقش کلیدی اما غیر مستقیم در افزایش تحمل به تنفس کم آبی دارد زیرا با شکستن غالیت انتها ی سبب القا تشکیل ریشه های جدید می شود. همچنین سبب افزایش فتوستتر

TSB مایه‌زنی شده و پس از رسیدن تراکم باکتری، به میزان 10^8 سلول در میلی لیتر (تخمین با روش مک فارلند)، سوسپانسیون باکتریایی در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل، به آرامی در ۲۵۰ میلی لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۱ درصد، مجدداً سوسپانسیون شده و برای بذر مال کردن بذور استفاده شد (۱۳).

کشت و مطالعات گلخانه‌ای

آزمایش گلدانی به صورت کنترل شده از نظر شرایط محیطی، به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی در چهار تکرار در اتاق کشت آزمایشگاه بیولوژی دانشگاه مراغه 20000°E ($37^{\circ}37'378\text{N}, 46^{\circ}27'35\text{E}$) در حضور نور با شدت ۲۸ درجه سانتی گراد به اجرا درآمد. تیمارهای ۱۲ گانه مورد مطالعه در ۳ تکرار عبارت بودند از: ۱- باکتری‌ها در سه سطح و شامل بدون مایه‌زنی، ۲- *Bacillus simplex* 40 (B1) *Bacillus simplex* 52 (B2) *Bacillus simplex* 52 (W0) و *Bacillus simplex* 40 (W1) پرلیت مورد استفاده که به ترتیب با عالم اختصاری W0 و W1 بیان می‌شوند. مایه‌زنی باکتریایی به صورت بذرمال و افزودن تریپتوфан همراه با محلول هوگلنند انجام شد. رطوبت گلدانها نیز به شکل وزنی و با ترازوی دقیق انجام شد. بذور گندم کوهدشت جهت ضدغونی به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلرید سدیم ۵ درصد غوطه‌ور شده و با آب مقطر استریل سه بار شستشو شدند. پس از آن به مدت ۴۵ ثانیه با الكل ۷۰ درصد مجدداً ضدغونی و سپس با آب مقطر استریل دوباره به طور کامل آبکشی شدند. این بذور پس از اعمال تیمارهای باکتریایی به صورت بذرمال با تراکم ۷ بذر در گلدانها یک کیلویی محتوى پرلیت استریل، کشت شدند. برای آبیاری گیاهچه‌های حاصل تا اتمام ذخایر بذر از محلول

موجود در ماده آلی خاک عمده‌ترین و در برخی مواقع به صورت جزئی ترشحات ریشه گیاه میزبان از منابع تامین تریپتوfan در خاک هستند. مصطفی و همکاران (۱۸) معتقدند که محدودیت در تأمین تریپتوfan در اثر کمبود ماده آلی خاک یا ترشح محدود از ریشه گیاه، عامل اصلی کاهش تولید اکسین توسط ریزوپاکتری‌ها بوده و کاربرد خارجی تریپتوfan را در رفع موانع یاد شده مؤثر می‌دانند. با عنایت به اینکه ماده آلی خاک منبع اصلی تأمین تریپتوfan مورد نیاز برای بیوسترن اکسین توسط ریزوپاکتری‌ها بوده و میزان ماده آلی بخش قابل توجهی از خاک‌های کشور کمتر از نیم درصد است، احتمال محدودیت در عرضه این اسید آمینه دور از انتظار نیست. لذا با عنایت به نقش پراهمیت اکسین میکروبی در ایجاد مقاومت به تنش کم‌آبی که معضل عمدۀ کشور ناشی از شرایط اقلیمی آن است، در این پژوهش تلاش شد تا اثر کاربرد خارجی تریپتوfan بر تولید اکسین توسط باکتری‌های یاد شده با هدف شناخت اولیه از الگوی رفتاری باکتری انتخاب شده و اثرگذاری آنها بر رشد و نمو گندم در شرایط بدون تنش و تنش رطوبتی شده بررسی شود.

مواد و روش‌ها انتخاب باکتری‌ها

در این مطالعه باکتری‌های آزادی *Bacillus simplex* 40 و *Bacillus simplex* 52 که بر اساس مطالعه کریمی و همکاران (۱۳) دارای توان تولید اکسین در محیط کشت LB حاوی 5mM تریپتوfan و در حضور ترشحات ریشه گندم به علاوه 5mM تریپتوfan بودند، استفاده شد. باکتری‌های مذکور از ریشه گرامینه‌های غیر زراعی شامل گیاهان چشم (*Lolium temulentum*), یولاف وحشی (*Bromus tectorum*), جومیش (*Avena fatua*), جوموشک (*Hordeum murinum*) و علف گندمی ریشکدار (*Agropyron caninum*) جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی ژنتیکی شده بودند (۱۳) و در آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه مراغه نگهداری می‌شدند. بهمنظور مایه‌زنی بذور گندم، یک نوب از اسلنت حاوی باکتری در 250 میلی لیتر محیط کشت

۱۵۰۰۰، سانتریفیوژ شد. ۲۵۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ با ۷۵۰ میکرولیتر محلولی که حاوی تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد و تیوباربیتوريک اسید ۰/۵ درصد بود، مخلوط شد. مخلوط حاصل ۳۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در حمام آبی قرار داده شد. سپس بلافالسله در يخ سرد شده و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. میزان جذب این محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر، خوانده شد. جذب بقیه رنگی‌های غیر اختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین و از مقدار حاصل کسر شد. برای محاسبه میزان مالون دی آلدید، از ضریب خاموشی معادل $155\text{Mm}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ استفاده شده و به صورت نانومول بر گرم وزن تر برگ گزارش شد.

تجزیه آماری

داده‌های به‌دست آمده از این پژوهش پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC تجزیه آماری شدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) نشان داد که اثرات برهمنکش رطوبت \times تریپتوфан \times باکتری بر وزن خشک کل اندام هوایی، وزن خشک برگ، وزن خشک سنبله، وزن تر برگ و وزن تر سنبله در سطح احتمال یک درصد و بر وزن خشک ساقه، وزن تر کل اندام هوایی گندم در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد. کاربرد تریپتوファン به‌تهایی به‌ترتیب باعث افت ۱۰ و ۵ درصد عملکرد ماده خشک گندم در شرایط رطوبتی ۸۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با تیمارهای شاهد شد. بیشترین میزان ماده خشک گندم با ۲۷ درصد افزایش در شرایط ۸۰ درصد ظرفیت زراعی و به میزان ۲۵ درصد در شرایط ۵۰ درصد ظرفیت زراعی متعلق به مایه‌زنی باکتری B1 بود که تلفیق آن با افزودن تریپتوファン به‌ترتیب موجب افت ۲۰ درصد و

یک دوم هوگلند و با رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۳ برگی (مرحله ۱۳ بر اساس کد زادکس) از محلول هوگلند کامل استفاده شد. همزمان با این عمل اعمال تیمارهای رطوبتی با روش وزنی و با استفاده از ترازو شروع و تا آخر آزمایش (مرحله ۹۵ بر اساس کد زادکس) ادامه یافت. کاربرد تریپتوファン بعد از بلوغ برگ دوم و ظهور برگ سوم در مرحله ۱۳ بر اساس کد زادکس شروع و به فواصل زمانی ۱۰ روز و در طی مدت آزمایش ۳ بار تکرار شد.

بعد از ظهور سنبله، نمونه‌برداری از تیمارها انجام و ارتفاع بوته، وزن تر و خشک برگ، ساقه و سنبله اندازه‌گیری شدند.

استخراج و سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز

جهت استخراج آنزیم کاتالاز و آنزیم گایاکول پراکسیداز، ۰/۵ گرم از نمونه برگی با استفاده از هاون چینی سرد و نیتروژن مایع هموژن شده و سپس به آن ۵ میلی‌لیتر از بافرفسفات سرد (pH=7.5) محتوی EDTA ۰/۵ میلی‌مolar اضافه گشت. هموژن‌ها پس از انتقال به لوله‌های آزمایش در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد (۱۹). استخراج آنزیم آسکوربات پراکسیداز مشابه آنزیم‌های ذکر شده بود با این تفاوت که به محلول استخراج، پلی وینیل پیرولیدین (۵ درصد، وزنی-حجمی) و آسکوربات ۲ میلی‌مolar اضافه گشت. اندازه‌گیری آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز به‌ترتیب طبق روش ابی (۲)، تانک و تانگ و نیوتون (۲۷) انجام شد. همچنین، میزان پروتئین محلول با روش برادفورد (۸) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدید

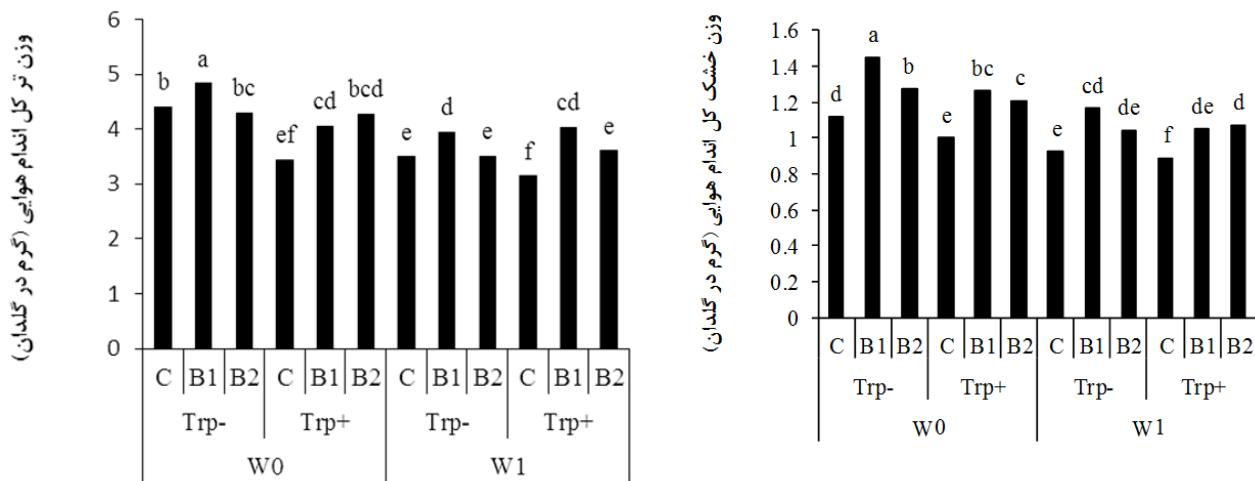
برای اندازه‌گیری میزان مالون دی آلدید از روش هیس و پارکر استفاده شد (۱۱). برای این منظور ۰/۱ گرم برگ تازه در هاون چینی حاوی ۵ میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد سائیده شد. عصاره‌ی حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور

جدول ۱. تجزیه واریانس اثرات نیمارهای اصلی و برهمکنش آنها بر برشی از صفات گیاه گندم

میانگین مربوط

MS * و ** بترتیب یاگر علم وجود تغییرات معنی دار، معنی دار در سطح احتمال پنج درصد و معنی دار در سطح احتمال یک درصد هستند.

卷之三

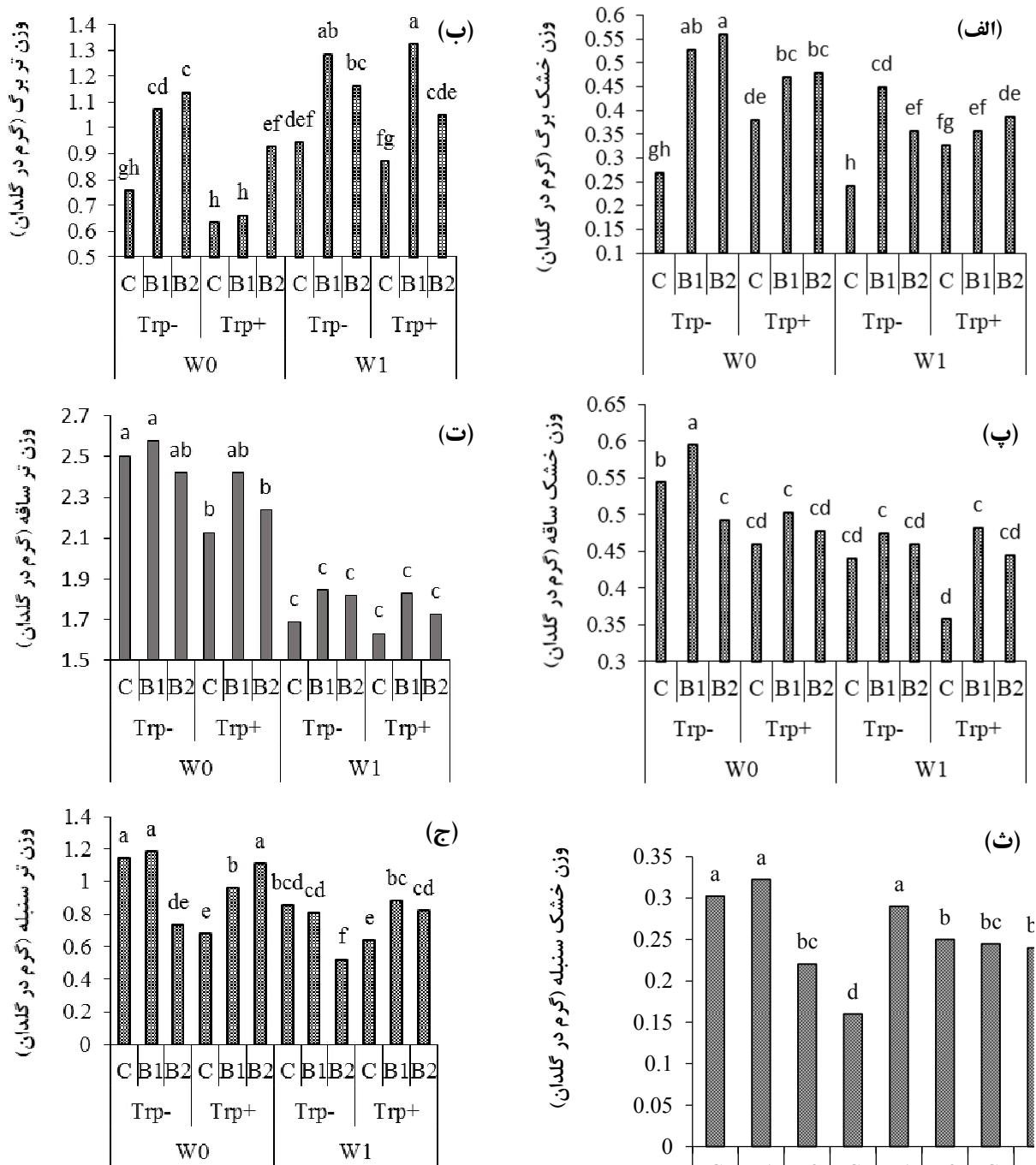


شکل ۱. تأثیر مایهزنی باکتری بر میانگین وزن تر و خشک برگ (گرم در گلدان) در رطوبت‌های مختلف در حضور و عدم حضور تریپتوфан. W0 معادل با ۸۰ درصد ظرفیت زراعی و W1 معادل با ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، (Trp-) و (Trp+) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تریپتوfan، C تیمار بدون مایهزنی باکتریایی، B1 باکتری (*Bacillus simplex*, 40-1) و B2 باکتری (*Bacillus simplex*, 52-2). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

درصد وزن خشک برگ شد. در شرایط ۵۰ درصد ظرفیت مزرعه‌ای کاربرد تریپتوfan باعث افزایش ۲۵ درصد، مایهزنی با باکتری B1 موجب افزایش ۸۰ درصد و باکتری B2 باعث افزایش ۳۱ درصد وزن خشک برگ در مقایسه با تیمار شاهد شدند (شکل ۲-الف). وزن تر برگ در اثر کاربرد تریپتوfan در شرایط ۸۰ درصد ظرفیت زراعی ۱۶ درصد کاهش یافت. مایهزنی باکتریایی توانست ۵۰ درصد این صفت را افزایش دهد که در اثر افزودن تریپتوfan ۳۹ درصد کاهش یافت. کاربرد تریپتوfan با باکتری B2 نیز باعث افت ۱۹ درصد وزن تر برگ شد. در شرایط تنفس رطوبتی کاربرد تریپتوfan تأثیری بر عملکرد وزن تر برگ نداشت ولی مایهزنی باکتریایی به طور متوسط توانست ۲۰ درصد وزن تر برگ را افزایش دهد (شکل ۲-ب). وزن خشک ساقه در شرایط رطوبتی ۸۰ درصد ظرفیت زراعی با افزودن تریپتوfan در مقایسه با تیمار شاهد ۱۵ درصد کاهش یافت. مایهزنی باکتری B1 و B2 به ترتیب باعث افزایش ۲۲ درصد و ۷ درصد این صفت شدند. کاربرد تلفیقی مایهزنی باکتریایی به همراه افزودن تریپتوfan باعث کاهش وزن خشک ساقه شد (شکل ۲-پ). کاربرد تریپتوfan باعث کاهش

۱۷ درصد عملکرد ماده خشک گندم در مقایسه با این تیمار در شرایط رطوبتی مذکور شد. عملکرد ماده خشک گندم در تیمار مایهزنی با باکتری B2 در شرایط مختلف رطوبتی در اثر کاربرد یا عدم کاربرد تریپتوfan تغییری نیافت (شکل ۱). وزن تر کل اندام هوایی در شرایط رطوبتی ۸۰ درصد ظرفیت زراعی با کاربرد تریپتوfan ۲۹ درصد کاهش یافت. مایهزنی باکتریایی B1 باعث افزایش ۹ درصد و تلفیق این تیمار با افزودن تریپتوfan باعث کاهش ۱۶ درصد عملکرد وزن تر در قیاس با مایهزنی باکتری B1 شد. در شرایط تنفس رطوبتی کاربرد تریپتوfan باعث افت ۱۱ درصد عملکرد وزن تر شد. همچنین در طول این شرایط مایهزنی باکتریایی B1 باعث افزایش ۱۲ درصدی عملکرد وزن تر گندم شد.

تفکیک عملکرد ماده خشک کل به وزن برگ و ساقه و سنبله نشان داد (شکل ۲) که در شرایط ۸۰ درصد رطوبت ظرفیت مزرعه‌ای کاربرد تریپتوfan باعث افزایش ۲۸ درصد و مایهزنی باکتریایی (هر دو باکتری) به طور متوسط باعث افزایش ۹۰ درصد وزن خشک برگ شد. کاربرد تلفیقی تریپتوfan به همراه مایهزنی باکتریایی نیز به طور متوسط باعث افزایش ۷۰



شكل ۲. تأثیر مایه‌زنی باکتری بر میانگین وزن خشک برگ (الف)، وزن خشک ساقه (ب)، وزن تر ساقه (پ)، وزن تر برگ (ج)، وزن خشک سنبله (د) و وزن تر سنبله (ث) در رطوبت‌های مختلف در حضور و عدم حضور تریپتوфан. W0 معادل با ۸۰ درصد ظرفیت زراعی و W1 معادل با ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، (Trp-) و (Trp+) به ترتیب بیانگر غلاظت صفر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوfan، C تیمار بدون مایه‌زنی باکتریایی، B1 باکتری (*Bacillus simplex*, 40) و B2 باکتری (*Bacillus simplex*, 52) میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنی دار هستند.

افزایش هورمون‌های آبسیزیک و ایندول استیک در برگ‌ها شده و عملکرد گندم را در شرایط تنفس شوری بهبود می‌بخشد. برطبق بررسی‌های تسوکانوا و همکاران (۲۸)، نقش باکتری‌های محرک رشد در توزیع آسیمیلات‌ها در قسمت‌های مختلف گیاهان با تأثیر آنها بر همئوستازی هورمون‌های گیاهی مرتبط بوده و با ایجاد تغییرات در میزان تولید هورمون‌های گیاهی اتفاق می‌افتد. که می‌تواند به عنوان دلیلی برای تغییرات مشاهده شده در وزن قسمت‌های مختلف گندم در تیمارهای این مطالعه در نظر گرفته شود.

آنژیم‌های آنتی اکسیدان و میزان مالون دی آلدید
فعالیت آنژیم کاتالاز و گایاکول پراکسیداز تحت تأثیر اثرات متقابل رطوبت در باکتری در سطح احتمال یک درصد قرار گرفت. تحت شرایط تنفس بیشترین فعالیت آنژیم کاتالاز در تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری‌های B1 و B2 با مقدار متوسط ۰/۰۳ واحد آنژیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه نسبت به شاهد با مقدار ۰/۰۲ واحد آنژیمی بر میلی‌گرم افزایش یافت. همچنین، بیشترین میزان آنژیم گایاکول پراکسیداز با مقدار متوسط ۱/۵ واحد آنژیمی بر میلی‌گرم پروتئین در دقیقه نیز در تیمارهای مذکور مشاهده شد که نسبت به شاهد ۲/۳ برابر افزایش فعالیت داشت (شکل ۳).

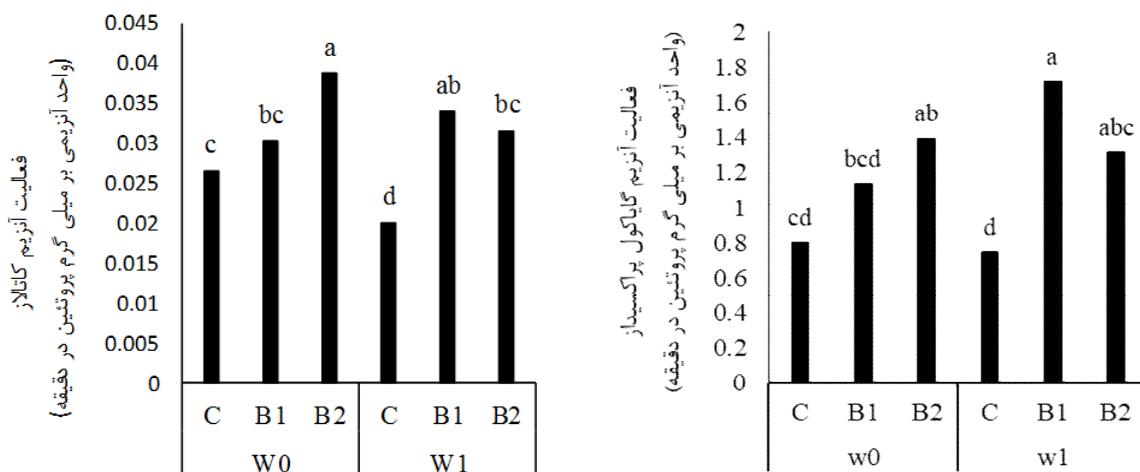
همچنین، در خصوص آنژیم کایاگول پراکسیداز اثر متقابل کاربرد تریپتوфан و مایه‌زنی باکتری‌ایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد و کاربرد تریپتوfan باعث افزایش فعالیت این آنژیم در تیمار مایه‌زنی با باکتری B1 شد (شکل ۴).

بررسی غلظت مالون دی آلدید نشان داد که اثر برهم‌کنش رطوبت و کاربرد تریپتوfan در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده و کاربرد تریپتوfan بر غلظت آن در شرایط تنفس بی اثر بوده و در شرایط نرمال نیز باعث افزایش ۱۰۰ درصد تولید آن در مقایسه با شاهد شد (شکل ۵).

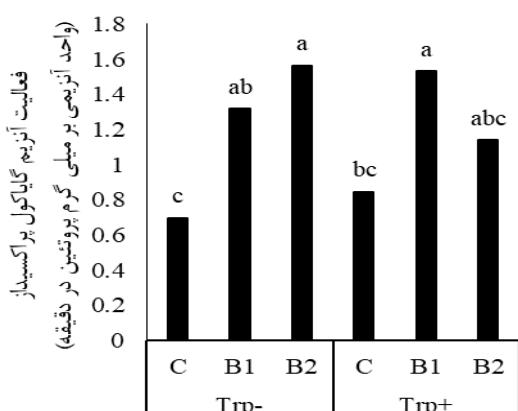
کاربرد باکتری *Bacillus edaphicus* توانسته است جذب پتابسیم را در شرایط کمبود این عنصر و همچنین، تنفس فلزات

۱۴ درصد وزن تر ساقه در شرایط نرمال رطوبتی شد. سایر تیمارها بر این صفت بی‌تأثیر بودند (شکل ۲-ت). وزن خشک سنبله در شرایط نرمال رطوبتی با کاربرد تریپتوfan ۹۰ درصد کاهش یافت. مایه‌زنی باکتری B1 بر این صفت بی‌تأثیر بوده ولی مایه‌زنی باکتری B2 باعث کاهش ۲۷ درصد این صفت شد. هیچ یک از تیمارهای آزمایشی تأثیری بر وزن خشک سنبله در شرایط ۵۰ درصد ظرفیت زراعی در مقایسه با شاهد نداشتند (جدول ۲-ث). افزودن تریپتوfan در شرایط نرمال و تنفس رطوبتی باعث کاهش وزن تر سنبله در مقایسه با تیمار شاهد مربوطه شد. مایه‌زنی باکتری‌ایی موجب تغییر تأثیر تریپتوfan بر این صفت شد (شکل ۲-ج).

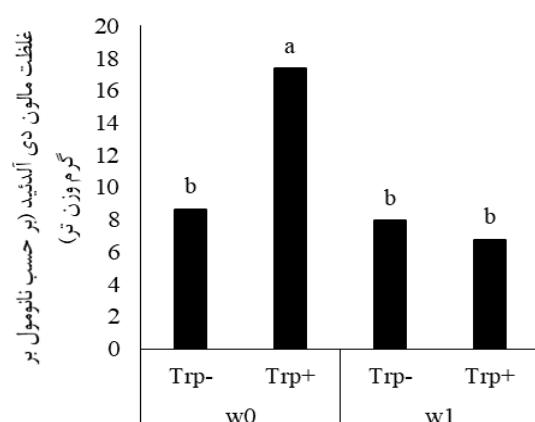
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۱) همچنین نشان داد که از میان تیمارهای آزمایشی مساحت برگ پرچم فقط تحت تأثیر تیمارهای رطوبتی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شده و تنفس کم‌آبی سبب کاهش ۸ درصد مساحت برگ پرچم نسبت به شاهد شد (داده‌ها نشان داده نشده‌اند) و مقادیر آن در شرایط ۸۰ و ۵۰ درصد ظرفیت زراعی به ترتیب عبارت بودند از: ۲۳/۸ و ۲۱ سانتی‌متر. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر عدد اسپد (کلروفیل) در شرایط این آزمایش معنی‌دار نبود (جدول ۱). هنگام رویارویی گیاه با تنفس کم‌آبی، سیگناال هورمونی اسید آبسیزیک باعث بسته شدن روزنه‌های برگ می‌شود. با بسته شدن روزنه، تعرق از برگ‌های گیاه کاهش می‌یابد. تعرق عامل خنک شدن گیاه بوده و باعث کشیدن آب و عناصر غذایی از خاک به داخل گیاه می‌شود. بنابراین تنفس بلند مدت با کاهش ظرفیت گیاه در تنظیم دمای گیاه سبب می‌شود که گیاهان کمبود آب و عناصر غذایی را تجریبه کرده و ممکن است فتوستتر را کاهش دهند. کاهش فتوستتر و پیری زودرس اندام‌های فتوستتر باعث کاهش تولید ماده خشک و عملکرد بیولوژیک شده و همین امر باعث می‌شود تا سایر اجزای عملکرد نیز تحت تأثیر قرار گیرند (۱ و ۲۶). بنابراین بهنظر می‌رسد که میزان اسید آبسیزیک در کتلرل این امر بسیار مهم است. بر طبق نتایج تامور و همکاران (۲۶) مایه‌زنی باکتری‌ایی و کاربرد تلفیقی تریپتوfan در غلظت یک میکروگرم بر لیتر باعث



شکل ۳. مقایسه میانگین تأثیر مایهزنی باکتریایی بر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاگول پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه) در رطوبت‌های مختلف، W0 معادل با ۸۰ درصد ظرفیت زراعی و W1 معادل با ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، (Trp-) و (Trp+) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تریپتوфан، C تیمار بدون مایهزنی باکتریایی و شاهد، B1 باکتری (Bacillus simplex 52) و B2 باکتری (Bacillus simplex 40). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.



شکل ۴. مقایسه میانگین تأثیر مایهزنی باکتریایی بر میزان فعالیت آنزیم گایاگول پراکسیداز (واحد آنزیمی بر میلی گرم پروتئین در دقیقه) در اثر افزودن تریپتوфан، (-Trp) و (+Trp) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تریپتوfan، C تیمار بدون مایهزنی باکتریایی و شاهد، B1 باکتری (Bacillus simplex 40) و B2 باکتری (Bacillus simplex 52). میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.



شکل ۵. مقایسه میانگین تأثیر کاربرد تریپتوfan بر غلظت مالون دی آلدئید در رطوبت‌های مختلف، W0 معادل با ۸۰ درصد ظرفیت زراعی و W1 معادل با ۵۰ درصد ظرفیت زراعی، (-Trp) و (+Trp) به ترتیب بیانگر غلظت صفر و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تریپتوfan. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف آماری معنی‌دار هستند.

این آزمایش تامور و همکاران (۲۶) نشان دادند که مایهزنی باکتری‌های عملکرد گندم را افزایش دهنده، در تیمارهای شرایط تنش شوری عملکرد گندم را افزایش دهنده، در تیمارهای باکتریایی جذب عناصر غذایی، منیزیم، کلسیم، آهن، فسفر و نیترات نسبت به شاهد افزایش یافته بود. همچنین وزن تر گیاه، محتوای کلروفیل در برگ‌ها، میزان پرولین و قند در برگ‌ها، میزان هورمون‌های اسید آبسیزیک و ایندول استیک اسید در برگ‌ها نیز نسبت به شاهد افزایشی بود. افزودن تریپتوфан به تیمارهای باکتریایی فوق در غلاظت یک میکروگرم بر لیتر عملکرد بهتری را در بر داشت. هر چند افزودن تریپتوfan به تنها یی نیز منجر به بهبود شرایط گیاه در مقایسه با شاهد شد اما تلفیق با مایهزنی باکتریایی نتایج بهتری را در پی داشت.

تنش خشکی معمولاً باعث افزایش اکسیداسیون چربی‌ها (میزان مالون دی آلدئید) می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد که از بین تیمارهای آزمایشی اثر برهم‌کنش تریپتوfan × رطوبت بر آن معنی‌دار بوده و کاربرد تریپتوfan در شرایط نرمال رطوبتی باعث افزایش غلاظت مالون دی آلدئید شد. در شرایط تنش رطوبتی تیمارهای آزمایشی نتوانستند میزان این صفت را تغییر دهند. بر طبق یافته‌های بتول و همکاران (۵) مایهزنی گوجه فرنگی با باکتری *Bacillus Subtilis* سویه HAS31 موجب کاهش میزان مالون دی آلدئید در شرایط تنش رطوبتی شده است. ارشد و همکاران (۴) اثر کاربرد غلاظت‌های مختلف تریپتوfan 10^{-7} تا 10^{-1} گرم بر کیلوگرم خاک را بر گیاه کتان مورد بررسی قرار دادند، نتایج آنها نشان داد که در تمامی غلاظت‌های مورد مطالعه عملکرد ماده خشک در مقایسه با تیمار شاهد افزایش یافت. بیشترین میزان ماده خشک با مقدار گرم بر گیاه به میزان $61/5$ در تیمار 10^{-6} تریپتوfan در مقابل $49/2$ در تیمار شاهد به دست آمد. این پژوهشگران دلیل افزایش عملکرد را با تبدیل تریپتوfan به اکسین توسط جمعیت میکروبی ریزوسفر و اثرات مثبت اکسین مرتبط دانستند. علاوه بر این جذب مستقیم تریپتوfan توسط گیاه و تبدیل آن به اکسین از دلایل دیگر این پژوهشگران عنوان شد. مارتیز و همکاران (۱۷)

سنگین به ترتیب در کتان و کلزا بهبود بخشیده و با تقویت سیستم آنتی اکسیدانی باعث رشد آنها شود (۶). مطالعه اسپرنسنگر و همکاران (۲۵) نشان داد که کاربرد باکتری محرک رشد می‌تواند جوانه‌زنی، رشد و توسعه ریشه، وزن خشک ریشه و ساقه، ساختار سطح برگ، محتوای کلروفیل، میزان پروتئین و جذب عناصر را در سیب زمینی متأثر سازد.

تامور و همکاران (۲۶) گزارش کردند که مایهزنی گندم با باکتری و دوموناس می‌تواند به ترتیب ۵۷ و ۵۹ درصد فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز و پراکسیداز را در شرایط تنش افزایش دهد که در حضور تریپتوfan مجدداً ۲۹ درصد افزایش بیشتری نشان دادند. بر طبق گزارش این پژوهشگران در شرایط مشابه باکتری *Bacillus cereus* توانست فعالیت کاتالاز را ۴۴ درصد و فعالیت پراکسیداز را ۹۶ درصد افزایش دهد، افزودن تریپتوfan به همراه این باکتری منجر افزایش ۵۵ درصد در فعالیت کاتالاز و افزایش ۱۶ درصد در شرایط تنش شوری شد. آنها دلیل این افزایش را با افزایش تجمع پرولین در شرایط فوق مرتبط دانستند. یاسمن و همکاران (۳۰) گزارش کردند که مایهزنی باکتری‌های *Bacillus pumilus* و *Pseudomonas* به ۱۲۸ در شرایط تنش رطوبتی به ترتیب باعث افزایش ۱۳۵، ۱۳۵ و ۱۳۵ درصد فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش رطوبتی شده است. افزودن تریپتوfan در غلاظت $10^{-3} \times 2/3$ میلی‌گرم بر کیلوگرم در خاک منجر به افزایش عملکرد آنزیم‌های مذکور شد. در شرایط تنش کم‌آبی در طی فرایندهای متعددی تولید انواع اکسیژن فعال صورت می‌گیرد که منجر به بروز تنش اکسیداتیو در سلول‌های گیاهی می‌شود. در این حالت آنتی اکسیدان‌ها تشکیل شدنند، فعال شده و از ساختارهای حیاتی گیاه در این شرایط حمایت می‌کنند (۱). مطالعات انجام شده توسط واردهارجولا و همکاران (۲۹) نشان داده است که مایهزنی باکتری‌های محرک رشد منجر به بهبود عملکرد فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان شده و در نهایت سازگاری گیاه به تنش خشکی را افزایش داده است. در آزمایشی مشابه با تیمارهای

تنفس رطوبتی و تنفس رطوبتی توانستند عملکرد ماده خشک گندم را در مقایسه با تیمار شاهد افزایش دهند. *Bacillus simplex* 40 داشت. افزودن تریپتوфан در غلظت مورد استفاده در این پژوهش چه به تنها بی و چه همراه با تلفیق مایه‌زنی باکتریایی منجر به کاهش عملکرد در مقایسه با شاهدهای مربوطه شد. با توجه به ارتباط بین تولید اکسین و تریپتوfan می‌توان این امر را ناشی از زیادی تولید اکسین عنوان کرد. بنابراین، این غلظت برای تریپتوfan توصیه نمی‌شود. راهکارهای زیستی همسو با محیط زیست و کشاورزی پایدار بوده و آینده خوبی را برای کره زمین رقم خواهند زد، لذا پیشنهاد می‌شود مطالعات مشابه با استفاده از یافته‌های این پژوهش مورد آزمون قرار بگیرند.

با نشان دار کردن تریپتوfan و کاربرد خاکی آن تبدیل آن به اکسین را اثبات کردند.

نکته دیگری که بایستی به آن توجه داشت تأثیر افزایشی غلظت بالای اکسین بر میزان تولید اتیلن است (۷) و همین امر می‌تواند به کاهش عملکرد در گیاهان بر اثر افزودن اکسین خارجی مدد نظر قرار گیرد، اما با توجه به اینکه باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق دارای توان تجزیه آمینوسیکلопروپان به عنوان پیش ماده تولید اتیلن بودند (۱۳) اظهار نظر در خصوص آن نیازمند مطالعات تکمیلی خواهد بود.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس یافته‌های این پژوهش مایه‌زنی باکتری‌های *Bacillus simplex* 52 و *Bacillus simplex* 40 در شرایط بدون

منابع مورد استفاده

1. Abdoli, M., M. Saeidi, S. Jalali-Honarmand and M. Azhand. 2013. The effect of foliar application of Indole-3-Acetic Acid (IAA) and roles of ear photosynthesis on grain yield production of two wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.) under post anthesis water deficit. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research* 4: 1406-1413.
2. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
3. Ahemad, M. and M. Kibret. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University Science* 26: 1-20.
4. Arshad, M., H. Altaf and S. Abdul. 1995. Effect of soil applied L-tryptophan on growth and chemical composition of cotton. *Journal of Plant Nutrition* 18: 317-329.
5. Batool, T., S. Ali and M. F. Seleiman. 2020. Plant growth promoting rhizobacteria alleviates drought stress in potato in response to suppressive oxidative stress and antioxidant enzymes activities. *Scientific Reports* 10: 16975.
6. Beckers, G. J. and U. Conrath. 2007. Priming for stress resistance: from the lab to the field. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 425-431.
7. Bottcher, C., C. A. Burbidge and P. K. Boss. 2013. Interactions between ethylene and auxin are crucial to the control of grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening. *BMC Plant Biology* 13: 222.
8. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254.
9. Etesami, H., H. A. Alikhani and A. A. Akbari. 2009. Evaluation of plant growth hormones production (IAA) ability by Iranian soils rhizobial strains and effects of superior strains application on wheat growth indexes. *World Applied Science Journal* 6: 1576-1584.
10. Hassan, T. and A. Bano. 2015. The stimulatory effects of L-tryptophan and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on soil health and physiology of wheat. *Journal of soil science and plant nutrition* 15: 190-201.
11. Heath, R. L. and L. Packer. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
12. Intergovernmental Panel on Climate Change. 2014. Climate Change 2014 – Impacts, Adaptation and Vulnerability: Part A: Global and Sectoral Aspects: Working Group II Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report, Cambridge.
13. Islam, S., A. M. Akanda, A. Prova, M. T. Islam and M. M. Hossain. 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their Effect on plant growth promotion and disease suppression. *Frontiers in Microbiology* 6: 1360.

14. Karimi, E., N. Aliasgharzad, M. R. Neyshabouri and E. Esfandiari. 2019. Isolation, molecular identification, and assessing plant growth promoting activities of biofilm forming bacteria from gramineae rhizosphere in north west of Iran. *Applied Soil Research* 7: 14-28.
15. Khan, N., S. Ali, H. Tariq, S. Latif, H. Yasmin, A. Mehmood and M. A. Shahid. 2020. Water conservation and plant survival strategies of rhizobacteria under drought stress. *Agronomy* 10: 1683.
16. Kumar, B., D. M. Pandey, C. L. Goswami and S. Jain. 2001. Effect of growth regulators on photosynthesis, transpiration and related parameters in water stressed cotton. *Biologia Plantarum* 44: 475-478.
17. Martens, D. A. and W. T. Frankenberger. 1992. Assimilation of 3'-14C-indole-acetic acid and tryptophan by wheat varieties from nutrient media. In: Proceedings 19th Annual Meeting. Plant Growth Regulator Society of America. San Francisco, CA. pp. 99-100.
18. Mustafa, A., M. Imran, M. Ashraf and K. Mahmood. 2018. Perspectives of using L-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: A review. *Pedosphere* 28: 16-34.
19. Naveed, M., M. A. Qureshi, Z. A. Zahir, M. B. Hussain, A. Sessitsch and B. Mitter. 2015. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Annals of microbiology* 65: 1381-1389.
20. Pavlova, A., M. Leontieva, T. Smirnova, G. N. Kolomeitseva and A. Tsavkelova. 2017. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobilelindl*. *Journal of Applied Microbiology* 123: 217-232.
21. Prasad, M., R. Srinivasan, M. Chaudhary and L. K. Jat. 2019. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) for Sustainable Agriculture. Elsevier, Amsterdam.
22. Rao, S. R., A. Qayyum, A. Razzaq, M. Ahmad, I. Mahmood and A. Sher. 2012. Role of foliar application of salicylic acid and l-tryptophan in drought tolerance of maize. *Journal of Animal and Plant Sciences* 22: 768-772.
23. Sairam, R., K. Veerabhadra Rao and G. C. Srivastava. 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Science* 163: 1037-1046.
24. Selvakumar, G., P. Panneerselvam and A. N. Ganeshamurthy. 2012. Bacterial Mediated Alleviation of Abiotic Stress in Crops. pp. 205–224. In: Bacteria in Agrobiology: Stress Management. Springer, Berlin.
25. Sprenger, H., E. Alexander, S. Sylvia, R. Katharina, T. Anja, L. Mai, W. Dirk and K. Dirk. 2018. Metabolite and transcript markers for the prediction of potato drought tolerance. *Plant Biotechnology Journal* 16: 939-950.
26. Tamoor, U. H. and A. Bano. 2014. Role of plant growth promoting rhizobacteria and L-tryptophan on improvement of growth, nutrient avail-ability and yield of wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress. *International Journal of Academic and Applied Research* 4: 30-39.
27. Tang, W. and R. J. Newton. 2005. Polyamines reduce salt-induced oxidative damage by increasing the activities of antioxidant enzymes and decreasing lipid peroxidation in Virginia pine. *Plant Growth Regulation* 46: 31-43.
28. Tsukanova, K. A., V. K. Chebotar, J. J. M. Meyer, T. N. Bibikova. 2017. Effect of plant growth-promoting Rhizobacteria on plant hormone homeostasis. *South African Journal of Botany* 113: 91-102.
29. Vardharajula, S., A. S. Zulfikar, M. Grover, G. Reddy and V. Bandi. 2011. Drought-tolerant plant growth promoting *Bacillus* spp., effect on growth, osmolytes, and antioxidant status of maize under drought stress. *Journal of Plant Interaction* 6: 1-14.
30. Yasmin, H., A. Nosheen, R. Naz, A. Bano and R. Keyani. 2017. L-tryptophan-assisted PGPR-mediated induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Interactions* 12: 567-578.
31. Zhao, Y., 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 61: 49-64.

Effect of Co-Application of Auxin-Producing Plant Growth Promoting Bacteria and Tryptophan on Wheat Growth under Water Stress Conditions

E. Karimi^{1*}, Z. Mohammadi², and E. Esfandiari³

(Received: May 12-2021; Accepted: January 12-2022)

Abstract

Auxin produced by plant growth-promoting bacteria (PGPR) in the wheat rhizosphere, can improve plant yield under water deficit stress condition. To investigate this issue, a completely randomized factorial design with three replications was conducted under greenhouse condition at the University of Maragheh, Eastern-Azabayan, Iran during 2019. Treatments were two types of growth-promoting bacteria (*Bacillus simplex* 40, *Bacillus simplex* 52); two moisture levels (50% and 80% of water holding capacity in perlite) and two levels of tryptophan (0 mg L⁻¹ and 100 mg L⁻¹). Under the condition of 50% of water holding capacity, the application of tryptophan without bacterial inoculation decreased wheat dry matter yield by 5%. Inoculation of *Bacillus simplex* 40 in the absence of tryptophan led to 25% increase in wheat dry matter yield while application of tryptophan reduced the trait by 17%. Under the stress condition, catalase enzyme activity increased by 33% and guaiacol peroxidase activity increased by 2.3% in inoculation treatments compared to control treatments. In conclusion, bacterial inoculation was able to increase wheat dry matter yield by improving the wheat antioxidant system under drought-induced oxidative stress. Furthermore, the decrease in wheat dry matter in the presence of tryptophan treatment may be attributed to probable hormonal disorders in wheat caused by high concentration of applied tryptophan.

Keywords: Microbial auxin, Leaf dry weight, Catalase, Guaiacol peroxidase

1, 2. Assistant Professor and Former MSc Students, Respectively, Department of Soil Science and Engineering, Maragheh University, Maragheh, Iran.

3. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Maragheh University, Maragheh, Iran.

*: Corresponding Author, Email: sm_ka80@yahoo.com