تحقیقات آب و خاک ایران، دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۴ (ص۵۹۶-۵۸۹)

ارزیابی کمّی و کیفی توان تولید اکسین (IAA) برخی سویه‌های سیانوباکتر جداسازی‌شده از شالیزارهای استان گیلان

صاحب سودایی‌مشایی[1*]، ناصر علی‌اصغرزاد[2]، قربان‌علی نعمت‌زاده[3]، ندا سلطانی[4]

۱. دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه تبریز

۲. استاد بیولوژی خاک گروه علوم خاک دانشگاه تبریز

۳. استاد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری و پژوهشکدهٔ ژنتیک و زیست فناوری طبرستان

۴. دانشیار پژوهشکدهٔ علوم پایهٔ کاربردی جهاد دانشگاهی دانشگاه شهید بهشتی

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۹ـ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۳/۲۵)

چکیده

سیانوباکترها گروهی از پروکاریوت‌ها هستند که از نظر پتانسیل تولید مواد محرک رشد گیاه، به‌ویژه در زمینهٔ تولید هورمون‌های گیاهی، کمتر دربارهٔ آن‌ها تحقیق و مطالعه شده است. در این تحقیق توان تولید ایندول استیک اسید (IAA) سویه‌های سیانوباکتریایی جداسازی‌شده از شالیزارهای استان گیلان به طور کمّی و کیفی ارزیابی و پتانسیل آن‌ها بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذرهای برنج بررسی شد. نتایج نشان داد توان تولید هورمون IAA در چند جدایهٔ سیانوباکترهای شناسایی‌شده وجود دارد. در تیمار بدون اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان جدایه‌های GGuCy-34 و GGuCy-42 به ترتیب ۱۴٫۹۸ و ۱۰٫۸۳ میکروگرم IAA بر میلی‌لیتر بر کلروفیل *a*، در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال‌ـ تریپتوفان جدایه‌های GGuCy-34 و GGuCy-15 و GGuCy-42 به ترتیب ۲۳٫۷ و ۱۷٫۴۶ و ۱۵٫۸۱ میکروگرم IAA بر میلی‌لیتر بر کلروفیل *a*، و در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال‌ـ تریپتوفان جدایه‌های GGuCy-15 و GGuCy-16 به ترتیب ۲۹٫۱۶ و ۲۱٫۶۱ میکروگرم IAA بر میلی‌لیتر بر کلروفیل *a* بیشترین مقادیر اکسین (IAA) را تولید کردند. نتایج نشان می‌دهد تولید میزان IAA به نوع جدایه و شرایط محیط کشت بستگی کامل دارد. انرژی و سرعت جوانه‌زنی بذرها تحت تأثیر سویه‌های GGuCy-25، GGuCy-42، GGuCy-41، GGuCy-26، و GGuCy-50 و وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه در بذرهای تلقیح‌شده با سویه‌های GGuCy-42، GGuCy-50، و GGuCy-25 بیشترین افزایش را داشته است.

کلیدواژگان: ایندول استیک اسید، برنج، تریپتوفان، جوانه‌زنی، سیانوباکتر.

مقدمه

جمعیت ریزجانداران در تعاملاتی درگیرند که بر توسعهٔ روابط خاک‌ـ گیاه و برخی فعالیت‌های سودمند ریزجانداران تأثیرگذارند و می‌توانند به مثابهٔ ابزار زیست‌فناورانهٔ کم‌هزینه جهت حل مشکلات سیستم پایدار مورد بهره‌برداری قرار گیرند (Madigan *et al*., 2012). توسعهٔ ابزارهای زیست‌فناوری امکانات جدیدی جهت تولید دامنهٔ وسیعی از محصولات مختلف را فراهم آورده است. از جانداران مفید و مهم خاک می‌توان به سیانوباکترها اشاره کرد؛ که امروزه در زیست‌فناوری مطرح‌اند. سیانوباکترها، از لحاظ مورفولوژیک و اکولوژیک، گروهی وسیع و متنوع از باکتری‌های اکسیژنیک و فتوتروفیک را شامل می‌شوند و رابطهٔ دوری با باکتری‌های گرم مثبت را نشان می‌دهند (Madigan *et al*., 2012).

باکتری‌ها و سیانوباکترهای محرک رشد گیاه[1] (PGPR) قادرند از طریق سازوکارهای مختلف بر گیاهان اثر مثبت بگذارند. برخی از آن‌ها مستقیم موجب تحریک رشد گیاه می‌شوند (Glick, 1995). این عمل از طریق تولید و ترشح تنظیم‌کننده‌های رشد، مثل فیتوهورمون‌ها (اکسین، جیبرلین، سیتوکینین)، سیدروفور، HCN، یا از طریق فراهم آوردن عناصر غذایی مورد نیاز گیاه صورت می‌گیرد.

یکی از راه‌های تأثیر باکتری‌ها بر رشد و نمو گیاهان سنتز فیتوهورمون ایندولی[2] (IAA) است. این هورمون باعث توسعهٔ سیستم جذب توسط ریشهٔ گیاه و به دنبال آن افزایش جذب عناصر غذایی به وسیلهٔ گیاه می‌شود (Sergeeva *et al*., 2002). باکتری‌ها غالباً جهت تولید اکسین از اسید آمینه تریپتوفان به مثابهٔ پیش‌نیاز استفاده می‌کنند (VaralakshmI and Malliga,

* نویسندهٔ مسئول: ssoodaie78@gmail.com

1. Plant Growth Promoting Rhizobacteria
2. Indole Acetic Acid

2012). اکسین‌ها در اوایل قرن بیستم به منزلهٔ مواد تنظیم‌گر رشد گیاه شناخته شدند. در سال‌های اخیر اهمیت مواد تنظیم‌کنندهٔ رشد گیاهان، که ریزجانداران خاک آن‌ها را تولید می‌کنند، مورد توجه قرار گرفته است (Bric *et al*., 1991).

اثر سودمند سیانوباکترها، به مثابهٔ کود زیستی، به‌ویژه برای گیاه برنج، اغلب به منزلهٔ نتیجهٔ مواد فعال زیستی تولیدشده به وسیلهٔ این موجودات طی رشد و تکثیرشان در خاک تفسیر شده است. تعدادی سیانوباکتر شناخته شده‌اند که در مراحل مختلف رشد اسیدهای آمینهٔ برون‌سلولی نظیر اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک، پرولین، والین، گلاسین، و آلانین در محیط تولید می‌کنند (Karthikeyan *et al*., 2007). سیانوباکترها، علاوه بر تثبیت نیتروژن هوا، فواید دیگری نیز برای گیاه برنج دارند؛ از جمله اینکه با ترشح مواد محرک رشد مانند هورمون‌ها (اکسین و ژیبرلین)، ویتامین‌ها (گروه B، اسید اسکوربیک C)، و اسیدهای آمینه (اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک) رشد سریع‌تر و بهتر گیاه را فراهم می‌کنند (Thajuddin and Subramanian, 2005; Rodriguez *et al*., 2006). چندین جنس سیانوباکتر را، بدون هتروسیست، از اراضی شالیزاری مختلف جدا و ظرفیت این سویه‌ها را جهت تولید هورمون گیاهی ایندول ۳- استیک اسید (IAA) آزمایش کردند (Ahmed *et al*., 2010). بر مبنای تجزیهٔ توالی ژن 16s rRNA این جدایه‌ها به عنوان *Synechocystis sp*.، *Chroococcidiopsis sp*.، *Leptolyngbya sp*.، و *Phormidium sp*. شناسایی شدند. محققان نتیجه گرفتند سیانوباکترهای بدون هتروسیست نیز این پتانسیل را دارند تا در بهبود رشد و عملکرد گیاهان زراعی استفاده شوند (Ahmed *et al*., 2010).

Saadatnia and Riahi (2009) رشد گیاهچهٔ برنج تیمارشده با چهار گونه *Anabaena* را در شرایط گلخانه بررسی کردند و افزایش ۵۳ درصد در ارتفاع بوته، ۶۶ درصد در طول ریشه، ۵۸ درصد در وزن اندام هوایی تازه، و ۸۰ درصد در وزن ریشهٔ تیمارها را نسبت به شاهد نشان دادند. تعداد صد جدایه از باکتری‌های PGPR به منظور ارزیابی فعالیت تحریک‌کنندگی رشد، تحت شرایط سترون، در تلقیح دانه‌های کلزا، نشان داد ۵۸ درصد باکتری‌ها باعث افزایش طول ریشه (تا ۱۳۹٪) و ۳۵ درصد جدایه‌ها باعث کاهش رشد (تا ۷۷٪) می‌شوند. ۷ درصد باکتری‌ها نیز هیچ اثری بر رشد گیاه نداشتند (Asghar *et al*., 2004). در ایران کارهای پژوهشی محدودی در زمینهٔ سیانوباکترها انجام شده است. پژوهش حاضر بر مبنای این فرضیه انجام شد که سیانوباکترهای جداسازی‌شده می‌توانند مقادیر کافی هورمون رشد گیاه IAA تولید کنند. بنابراین، هدف از اجرای این پژوهش، جداسازی و خالص‌سازی و شناسایی سیانوباکترها از شالیزارهای استان گیلان و ارزیابی توان تولید ایندول ۳- استیک اسید توسط این جدایه‌ها و تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذرهای برنج بود؛ که می‌تواند به استفادهٔ کاربردی از این سیانوباکترها در سطحی وسیع منجر شود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق شصت نمونه سیانوباکتر از شالیزارهای استان گیلان جدا و در نهایت سی جدایه خالص شد و مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی و شناسایی سیانوباکترها و شرایط رشد

کشت نمونه‌های خاک مطابق روش کشت سیانوباکترهای خاکزی انجام گرفت (Kaushik, 1987). برای ایجاد کلنی‌های اولیهٔ سیانوباکتریایی و جداسازی آن‌ها از خاک، ۳۰ گرم از هر نمونهٔ خاک به پتری‌های استریل با قطر ۹ سانتی‌متر منتقل و سپس مقدار مناسبی از محیط کشت مایع BG11 و $BG11_0$ (بدون نیتروژن) در تیمار جداگانه به آن‌ها اضافه شد (Stanier *et al*., 1971). نمونه‌ها حدود سه تا چهار هفته در اتاق کشت در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس با نور دائمی قرار داده شدند. بعد از پیدایش کلنی‌های سیانوباکتریایی بر سطح خاک حاوی محیط کشت، نمونه‌های سیانوباکتر به صورت کلنی به پتری‌های حاوی محیط کشت جامد BG11 و $BG11_0$ (با افزودن آگار ۱٫۵٪) منتقل شدند. سپس، طی واکشت‌های مکرر (شش مرتبه) نمونه‌های سیانوباکتریایی خالص شدند. مقداری از کلنی در کشت جامد به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت مایع (BG11 و $BG11_0$) منتقل شدند و به مدت سه هفته در اتاقک رشد، در حالت تکان خوردن، قرار گرفتند (Johansson and Bergman, 1994).

برای شناسایی جدایه‌ها به روش مورفولوژیک، با تهیهٔ لام نیمه‌دائمی از کلنی‌ها و با استفاده از میکروسکوپ نوری و کلیدهای شناسایی سیانوباکترها، مشخصات میکروسکوپیک و ماکروسکوپیک نمونه‌های مورد نظر شناسایی و تعیین شدند (John *et al*., 2003؛ Prescott, 1970؛ Desikhachary, 1959).

آزمون اندازه‌گیری کیفی ایندول استیک اسید (IAA)

سنجش کیفی تولید IAA توسط جدایه‌های سیانوباکتر بر اساس روش پیشنهادی Shrivastava and Kumar (2011) انجام شد. در این روش پلیت حاوی محیط کشت جامد (BG11 و $BG11_0$) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان (استریل‌شده با روش فیلتر) آماده شد. چهار چاهک به قطر ۱ و عمق حدود ۰٫۵ سانتی‌متر ایجاد شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از

سوسپانسیون سیانوباکتر با دانسیتهٔ نوری [1] (OD) یکسان داخل هر چاهک اضافه و پلیت‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۷ درجهٔ سانتی‌گراد و شدت نور ۲۵۰۰ لوکس قرار داده شدند. در هفته‌های اول، دوم، سوم، و چهارم بعد از تلقیح سیانوباکترها مقدار ۱۰۰ میکرولیتر معرف سالکووفسکی[2] (شامل ۱ میلی‌لیتر $FeCl_3$ ۰٫۵ مولار در ۵۰ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ($HClO_4$ ۳۵٪) به چاهک اضافه شد. بعد از سی دقیقه تشکیل هاله به رنگ صورتی، که نشان‌دهندهٔ تولید IAA توسط جدایهٔ سیانوباکتریایی بود، ارزیابی شد.

آزمون اندازه‌گیری کمّی ایندول استیک اسید (IAA)

برای اندازه‌گیری کمّی تولید IAA، محیط‌های کشت مایع سیانوباکترها (BG11 و $BG11_0$) آماده و به آن‌ها اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان سترون‌شده با فیلتر (با غلظت‌های ۰، ۱۰۰، و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اضافه شد. سپس مقدار مشخصی از سیانوباکترها (زیست‌تودهٔ برابر از طریق تعیین OD در طول موج ۷۵۰ نانومتر) به ارلن‌های حاوی محیط کشت افزوده شد و ارلن‌ها در شرایط کشت قرار داده شدند. پس از پانزده و سی روز، مقداری از محیط کشت برداشته و به مدت ده دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت سانتریفیوژشده با ۲ میلی‌لیتر محلول سالکووفسکی (شامل ۱ میلی‌لیتر از $FeCl_3$ ۰٫۵ مولار در ۵۰ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ($HClO_4$ ۳۵٪) ترکیب شدند. این ترکیب سی دقیقه در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت و در نهایت ایجاد رنگ صورتی تا قرمز نشان‌دهندهٔ تولید IAA توسط سیانوباکترها بود. همچنین، با تهیهٔ استاندارد از غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ایندول ۳- استیک اسید خالص در اتانول ۵۰ درصد و رسم منحنی استاندارد در دستگاه اسپکتروفتومتر (در طول موج ۵۳۰ نانومتر) غلظت IAA در نمونه‌های سیانوباکتریایی به صورت کمّی و بر حسب میکروگرم IAA در میلی‌لیتر در کلروفیل *a* [$\mu g/(mL.\ Chl\ a)$] برآورد شد. میزان کلروفیل *a* نشان‌دهندهٔ میزان زیست‌تودهٔ سیانوباکتر در سوسپانسیون است (Sergeeva *et al*., 2002؛ Ahmed *et al*., 2010).

اندازه‌گیری رشد و کلروفیل *a*

میزان رشد با اندازه‌گیری دانسیتهٔ نوری (OD) محیط کشت مایع سویه‌های سیانوباکتریایی در طول موج ۷۵۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر (UV/VIS) به مدت سی روز سنجیده شد (Mishra *et al*., 2009؛ Soltani *et al*., 2006). برای سنجش میزان کلروفیل *a* سوسپانسیون یکنواخت سیانوباکتریایی تهیه و سلول‌ها با استفاده از متانول خالص برای بیست و چهار ساعت در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس استخراج شدند. سپس، دانسیتهٔ نوری محلول شفاف رویی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Porra *et al*., 1989).

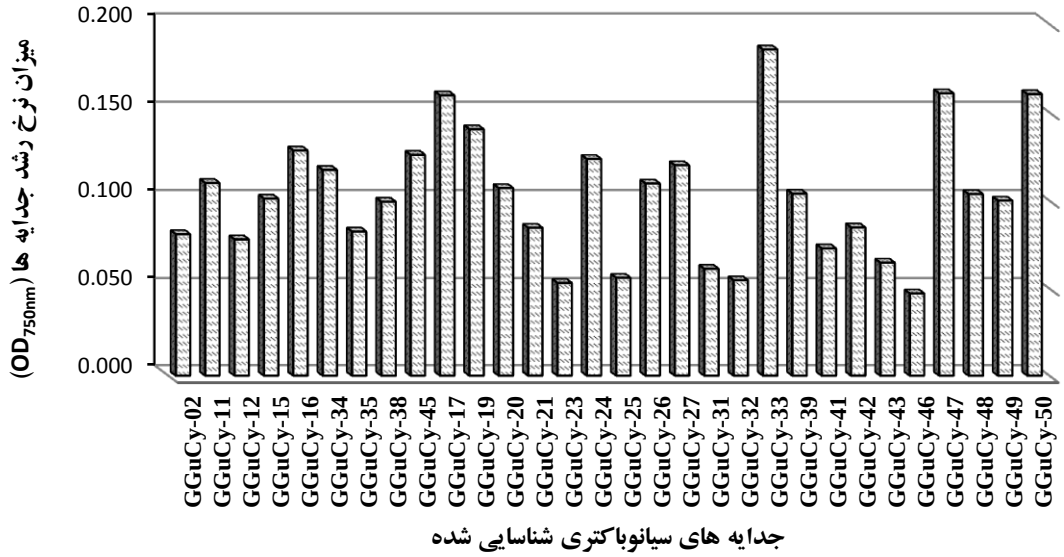
آزمون جوانه‌زنی بذر برنج با تلقیح برخی جدایه‌های سیانوباکتر

ابتدا بذرهای برنج بوجاری شدند. برای حذف بذرهای پوک و بذر علف‌های هرز بذرها در آب نمک (۱۰٪) ریخته شدند و سپس طی چندین مرحله شست‌وشو با آب معمولی اثر نمک از بین رفت. جهت ضد عفونی سطحی، بذرها در الکل ۷۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت دَه دقیقه قرار گرفتند. بذرها ده بار با آب مقطر سترون‌شده شسته شدند و برای تحریک آن‌ها به جوانه زدن به مدت بیست و چهار ساعت در آب سترون نگهداری و سپس به مدت دو ساعت در سوسپانسیون سیانوباکتر قرار داده شدند. سپس سی عدد بذر برنج لای کاغذ صافی قرار گرفتند و داخل پلیت ۹ سانتی‌متری با سه تکرار جاگذاری شدند. ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سیانوباکتریایی هم به پتری‌های تیمارشده اضافه شد. آزمایش به صورت طرح پایهٔ کاملاً تصادفی با شانزده سویه سیانوباکتر و دو تیمار شاهد (محیط کشت و آب مقطر) با سه تکرار اجرا شد. پلیت‌ها به مدت پانزده روز در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. بذرها به صورت روزانه در یک ساعت معین تا روز چهاردهم شمارش شدند. هنگام شمارش، بذرهایی جوانه‌زده محسوب می‌شدند که طول ریشه‌چهٔ آن‌ها ۲ میلی‌متر یا بیشتر بود. در روز چهاردهم تعداد گیاهچه‌های طبیعی درصد جوانه‌زنی نهایی در نظر گرفته شدند. سرعت جوانه‌زنی بذرها نیز به روش Maguire (1962) محاسبه شد. همچنین، انرژی جوانه‌زنی از تقسیم تعداد بذرهای جوانه‌زده در روز پنجم به تعداد کل بذرهای آزمون‌شده محاسبه شد. در پایان، وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه (دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت چهل و هشت ساعت) اندازه‌گیری شد (Agarwal, 2003). محاسبات آماری به کمک نرم‌افزار SAS و مقایسهٔ میانگین داده‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام پذیرفت.

یافته‌ها و بحث

اندازه‌گیری میزان رشد جدایه‌های سیانوباکتر در شکل ۱ می‌آید. جدایهٔ GGuCy-33 (*Anabaena sp*) دارای بیشترین میزان رشد و جدایه‌های GGuCy-46 (*Nostoc sp.*)، GGuCy-23 (*Anabaena sp.*)، و GGuCy-32 (*Stigonema sp.*) دارای کمترین مقدار رشد بود.

1. Potical Density
2. Salkowski



شکل ۱. میزان رشد سیانوباکترهای جداسازی‌شده از مزارع شالیزاری گیلان

آزمون کمّی و کیفی توان تولید هورمون IAA نشان می‌دهد سیانوباکترهای شناسایی‌شده توانایی تولید هورمون اکسین (IAA) را دارند. به‌علاوه، این توانایی بین گونه‌های مختلف سیانوباکتریایی متفاوت است (جدول ۱). آزمون کیفی توان تولید IAA توسط سیانوباکترها در هفتهٔ اول و دوم و سوم تغییر رنگ صورتی را درون چاهک نشان نداد. ولی در هفتهٔ چهارم برای برخی جدایه‌ها نظیر GGuCy-15، GGuCy-34، و GGuCy-42 ایجاد رنگ صورتی را درون چاهک به صورت کم‌رنگ نشان داد. در جدایهٔ GGuCy-15 شدت رنگ بیشتر از بقیهٔ جدایه‌ها بود. این موضوع توان تولید بیشتر IAA را توسط این جدایه نشان می‌دهد.

آزمون کمّی توان تولید IAA به وسیلهٔ سیانوباکترها در مقادیر مختلف اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان و پانزده و سی روز بعد از تلقیح محیط کشت برای جدایه‌های مختلف سیانوباکتر شناسایی‌شده در جدول ۱ می‌آید. در این آزمون از نظر توان تولید IAA جدایه‌های مختلف سیانوباکتر به چهار گروه با توان‌های مختلف (گروه ۱ توان تولید بالا (۲۰ $\geq$ میکروگرم بر میلی‌لیتر IAA در مقدار کلرفیل *a*)، گروه ۲ با توان تولید متوسط (۱۰ تا ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر IAA بر کلروفیل *a*)، گروه ۳ با توان تولید پایین (۱۰ > میکروگرم بر میلی‌لیتر IAA در مقدار کلرفیل *a*)، گروه ۴ با عدم توانایی تولید IAA) تقسیم‌بندی شدند (Torres-Rubio *et al.*, 2000). در تیمار بدون افزودن تریپتوفان در روز پانزدهم فقط ۴۰ درصد جدایه‌ها در گروه ۳ (توان تولید پایین) قرار گرفتند و بقیهٔ جدایه‌ها در گروه ۴ (عدم توان تولید) جای گرفتند. در روز سی‌ام ۷ درصد جدایه‌ها در گروه ۲ (توان تولید متوسط)، ۶۷ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین)، و ۲۶ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) قرار گرفتند. در تیمار غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان در روز پانزدهم ۳ درصد جدایه‌ها در گروه ۱ (توان تولید بالا)، ۱۷ درصد در گروه ۲ (توان تولید متوسط)، ۵۰ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین)، و ۳۰ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) قرار گرفتند و در روز سی‌ام ۶۴ درصد جدایه‌ها در گروه ۳ (توان تولید پایین) و ۳۶ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) جای گرفتند. در تیمار غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان در روز پانزدهم ۷ درصد جدایه‌ها در گروه ۱ (توان تولید بالا) و ۷۰ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین) و ۲۳ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) جای گرفتند و در روز سی‌ام ۷ درصد جدایه‌ها در گروه ۲ (توان تولید متوسط) و ۶۰ درصد در گروه ۳ (توان تولید پایین) و ۳۳ درصد در گروه ۴ (عدم توان تولید) قرار گرفتند.

برخی جدایه‌ها نظیر GGuCy-15 و GGuCy-16 به افزایش غلظت ال‌ـ تریپتوفان در محیط کشت واکنش نشان دادند و IAA بیشتری نسبت به تیمارهای قبلی تولید کردند. جدایهٔ GGuCy-34 در تیمار ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به تیمار بدون افزودن ال‌ـ تریپتوفان IAA بیشتری تولید کرد و در غلظت بیشتر واکنش نشان نداد (جدول ۱). برخی جدایه‌ها نظیر GGuCy-21، GGuCy-24، GGuCy-25، GGuCy-41، و GGuCy-50 به وجود یا نبودِ اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان در محیط کشت واکنش نشان ندادند و در گروه ۳ (توان تولید پایین) قرار گرفتند.

نتایج تجزیهٔ واریانس صفات جوانه‌زنی بذر برنج تلقیح‌شده با برخی از سویه‌های سیانوباکتر جداسازی‌شده در جدول ۲ می‌آید. صفات انرژی جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه اختلاف معنادار در سطح احتمال ۱ درصد نشان دادند؛ یعنی حداقل بین دو سویه از سویه‌های سیانوباکتر تلقیح‌شده اختلاف معنادار وجود دارد.

جدول ۱. غربالگری تولید IAA در سیانوباکترهای جداسازی‌شده از شالیزارهای استان گیلان

نام جدایه‌ها	جنس سیانوباکتر بر اساس خصوصیات مورفولوژیک	نوع مورفولوژیک[1]	توان تولید IAA (µg/(ml. Chl. *a*))					
			0 (µg/ml) Trp		100 (µg/ml) Trp		500 (µg/ml) Trp	
			۱۵ روز	۳۰ روز	۱۵ روز	۳۰ روز	۱۵ روز	۳۰ روز
GGuCy-02	*Microcystis sp.*	U	+	+	−	+	+	+
GGuCy-11	*Phormidum sp.*	NH	−	+	+	+	+	+
GGuCy-12	*Phormidum sp.*	NH	−	+	++	+	+	+
GGuCy-15	*Synechocystis sp.*	U	+	+	++	−	+++	++
GGuCy-16	*Oscillatoria sp.*	NH	−	+	+	+	+++	++
GGuCy-34	*Chrococcous sp.*	U	−	++	+++	+	+	+
GGuCy-35	*Chrococcous sp.*	U	−	−	−	−	+	+
GGuCy-38	*Oscillatoria sp.*	NH	−	−	+	−	−	+
GGuCy-45	*Phormidum sp.*	NH	−	+	−	+	+	+
GGuCy-17	*Anabaena sp.*	FH	+	+	++	−	+	+
GGuCy-19	*Nostoc sp.*	FH	−	+	−	−	−	−
GGuCy-20	*Nostoc sp.*	FH	−	−	+	−	−	−
GGuCy-21	*Anabaena sp.*	FH	+	+	+	+	+	+
GGuCy-23	*Anabaena sp.*	FH	+	+	−	+	−	−
GGuCy-24	*Anabaena sp.*	FH	−	+	+	+	+	+
GGuCy-25	*Cylendrospermum sp.*	FH	+	+	+	+	+	−
GGuCy-26	*Calothrix sp.*	FH	−	−	+	+	+	−
GGuCy-27	*Calothrix sp.*	FH	−	−	+	+	+	−
GGuCy-31	*Anabaena sp.*	FH	−	−	+	−	−	−
GGuCy-32	*Stigonema sp.*	FH	−	+	+	−	+	+
GGuCy-33	*Anabaena sp.*	FH	−	+	+	+	+	−
GGuCy-39	*Westillopsis sp.*	FH	+	+	−	+	−	−
GGuCy-41	*Anabaena sp.*	FH	+	+	+	−	+	+
GGuCy-42	*Anabaena sp.*	FH	+	++	++	−	+	+
GGuCy-43	*Rivularia sp.*	FH	−	−	−	+	+	+
GGuCy-46	*Nostoc sp.*	FH	−	+	−	+	+	+
GGuCy-47	*Nostoc sp.*	FH	+	−	++	+	−	+
GGuCy-48	*Anabaena sp.*	FH	−	+	−	+	+	+
GGuCy-49	*Anabaena sp.*	FH	+	+	+	−	+	−
GGuCy-50	*Anabaena sp.*	FH	+	+	+	+	+	+

+++: گروه ۱، توان بالا با تولید بیش از ۲۰ µg/ml.Chl *a*
++: گروه ۲، توان متوسط با تولید µg/ml.Chl *a* ۲۰-۱۰
+: گروه ۳، توان ضعیف با تولید کمتر از ۱۰ µg/ml.Chl *a*
گروه ۴، بدون تولید IAA
U: سیانوباکتر تک‌سلولی (Unicellular)
NH: رشته‌ای بدون هتروسیست (filamentous non-heterocystous)
FH: رشته‌ای هتروسیست‌دار (filamentous heterocystous)

1. Morphotype

جدول ۲. نتایج تجزیهٔ واریانس برای ویژگی‌های رویشی گیاهچهٔ برنج تلقیح‌شده با سویه‌های سیانوباکتر

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	انرژی جوانه‌زنی (GE)	درصد جوانه (GP)	سرعت جوانه (GR)	وزن خشک ریشه‌چه	وزن خشک ساقه‌چه
تیمار	۱۷	۰/۰۲۸**	۱۵/۱۰$^{n.s.}$	۱/۴۳**	۰/۰۵۴**	۰/۰۵۱**
اشتباه	۳۶	۰/۰۰۷	۱۷/۵۵	۰/۱۸۲	۰/۰۰۴	۰/۰۰۶
ضریب تغییرات (CV)		۱۳/۱	۴/۴۲	۹/۱۲	۹/۲۴	۸/۶۷

* و ** به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد n.s. غیر معنادار

جدول ۳ مقایسهٔ میانگین انرژی و درصد و سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چهٔ برنج تلقیح‌شده با سویه‌های مختلف سیانوباکتر به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن (در سطح ۵٪) را نشان می‌دهد. بر این اساس، تیمارهای تلقیح با سیانوباکتر نسبت به تیمار شاهد (تیمار محیط کشت یا آب مقطر) افزایش معناداری در انرژی و سرعت جوانه‌زنی و وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چهٔ گیاه نشان دادند. انرژی و سرعت جوانه‌زنی بذرها تحت تأثیر سویه‌های GGuCy-25، GGuCy-42، GGuCy-41، GGuCy-26، و GGuCy-50 بیشترین افزایش را داشت. وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه در بذر تلقیح‌شده با سویه‌های GGuCy-42، GGuCy-50، و GGuCy-25 بیشتر افزایش یافت.

ارزیابی کیفی توان تولید IAA و به عبارت دیگر ارزیابی پلیت برای آشکارسازی IAA (Shrivastava and Kumar, 2011) پاسخ مثبت قابل توجهی نشان نداد. به نظر می‌رسد دلیل چنین پاسخی طبیعت نامناسب کلنی‌های سیانوباکتر در سطح محیط کشت جامد، شرایط نامناسب رشد درون چاهک‌ها، و شاید مقدار کم مایهٔ تلقیح سیانوباکتریایی درون چاهک باشد. البته تا کنون دربارهٔ آزمون کیفی توان تولید IAA برای سیانوباکترها گزارشی مشاهده نشده، در حالی که برای باکتری‌ها گزارش شده است (Bric *et al.*, 1991; Shrivastava and Kumar, 2011).

آزمون کمّی توان تولید IAA برای تیمار بدون اسید آمینهٔ ال‌ـ تریپتوفان جدایهٔ GGuCy-34 و GGuCy-42 به ترتیب ۱۴/۹۸ و ۱۰/۸۳ میکروگرم IAA بر میلی‌لیتر بر کلروفیل *a* در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال‌ـ تریپتوفان جدایه‌های GGuCy-34، GGuCy-15، و GGuCy-42 به ترتیب ۲۳/۷، ۱۷/۴۶، و ۱۵/۸۱ میکروگرم IAA بر میلی‌لیتر بر کلروفیل *a* و در تیمار ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال‌ـ تریپتوفان جدایه‌های GGuCy-15 و GGuCy-16 به ترتیب ۲۹/۱۶ و ۲۱/۶۱ میکروگرم IAA بر میلی‌لیتر بر کلروفیل *a* بیشترین مقادیر اکسین (IAA) را نشان داده است. گزارش‌های متعدد تولید فیتوهورمون IAA را توسط سویه‌های سیانوباکتریایی آزادزی و هم‌زیست نشان داده‌اند (Sergeeva *et al.*, 2002; Prasanna *et al.*, 2009). با توجه به اینکه ال‌ـ تریپتوفان پیش‌نیاز تولید اکسین در گیاهان و میکروارگانیسم‌هاست، سیانوباکترها واکنش متفاوتی به این مادهٔ پیش‌ساز نشان دادند. Mazhar and Hasnain (2011) در غلظت‌های مختلف ال‌ـ تریپتوفان محتوای IAA را برای دو سویه سیانوباکتر به دست آوردند و نشان دادند تا غلظت حدود ۵۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر مقدار تولید IAA افزایش می‌یابد و بعد از آن تا غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر مقدار تولید کم می‌شود. بنابراین، افزودن مقدار مناسب ال‌ـ تریپتوفان به محیط تا حدی می‌تواند باعث تولید اکسین شود و افزودن بیش از آن مقدار تأثیری در تولید اکسین ندارد و سرعت تشکیل اکسین را پایین می‌آورد و می‌تواند موجب تحریک و تولید اتیلن تنشی شود (Asghar *et al.*, 2004; Szkop and Bielawski, 2013). پس، تولید اکسین به خصوصیات ژنوتیپی میکروارگانیسم، رشد، فعالیت متابولیکی، بیان ژنی که مسئول کد کردن آنزیم درگیر در بیوسنتز IAA است، و محیط کشت سیانوباکتر بستگی دارد (Tien *et al.*, 1979).

نتایج آزمون تولید IAA نشان می‌دهد تیمارهای با توان تولید متوسط (GGuCy-42 و GGuCy-34) باعث افزایش انرژی جوانه‌زنی (به ترتیب تا ۴۱٪ و ۲۹٪)، سرعت جوانه‌زنی (به ترتیب تا ۴۳٪ و ۲۵٪)، وزن خشک ریشه‌چه (به ترتیب تا ۴۶٪ و ۳۵٪)، و وزن خشک ساقه‌چه (به ترتیب تا ۳۲٪ و ۱۹٪) شدند. از طرفی تیماری با توان تولید ضعیف GGuCy-25 باعث افزایش انرژی جوانه‌زنی (تا ۴۵٪)، سرعت جوانه‌زنی (تا ۴۴٪)، وزن خشک ریشه‌چه (تا ۴۰٪)، و وزن خشک ساقه‌چه (تا ۲۴٪) شد. Asghar *et al.* (2004)، Saadatnia and Riahi (2009)، Begum *et al.* (2011)، Mazhar and Hasnain (2011)، و Prasanna *et al.* (2013) نتایجی مشابه گزارش کردند. به طور کلی مهم‌ترین مکانیسمی که بهتر می‌تواند اثر تحریک‌کنندگی رشد گیاه توسط PGPR را توضیح دهد همان تولید فیتوهورمون ایندولی IAA است که نتیجهٔ آن بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد بهتر ریشه و به دنبال آن افزایش جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه و افزایش رشد است (Arshad and Frankenberger, 1998).

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین ویژگی‌های رویشی گیاهچهٔ برنج تلقیح‌شده با سویه‌های سیانوباکتر با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن (۵٪)

تیمارهای سیانوباکتر	انرژی جوانه‌زنی (GE)	درصد جوانه (GP)	سرعت جوانه (GR) (بذر در روز)	وزن خشک ریشه‌چه (میلی‌گرم)	وزن خشک ساقه‌چه (میلی‌گرم)
GGuCy-42	۰٫۶۲۷ ab	۹۷٫۳ a	۴٫۸۸ a	۰٫۸۷۳ a	۱٫۱۹ a
GGuCy-25	۰٫۶۶۷ a	۹۶٫۰ a	۵٫۰۴ a	۰٫۷۷۳ ab	۱٫۰۶ ab
GGuCy-41	۰٫۶۲۶ab	۹۶٫۰ a	۴٫۸۳ a	۰٫۷۵۰ abc	۱٫۰۱ bc
GGuCy-26	۰٫۶۱۳ab	۹۶٫۰ a	۴٫۷۸ a	۰٫۷۲۳ bcde	۱٫۰۰ bcd
GGuCy-50	۰٫۶۱۲ab	۹۶٫۰ a	۴٫۷۶ a	۰٫۷۹۳ a	۱٫۰۷ ab
GGuCy-17	۰٫۵۷۳abc	۹۴٫۶ a	۴٫۵۵ ab	۰٫۶۴۳ de	۰٫۹۶ bcde
GGuCy-23	۰٫۵۶۰ abc	۹۶٫۰ a	۴٫۵۱ ab	۰٫۶۲۰ e	۰٫۹۱ bcde
GGuCy-47	۰٫۵۳۳ abc	۹۴٫۶ a	۴٫۳۵ abc	۰٫۷۳۶ bcd	۱٫۰۵ abc
GGuCy-34	۰٫۵۱۶ abcd	۹۰٫۹ a	۳٫۶۹ cd	۰٫۷۱۳ cde	۱٫۰۰ bcd
GGuCy-12	۰٫۵۲۰ abcd	۹۲٫۰ a	۴٫۲۴ abcd	۰٫۴۵۳ f	۰٫۷۳ g
GGuCy-21	۰٫۵۰۶ abcd	۹۴٫۶ a	۴٫۲۲ bcd	۰٫۶۴۶ de	۰٫۹۶ bcde
GGuCy-39	۰٫۵۰۶ abcd	۹۶٫۰ a	۴٫۲۵ abcd	۰٫۶۳۶ de	۰٫۹۰ cde
GGuCy-2	۰٫۵۰۳ bcd	۹۶٫۰ a	۴٫۲۴ abcd	۰٫۴۵۰ f	۰٫۷۴ g
GGuCy-32	۰٫۴۵۳ bcde	۹۳٫۳ a	۳٫۹۳ bcd	۰٫۶۳۳ de	۰٫۸۷ dgef
GGuCy-16	۰٫۴۲۶ cde	۹۴٫۶ a	۳٫۸۲ bcd	۰٫۴۷۰ f	۰٫۷۶ gf
GGuCy-15	۰٫۳۸۶ de	۹۳٫۳ a	۳٫۵۹ d	۰٫۶۶۶ de	۰٫۸۶ egf
شاهد (محیط کشت)	۰٫۳۶۶ de	۹۰٫۰ a	۲٫۷۶ e	۰٫۴۶۰ f	۰٫۸۱ gf
شاهد (آب مقطر)	۰٫۳۱۶ e	۹۰٫۰ a	۲٫۵۵ e	۰٫۴۲۶ f	۰٫۷۲ g

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک‌اند بر اساس آزمون اختلاف معنادار قابل اعتماد در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنادار ندارند.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد وقتی در غلظت ۰ تریپتوفان اکسین تولید می‌شود یعنی مسیرهای مستقل از تریپتوفان در آن‌ها وجود دارد یا تغییر مسیر بیوسنتز اکسین می‌تواند علت آن باشد (VaralakshmI and Malliga, 2012). در میان سویه‌های جداسازی‌شده دو سویهٔ *Anabaena* sp. GGuCy-42 و *Chrococcous* sp. GGuCy-34 مقدار بیشتری ایندول ۳-استیک اسید تولید کردند. در پایان، نتایج این پژوهش نشان داد دو سویهٔ *Anabaena* sp. GGuCy-42 و *Cylendrospermum* sp. GGuCy-25 رشد گیاه را بهتر تحریک می‌کند و می‌توان آن‌ها را به مثابهٔ کود زیستی و بهبوددهندهٔ رشد استفاده کرد. به نظر می‌رسد تولید اکسین یگانه دلیل این وضعیت نیست و عوامل دیگر تحریک‌کنندهٔ رشد مانند تثبیت نیتروژن، حل‌کنندگی فسفات، و ... تأثیرگذارند.

REFERENCES

Agarwal, R. L. (2003). *Seed technology*. Publication Company Limited New Delhi, India. 550pp.

Ahmed, M., Stal, L. J., and Hasnain, S. (2010). Association of non-heterocystous cyanobacteria with crop plants. *Plant and Soil*. 336:363–375.

Arshad, M. and Frankenberger, W. T. (1998). Plant growth substances in the rhizosphere: microbial production and functions. *Advanced Agronomy*, 62: 46-151.

Asghar, H. N., Zahir, Z. A., and Arshad, M. (2004). Screeninig rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (Brassica napus L.). *Australian Journal of Agricultural research*. 55: 187-194.

Begum, Z. N. H., Mandal, R., and Islam, S. (2011). Effect of cyanobacterial biofertilizer on the growth and yield components of two HYV of rice. *Journal of Algal Biomass and Utln*., 2(1): 1-9.

Bric, J. M., Bostok, R. M., and Silverston, S. A. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrance. *Applied Environmental Microbiology*, 57(2): 535-538.

Desikhachary, T. V. (1959). *Cyanophyta*. Indian Council of Agricultural Research Publishers pp. 565.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free – living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* .41: 109 –117.

Johansson, C. and Bergman, B. (1994). Reconstitution of the symbiosis of Gunnera manicata Linden:

cyanobacterial specificity. *New Phytology*. 126:643–652.

John, D. M., Whitton, B. A., and Brook, A. J. (2003). The freshwater algal flora of the British Isles, an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press.

Karthikeyan, N., Prasanna, L. R., and Kaushik, B. D. (2007). Evaluating the potential of plant growth promoting cyanobacteria as inoculants for wheat. *European Journal of Soil and Biology*. 43: 23-30.

Kaushik, B. D. (1987). *Laboratory Methods for Blue-green Algae*. Associated Publishing Company. Pp. 171.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., and Clark, D. P. (2012). *Brock Biology of Microorganisms* (13th ed).pp. 532-536. Publishing as Benjamin Cummings, San Francisco. Manufactured in the U.S.A.

Maguire, J. D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science*. 2: 176-177.

Mazhar, S. and Hasnain, S. (2011). Screening of native plant growth promoting cyanobacteria and their impact on Triticum aestivum var. Uqab 2000 growth. *African Journal of Agricultural Research*, 6(17):3988-3993.

Mishra, Y., Bhargava, P., Chaurasia, N., and Rai, L. C. (2009). Proteomic evaluation of the non-survival of Anabaena doliolum (Cyanophyta) at elevated temperatures. *European Journal of Phycology*, 44(4): 551–565.

Porra, R. J., Thompson, W. A., and Kriedemann, P. E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents; verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimical and Biophysical Acta*. 975:384–394.

Prasanna, R., Jaiswal, P., Nayak, S., Sood, A., and Kaushik, B. D. (2009). Cyanobacterial diversity in the rhizosphere of rice and its ecological significance. *Indian Journal of Microbiology*, 49: 89-97.

Prasanna, R., Sharma, E., Sharma, P., Kumar, A., Kumar, R., Gupta, V., Pal, R. K., Shivay, Y. S., and Nain, L. (2013). Soil fertility and establishment potential of inoculated cyanobacteria in rice crop grown under non-flooded conditions. *Paddy Water and Environment*, 11:175–183.

Prescott, G. W. (1970). *Algae of The Western Great Lakes Area*. W.M.C. Brown Company Publishers. 977 pp.

Rodriguez, A. A., Stella, A. A., Storni, M. M., Zulpa, G., and Zaccaro, M. C. (2006). Effects of cyanobacterial extracellular products and gibberellic acid on salinity tolerance in *Oryza sativa* L. *Saline System*, 2: 7.

Saadatnia, H. and Riahi, H. (2009). Cyanobacteria from paddy fields in Iran as a biofertilizer in rice plants. *Plant and Soil Environment*, 55 (5): 207–212.

Sergeeva, E., Liaimer, A., and Bergman, B. (2002). Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. *Planta*. 215: 229–238.

Shrivastava, U. P. and Kumar, A. (2011). A simple and rapid plate assay for the screening of indole-3-acetic acid (IAA) producing microorganisms. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(1): 120-124.

Soltani, N., Khavari-Nejad, R., Tabatabaie, M., Shokravi, S. H., and Valiente, E. F. (2006). Variation of Nitrogenase Activity, photosynthesis and pigmentation of cyanobacterium Fischerella ambigua strain FS18 under different irradiance and pH. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22 (6): 571-576.

Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandal, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue green algae (Order: Chroococcales), *Bacteriological Reviwe*. 35: 171-305.

Szkop, M. and Bielawski, W. (2013). A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*. 103:683–691.

Thajuddin, N. and Subramanian, G. (2005). Cyanobacterial biodiversity and potential applications in biotechnology. *Current Science*. 89: 47–57.

Tien, T. M., Gaskins, M. H., and Hubbell, O. H. (1979). Plant growth substances produced by Azospirillum brasilense and their effect on the growth of pearl millet. *Applied Environmental Microbiology*. 37: 1016-1024.

Torres-Rubio, M. G., Astrid, S., Castillo, J., and Martiners, P. (2000). Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. And Pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and Siderophores, from colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*. 42: 171-176.

Varalakshmi, P. and Malliga, P. (2012). Evidence for production of Indole-3-acetic acid from a fresh water cyanobacteria (Oscillatoria annae) on the growth of H. annus. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(3):1-15.