

تأثیر کاربرد ترکیب اسید آمینه تریپتوفان با باکتری *Bacillus simplex* بر رشد رویشی گندم نان در شرایط گلخانه‌ای

اسماعیل کریمی^{۱*}، زهرا محمدی^۲، عزت اله اسفندیاری^۳، جعفر جعفرزاده^۴

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۲۵)

چکیده

تریپتوفان به عنوان پیش ماده ساخت اکسین توسط باکتری‌های ریزوسفری بوده و اغلب از طریق هیدرولیز پروتئین‌های مواد آلی در خاک تأمین می‌گردد. از اینرو به دلیل فقر ماده آلی در خاک‌های کشور به ویژه در شرایط دیم می‌تواند به عنوان یک عامل محدود کننده در این زمینه مطرح گردد. به این منظور آزمایشی گلخانه‌ای در شرایط هیدروپونیک با افزودن تریپتوفان و مایه زنی بذور گندم با باکتری *B. simplex* 16 جهت بررسی اثر آنها انجام شد. نتایج نشان دادند که ۴۱/۱ و ۲۰/۹ میلی‌گرم بر لیتر اکسین میکروبی در غلظت ۵ میلی‌مولار تریپتوفان به ترتیب در محیط کشتهای LB و تهیه شده از ترشحات ریشه توسط باکتری تولید می‌گردد. مایه‌زنی باکتریایی بذور گندم، افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تریپتوفان و افزودن تریپتوفان در این غلظت به همراه مایه زنی باکتریایی به ترتیب باعث افزایش ۹ درصدی، کاهش ۱۶ درصدی و کاهش ۲۰ درصدی عملکرد ماده خشک اندام هوایی گندم در مقایسه با تیمار شاهد گردید. در ارتباط با ویژگی‌های ریشه، در اثر کاربرد تریپتوفان هم در شرایط مایه‌زنی باکتریایی و هم در شرایط بدون مایه زنی، چگالی ریشه ۶۰ درصد کاهش ولی حجم تازه آن ۷۰ درصد افزایش یافت. مطالعات میکروسکوپی و تصاویر کل ریشه نشان دادند که هم باکتری و هم تیمارهای تریپتوفان باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی بویژه در پریشتی تارهای کشنده در ریشه گردیدند. بر طبق نتایج این مطالعه کاربرد تریپتوفان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، علی‌رغم بهبود خصوصیات ریشه، به دلیل احتمالی ایجاد تنش اکسین و اختلالات رشدی گندم توصیه نمی‌گردد و لازم است که تحقیقات مشابه در غلظت‌های پایین‌تر انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: کشت هیدروپونیک، ترشحات ریشه، اکسین میکروبی، حجم ریشه

کریمی ا.، محمدی ز.، اسفندیاری ع.، جعفرزاده ج. ۱۴۰۱. تأثیر کاربرد ترکیب اسید آمینه تریپتوفان با باکتری *Bacillus simplex* بر رشد رویشی گندم نان در شرایط گلخانه‌ای. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۱۰، شماره ۲. صفحه: ۹۱-۱۰۲.

۱- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

۳- استاد گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه

۴- استادیار بخش غلات، موسسه تحقیقات کشاورزی دیم، مراغه

* پست الکترونیک: sm_ka80@yahoo.com

مقدمه

حالت، با آزاد شدن آمونیاک از ساختار شیمیایی تریپتوفان به وسیله آنزیم تریپتوفان آمینوترانسفراز باعث تبدیل آن به ایندول پیروویک اسید و سپس ایندول استالدوکسیم شده و در نهایت منجر به تشکیل ایندول استیک اسید خواهد شد (Mustafa *et al.*, 2018). در واقع حضور تریپتوفان از ضروریات واکنش مطرح شده جهت تولید اکسین بوده و در این راستا مصطفی و همکاران (Mustafa *et al.*, 2018) گزارش نموده‌اند که بین میزان تریپتوفان موجود و اکسین تولید شده ارتباط مستقیم وجود دارد. دسوزا و همکاران (De_Souza *et al.*, 2015) نشان دادند که افزودن تریپتوفان به خاک می‌تواند منجر به افزایش تولید اکسین توسط PGPRها شود. هیدرولیز پروتئین‌های موجود در ماده آلی خاک عمده‌ترین و در برخی مواقع به صورت جزئی ترشحات ریشه گیاه میزبان از منابع تامین تریپتوفان در خاک می‌باشند، مصطفی و همکاران (Mustafa *et al.*, 2018) معتقدند که محدودیت در تامین تریپتوفان در اثر کمبود ماده آلی خاک یا ترشح محدود از ریشه گیاه، عامل اصلی کاهش تولید اکسین توسط ریزوباکتری‌ها بوده و کاربرد خارجی تریپتوفان را در رفع موانع یاد شده مؤثر می‌دانند. مصطفی و همکاران (Mustafa *et al.*, 2018) نیز، نقش کاربرد تریپتوفان را در افزایش عملکرد محصولات مختلف کشاورزی در طی یک مقاله مروری بررسی و بر لزوم به کارگیری آن تاکید کرده‌اند. در راستای کاربردی نمودن استفاده از تریپتوفان، شیوه کاربرد آن با روش‌های مختلف نظیر پیش تیمار بذور (Saleem *et al.*, 2013)، محلول پاشی برگ (Saleem *et al.*, 2009) و یا کاربرد خاکی (Moe L.A., 2013) مورد آزمون قرار گرفته‌اند. عباس و همکاران (Abbas *et al.*, 2013) و محیط (Mohite B., 2013) با کاربرد خاکی تریپتوفان، آن را در تولید اکسین به ترتیب در نخود و گندم مؤثر دانسته و اثرات مثبت آن را در این گیاهان مشاهده کرده‌اند. درحالی که کاتونوچی و همکاران (Katonoguchi *et al.*, 1994) گزارش کردند که کاربرد تریپتوفان در شرایط آزمایشگاهی مانع گسترش طولی ریشه در گیاهان تاج خروس^۱، تره شاهی^۲، کاهو^۳، چمن^۴،

باکتری‌های محرک رشد فراگرد ریشه یا به اختصار^۱ PGPRها به سبب تولید انواع متابولیت‌های میکروبی با تأثیر بر قابلیت دسترسی زیستی عناصر مورد نیاز گیاه و یا ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی در گیاه نقش بسیار مهمی را در تحریک رشد گیاهان ایفا می‌نمایند. القای مقاومت سیستمیک و تأثیر متابولیت‌های میکروبی در فرآیندهای فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی گیاهان باعث شده تا برخی از محققان از مجموعه ژنتیک باکتری‌های ریزوسفری به عنوان ژنوم دوم گیاه میزبان یاد نمایند (Nazir *et al.*, 2018). تولید اکسین به عنوان یکی از مهمترین متابولیت‌های محرک رشد توسط اینگونه باکتری‌ها بوده و بالغ بر ۸۰ درصد باکتری‌های ریزوسفری قادر به تولید آن هستند (Ahemad & Kibret, 2014) یافته‌های علمی نشان می‌دهند که این متابولیت میکروبی قادر است با تغییر معماری ریشه و ویژگی‌های بافتی آن به نفع تامین نیازهای گیاه و هم چنین با تنظیم سطوح داخلی اکسین در گیاه بر فرآیندهای متابولیسمی و فیزیولوژی رشد و نمو گیاهان اثر مثبت اعمال نماید (Ambreen & Shahida, 2014). هر چند سایر متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌های لیتیک ترشح شده از سوی این باکتر نیز موجب توسعه و رشد ریشه می‌گردند، اما تولید اکسین موثرترین مکانیسم این گونه تغییرات می‌باشد که اغلب به صورت کاهش نرخ رشد ریشه‌های اولیه و افزایش تعداد و طول ریشه‌های فرعی و ریشه‌های مویین مشاهده می‌شوند، هر چند مطالعاتی نیز وجود دارند که افزایش رشد ریشه‌های اولیه را نیز گزارش کرده‌اند (Gupta *et al.*, 2015). میزان تولید اکسین در ریزوسفر به نوع باکتری، گیاه میزبان و وجود تریپتوفان به عنوان پیش‌ماده ساخت اکسین بستگی داشته و تغییرپذیری تولید آن در پاسخ به این عوامل می‌تواند به عنوان یک نکته مهم و کاربردی در زمینه بهره‌برداری از این متابولیت میکروبی بسیار مورد توجه قرار گیرد (Zhao, 2010). ایندول استیک اسید (IAA) فراوانترین نوع اکسین تولیدی در ریزوسفر بوده و طی مسیرهای مختلف بیوشیمیایی و در معمول‌ترین

^۱ *Lepidium sativum*^۲ *Lactuca sativa*^۳ *Lepidium sativum*^۱ Plant Growth Promoting Rhizobacteria^۲ Indole acetic acid^۳ *Amaranthus caudatus*

Bacillus zhangzhouensis 23 که از توان بالایی در تولید هورمون اکسین از نوع ایندول استیک اسید^۴ برخوردار بوده و از ریزوسفر گیاهان علفی غیر زراعی توسط کریمی و همکاران (Karimi et al., 2019) جداسازی و شناسایی شده بودند، استفاده شد.

ارزیابی توان تولید اکسین توسط باکتری‌ها در محیط کشت مصنوعی

بدین منظور، ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت^۵ TSB واکشت گردیده و پس از ۱۲ ساعت، ۲۰۰ میکرولیتر از آنها به صورت جداگانه به دو سری از محیط کشت^۶ LB (جدول ۱) یک سری حاوی ۵ میلی‌مولار تریپتوفان و سری دیگر بدون افزودن تریپتوفان منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و مدام تکان داده شدند. سپس، سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در ادامه، یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴ میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۵/۷ میلی‌لیتر کلرید آهن نیم‌مولار) مخلوط گردیدند. مخلوط حاصل به مدت یک ساعت در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و سپس، میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. از مقادیر صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید به عنوان استاندارد استفاده گردیده و مشابه با نمونه‌ها واکنش آن با محلول سالکوفسکی ارزیابی و اعداد حاصله جهت ترسیم نمودار استاندارد ثبت شدند.

برنج، گندم^۲ و زیتون^۳ گردیده است. حسن و بانو (Hassan & Bano, 2015) با جداسازی باکتری‌های *Pseudomonas moraviensis* و *Bacillus cereus* از ریزوسفر نوعی گیاه علفی با نام علمی *Cenchrus ciliaris* و مطالعه اثر این باکتری‌ها همراه با کاربرد تریپتوفان بر رشد گندم در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای، گزارش کردند که افزودن تریپتوفان توأم با تلقیح باکتریایی توانسته است وزن تر، فعالیت آنزیم‌های دخیل در مکانیسم‌های دفاعی، میزان پرولین، طول سنبله و تعداد دانه در سنبله را در مقایسه با اثرات خالص آنها، افزایش دهد. احمد و کبیرت (Ahmed and Kibert, 2014) سنتز اکسین باکتریایی در ریزوسفر را بر افزایش کارایی مصرف آب و جذب عناصر غذایی توسط گیاهان و افزایش شاخص‌های عملکردی آنها مؤثر تشخیص داده‌اند. با عنایت به اینکه ماده آلی خاک منبع اصلی تأمین تریپتوفان مورد نیاز برای بیوسنتز اکسین توسط ریزوباکتری‌ها بوده و میزان ماده آلی بخش قابل توجهی از خاک‌های کشور کمتر از نیم درصد می‌باشد، احتمال محدودیت در عرضه‌ی این اسید آمینه دور از انتظار نیست. لذا در این پژوهش تلاش می‌گردد تا اثر کاربرد خارجی تریپتوفان بر تولید اکسین توسط باکتری‌های یاد شده با هدف شناخت اولیه از الگوی رفتاری باکتری انتخاب شده و اثر گذاری آنها بر رشد و نمو گندم در شرایط کنترل شده بررسی شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از ۴ باکتری بنام‌های *Bacillus simplex* 16، *Bacillus velezensis* 45 و

جدول ۱- اجزای محیط کشت (LB)

Table 1. Component of LB medium

Yeast extract	5 g
Tryptone	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O	1000 mL

4 Indol acetic acid
5 Trypticase soy broth
6 Luria-Bertani

Dryza sativum
Triticum aestivum
Avena sativa

شدت ۸۰۰۰ لوکس و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر با دور کند در زیر هود میکروبی قرار گرفتند (شکل ۱). در طی این مدت با رشد گیاهچه‌ها ترشحات ریشه در محلول آزاد می‌شدند که پس از خارج ساختن کامل گیاهچه‌ها از درون این محلول به عنوان یک محیط کشت طبیعی جهت کشت باکتری‌ها در نظر گرفته شدند. جهت ارزیابی تولید اکسین در این محیط کشت دقیقاً مثل مرحله قبل در محیط کشت مصنوعی و در دو سری یکی با افزودن تریپتوفان (۵ میلی‌مولار) و سری دیگر بدون افزودن تریپتوفان عمل گردید. تیمار بدون تلقیح باکتریایی نیز به‌عنوان شاهد این بخش در نظر گرفته شد.



شکل ۱- کشت گیاهچه‌های گندم در ظروف دارای محیط تغییر یافته MS جهت استخراج ترشحات ریشه به منظور تهیه محیط کشت طبیعی برای رشد باکتری‌ها

Figure 1. Wheat seedling in modified MS medium for extracting root exudate in order to preparation natural bacterial medium

همکاران (Etesami *et al.*, 2009) انتخاب و در تیمارها مورد استفاده قرار گرفتند. مایه‌زنی باکتریایی بصورت بذرمال و تریپتوفان همراه با محلول هوگلند که شرح آن در زیر آمده است، انجام گردید. ابتدا جهت تولید مایه تلقیح از باکتری فوق به منظور مایه‌زنی بذور گندم، یک لوپ از اسلنت حاوی باکتری در ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSB مایه‌زنی گردیده و پس از رسیدن تراکم باکتری، به میزان 10^8 سلول در میلی‌لیتر (تخمین با روش مک فارلند)، سوسپانسیون باکتریایی در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل، به آرامی در ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم ۰/۱ درصد، مجدداً سوسپانسیون شده و برای بذر مال نمودن بذور استفاده گردید.

کشت و مطالعات گلخانه‌ای

در این مرحله به‌منظور بررسی اثر مایه‌زنی باکتری *Bacillus simplex* 16 و کاربرد تریپتوفان بر رشد و نمو گندم، آزمایش‌گلدانی در قالب بلوک‌های کامل تصادفی در چهار تکرار به اجرا درآمد. تیمارهای مورد مطالعه شامل چهار تیمار و عبارت بودند از: ۱- شاهد (بدون مایه‌زنی باکتری و بدون کاربرد تریپتوفان) ۲- مایه‌زنی باکتری بدون کاربرد تریپتوفان (B) ۳- کاربرد تریپتوفان بدون مایه‌زنی باکتریایی (+Trp) و ۴- مایه‌زنی باکتری به‌همراه کاربرد تریپتوفان (B + Trp). لازم به‌ذکر است که بر مبنای نتایج حاصل از ارزیابی تولید اکسین توسط باکتری‌ها، باکتری ۱۶ *Bacillus simplex* به عنوان مناسب‌ترین باکتری تولید کننده اکسین و تریپتوفان با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر براساس گزارش اعتصامی و

جهت یکنواختی مطالعه بطور یکسان در تمامی تیمارها از عمق ۵ سانتی‌متری نمونه‌هایی به اندازه نیم سانتی‌متر جداسازی و تصاویر میکروسکوپی با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی $\times 40$) تهیه شدند.

تجزیه آماری

داده‌های به دست آمده از این پژوهش پس از آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم افزار MSTATC تجزیه آماری گردیدند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گردید.

نتایج و بحث

نتایج تولید اکسین

ارزیابی انجام شده در رابطه با توانایی تولید اکسین توسط باکتری‌ها نشان داد که اکسین در محیط کشت LB زمانی تولید می‌شود که تریپتوفان به ترکیبات افزوده گردد. هیچ‌کدام از باکتری‌ها قادر نبودند در محیط کشت LB فاقد تریپتوفان اکسین تولید کنند (شکل ۲). نتیجه مشابهی نیز در محیط کشت تهیه شده از ترشحات ریشه به عنوان شبیه‌سازی شرایط واقعی به دست آمد و اکسین زمانی توسط باکتری‌ها تولید شد که تریپتوفان در اختیار آنها قرار گرفت (شکل ۲).

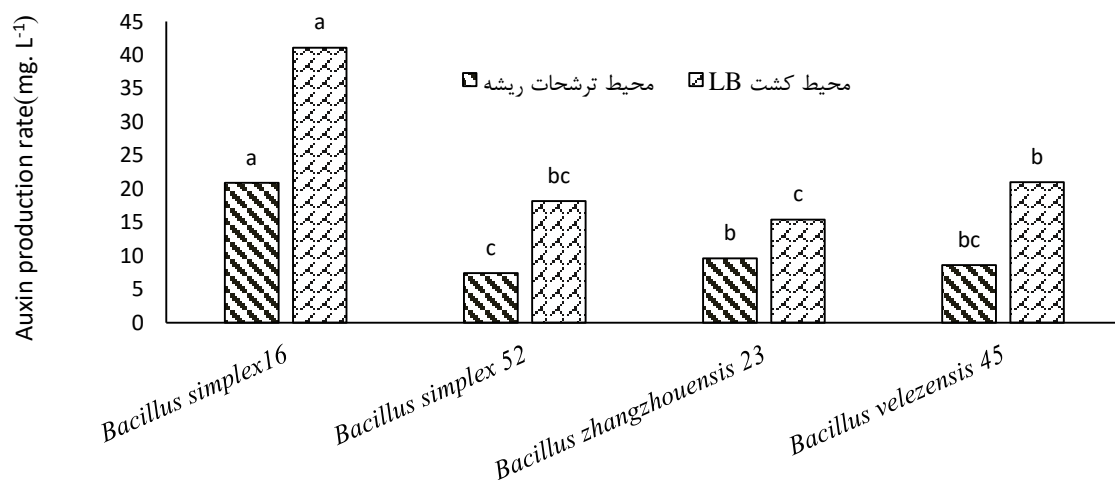
بذور گندم نیز پس از استریل شدن (مشابه با بخش تهیه محیط کشت ترشحات ریشه) و اعمال تیمارهای باکتریایی در گلدان‌های یک کیلویی محتوی پرلیت استریل کشت شدند. برای آبیاری گیاهچه‌های حاصل تا اتمام ذخایر بذر از محلول یک دوم هوگلند و با رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۳ برگگی از محلول هوگلند کامل استفاده شد. کاربرد تریپتوفان بعد از بلوغ برگ دوم و ظهور برگ سوم انجام گرفت. همچنین، آزمایش در شرایط کنترل شده اجرا شد.

بعد از ظهور سنبله، نمونه‌برداری از تیمارها انجام و ارتفاع بوته، وزن تازه و خشک برگ، ساقه، اندام زایشی و ریشه به همراه حجم ریشه تازه، وزن تر، وزن خشک اندازه‌گیری شده و چگالی ریشه از تقسیم وزن خشک ریشه بر حجم ریشه تازه و درصد رطوبت وزنی آن از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد رطوبت وزنی ریشه} = \frac{\text{وزن خشک ریشه} - \text{وزن تازه ریشه}}{\text{وزن خشک ریشه}} \times 100$$

عکس‌برداری از ریشه‌ها

ریشه‌ها پس از شستشو و حذف هرگونه مواد خارجی، یکبار به صورت کلی در یک زمینه مناسب پهن و تصویر کل ریشه‌ها ثبت گردیده و برای مطالعه میکروسکوپی در



شکل ۲- مقایسه توانایی تولید هورمون اکسین در محیط کشت‌های LB و ترشحات ریشه گندم در حضور تریپتوفان با غلظت ۵ میلی‌مولار توسط باکتری‌های مورد پژوهش. به دلیل اینکه میزان اکسین تولیدی در محیط‌های فاقد تریپتوفان صفر برآورد شدند، داده‌ها در نمودار لحاظ نشده است

Figure 2. Comparison of the ability of selected bacteria to produce auxin in LB medium or wheat root secretions in the presence of 5 mM tryptophan. Because the amount of auxin produced mediums without tryptophan was estimated to be zero, the data are not included in the graph

رشد متفاوت بود که بیانگر تأثیر نوع باکتری بر روند تولید آن محسوب می‌گردد (شکل ۲). به طور کلی نتایج این بخش علاوه بر اینکه بیانگر توانایی رشد باکتری در حضور ترشحات ریشه گندم می‌باشد، می‌تواند بطور غیر مستقیم بیانگر القای تولید اکسین در ریزوسفر با افزودن اسید آمینه تریپتوفان به بستر رشد گندم باشد. با استناد به یافته‌های این بخش و با توجه به اهمیت اکسین در رشد گیاه، آزمایش گلخانه‌ای جهت پاسخ به این سوال که آیا می‌توان از قابلیت باکتری‌های محرک رشد در تبدیل تریپتوفان به اکسین در بهبود رشد گندم بهره گرفت. آزمون گلخانه انجام گرفت.

نتایج آزمون گلخانه‌ای

نتایج ارزیابی رشد اندام هوایی گندم

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین تیمارها برای صفات وزن خشک صفات اندام هوایی، ساقه، سنبله و ارتفاع بوته در سطح احتمال ۱٪ و برای صفت وزن خشک برگ در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۲). معنی‌دار نشدن میانگین مربعات نسبت وزن خشک ساقه به وزن خشک کل تک بوته در جدول تجزیه واریانس، بیانگر این است که بین ۴ تیمار مورد ارزیابی برای این صفت اختلاف معنی‌دار وجود نداشته و کلاس-بندی این صفت بی‌معنی می‌باشد.

پژوهش‌ها نشان می‌دهند که ۱۰ تا ۴۰ درصد تولیدات فتوسنتزی گیاه، به صورت ترشحات ریشه، از ریشه گیاه دفع می‌گردد که این مواد به خوبی می‌توانند رشد باکتری-ها را حمایت کنند و به واسطه وجود این ترشحات، محیط ریزوسفر گیاهان در خاک یکی از غنی‌ترین محیط‌ها برای رشد ریزجانداران خاک به شمار می‌رود (Moe, 2013). نتایج این پژوهش نیز نشان داد که ترشحات ریشه گندم به خوبی می‌تواند موجبات رشد باکتری‌های مورد مطالعه را فراهم کند. اما از آنجایی که تریپتوفان پیش‌ماده ساخت اکسین می‌باشد (Ahmed and Kibret, 2014) و با توجه به اینکه در شرایط آزمایشگاهی بویژه در محیط کشت ترشحات ریشه، تولید اکسین زمانی مشاهده گردید که تریپتوفان در اختیار باکتری قرار گرفت، به همین دلیل احتمال اینکه تریپتوفان در ترشحات ریشه گندم وجود نداشته باشد، بالا می‌باشد، که همسو با نتیجه مطالعات کاوازاکی و همکاران (Kawasaki et al., 2016) مبنی بر عدم ترشح تریپتوفان از ریشه گیاه می‌باشد. نکته دیگری که بایستی مورد تأکید قرار داد تولید دو برابری اکسین در محیط کشت LB نسبت به محیط ترشحات ریشه بود (شکل ۲). محیط کشت LB نسبت به ترشحات ریشه محتوای غنی‌تری داشته و بنابراین رشد باکتری‌ها را به صورت مطلوب‌تری حمایت می‌کند. به علاوه اینکه در هر دو محیط دامنه تولید اکسین با وجود یکسان بودن شرایط

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر خصوصیات اندام هوایی گندم

Table 2. Analysis of variance of the effect of experimental treatments on wheat shoot characteristics

Source of variation	Degree of freedom	Mean square					
		Plant dry weight	Shoot dry weight	Leaf dry weight	Spike dry weight	Plant height	Shoot dry weight/Leaf dry weight
Block	3	0.001 ^{ns}	0.000 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.000 ^{ns}	1.05 ^{ns}	0.006 ^{ns}
Treatment	3	0.104 ^{**}	0.013 ^{**}	0.008 [*]	0.022 ^{**}	15.08 ^{**}	0.522 ^{ns}
Error	9	0.002	0.000	0.002	0.001	1.613	0.14

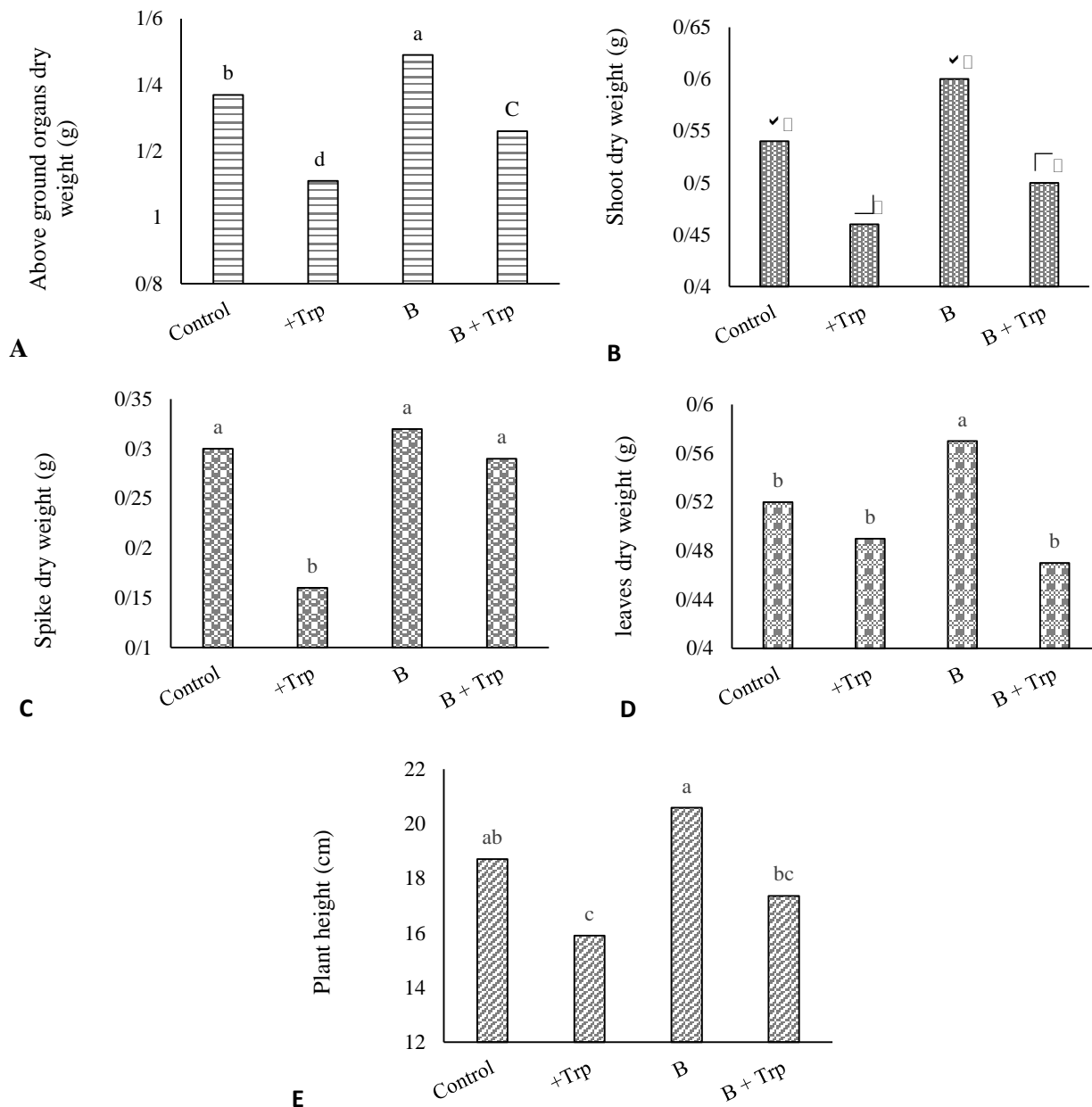
^{ns} غیر معنی‌دار، * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و ۵ درصد
ns: Not significant, * Significant at $P < 0.05$, ** Significant at $P < 0.01$

میلی گرم در لیتر چه در شرایط مایه‌زنی به همراه باکتری و چه در شرایط بدون مایه‌زنی، منجر به کاهش عملکرد وزن خشک کل اندام هوایی گندم گردید، میزان این کاهش عملکرد در حضور باکتری (۱۶ درصد) و در عدم حضور باکتری (۱۹ درصد) بود. همچنین تیمار تریپتوفان موجب کاهش ۲۰٪ وزن خشک بوته نسبت به شاهد نیز گردید (شکل ۲A) که البته این کاهش وزن خشک از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۲). تیمار

نتایج تأثیر تیمارهای مورد ارزیابی بر رشد اندام هوایی تک بوته و اجزای آن در شکل ۳ نشان داده شده است. نتیجه این بخش نشان داد که در مقایسه با تیمار شاهد، مایه‌زنی باکتریایی باعث افزایش ۹ درصدی عملکرد وزن خشک اندام هوایی گندم می‌گردد (شکل ۳A). افزایش وزن خشک برگ، ساقه و سنبله بر اثر مایه‌زنی باکتریایی، به ترتیب برابر با ۹/۶، ۱۱ و ۶/۶ درصد بود (شکل ۳B، ۳C و ۳D). کاربرد تریپتوفان به میزان ۱۰۰

باکتری موجب افزایش ۹/۵ درصدی ارتفاع ساقه گندم نسبت به شاهد گردید (شکل ۲E). در حالی که تیمار تریپتوفان + باکتری، ۱۶ درصد و تیمار تریپتوفان، ۸ درصد ارتفاع گیاه را نسبت به شاهد کاهش دادند (شکل ۲E).

تریپتوفان در شرایط عدم حضور باکتری نیز به ترتیب ۶، ۸۷ و ۱۵ درصد وزن خشک برگ، سنبله و ساقه را کاهش داد (شکل ۳B، ۳C و ۳D). تیمار تریپتوفان + باکتری به ترتیب منجر به کاهش معنی‌دار (جدول ۲) وزن خشک برگ، سنبله و ساقه به میزان ۱۸، ۹ و ۱۷ درصد گردید (شکل ۳B، ۳C و ۳D). تیمار



شکل ۲- تاثیر تیمارهای مورد مطالعه بر میانگین وزن خشک کل گیاه، سنبله، ساقه و برگ. تیمارها شامل: شاهد (بدون افزودن تریپتوفان و باکتری)، +Trp (افزودن تریپتوفان)، B (باکتری)، B + Trp (باکتری بعلاوه تریپتوفان) میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن، تفاوت معنی‌داری ندارند

Figure 2. The effect of the studied treatments on the dry weight of the whole plant, spike, shoot and leaves. Control (without adding tryptophan and bacteria), +Trp (adding tryptophan), B (bacteria without adding tryptophan), B + Trp (bacteria plus tryptophan) Means similar letters, are not significantly different according to Danka's test at 5 % probability level

افزایش وزن خشک و تر گیاه در مقایسه با تیمار شاهد را گزارش کرده‌اند. تریپتوفان پیش ماده ساخت اکسین در گیاه و باکتری به شمار می‌رود، به نظر می‌رسد که افزودن تریپتوفان در غلظتی (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) که در این پژوهش استفاده گردیده است، تنش‌هایی را برای گیاه به وجود آورده است که احتمالاً مربوط به زیادی اکسین و تأثیرات بازدارندگی آن در مرحله رویشی هست، نتیجه این اختلال می‌تواند افزایش جذب عناصر و هدررفت کربن به شکل دی‌اکسیدکربن و کاهش ماده خشک باشد (Paciorek *et al.*, 2005). با فرض درست بودن این امر به نظر می‌رسد که می‌توان نقش دیگری را برای این باکتری‌ها متصور شد و عنوان کرد که این باکتری‌ها می‌توانند در مقابله با تنش فیزیولوژیکی ناشی از زیادی اکسین نیز دخیل باشند چرا که تأثیر کاهش تریپتوفان بر عملکرد کل اندام هوایی گندم در مقایسه با کاربرد تلفیقی آن به همراه باکتری حدود ۴ درصد تعدیل شده بود. تریپتوفان یک منبع نیتروژن برای باکتری‌های ریزوسفری بوده (Mostufa *et al.*, 2016) و ممکن است یکی از دلایل کاهش تنش اکسین مصرف تریپتوفان به عنوان منبع نیتروژن توسط باکتری‌ها باشد. همچنین انتظار می‌رود که با این نقش این باکتری‌ها بتوانند عامل بیوکنترلی در مقابل پاتوژن‌هایی باشند که با بیش تولید اکسین موجب خسارت به گیاه می‌شوند.

ویژگی‌های ریشه

بر طبق نتایج تجزیه واریانس این بخش (جدول ۳) اثر تیمارهای آزمایشی بر وزن تازه ریشه، و درصد رطوبت نسبی ریشه در سطح احتمال یک درصد و بر حجم ریشه و نسبت ریشه به ساقه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. تأثیر تیمارهای آزمایشی بر وزن خشک ریشه معنی‌دار نشد.

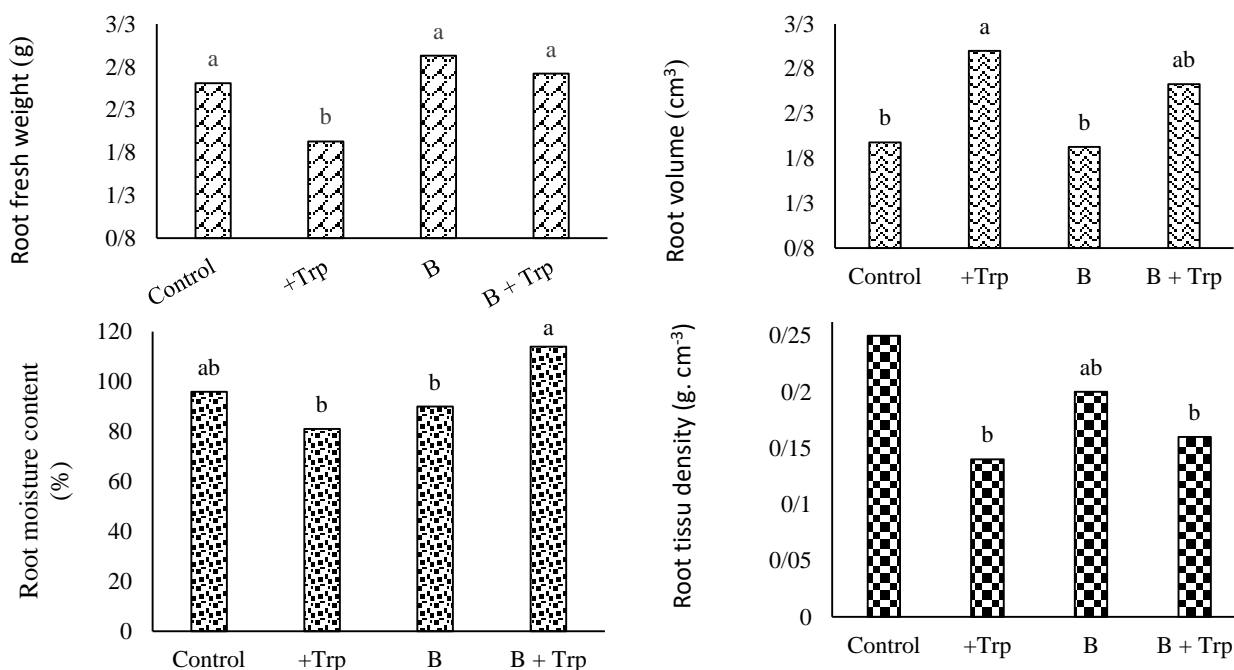
بر طبق نتایج این پژوهش باکتری *باسیلوس سیمپلیکس* ۱۶ توانست صفات رویشی گندم را بهبود بخشیده و آنها را افزایش دهد، بررسی‌های قبلی نشان داده بود که این باکتری علاوه بر تولید اکسین، توانایی تولید آنزیم ACC دامیناز و توانایی رهایش پتاسیم و فسفر از منابع نامحلول را نیز دارا می‌باشد (Karimi *et al.*, 2017; Karimi *et al.*, 2019)، با توجه به اینکه کشت هیدروپونیک بود و عناصر غذایی در فرم قابل دسترس عرضه می‌شدند، لذا توانایی تولید متابولیت‌های میکروبی در توجیه افزایش عملکرد منطقی‌تر به نظر می‌رسد. اثرات منفی بر عملکرد رویشی گندم در تیمارهایی با کاربرد تریپتوفان در مقایسه با تیمار شاهد با توجه به قسمت نتایج آزمایشگاهی و تبدیل آن به اکسین می‌تواند حکایت از اختلال در تنظیم سطح اکسین داخلی گیاه داشته باشد. خان و همکاران (Khan *et al.*, 2019) تریپتوفان را در غلظت ۲۱۰ میلی‌گرم بر لیتر در کشت هیدروپونیک کاهو مورد استفاده قرار دادند، نتایج در هفته چهارم نشان داد که این اسید آمینه باعث کاهش شدید طول برگ کاهو، پهنای برگ، مساحت برگ، ارتفاع گیاه و تعداد برگ و نهایتاً کاهش وزن خشک و تر آن گردید. تریپتوفان افزوده شده به محیط کشت گیاه توسط ریشه گیاه قابل جذب بوده و بنابراین پس از ورود به گیاه می‌تواند با تبدیل به اکسین موجبات تغییر در گیاه را در نتیجه تغییرات سطح این هورمون فراهم نماید که منجر به تنش فیزیولوژیک در کاهو گردیده است (Mustafa *et al.*, 2016). عباس و همکاران (Abbas *et al.*, 2013) نتایج کاربرد غلظت‌های مختلف تریپتوفان در رشد نخود را به صورت کاهش طول ریشه نخود در مقایسه با تیمار شاهد بدون تریپتوفان عنوان کردند، همچنین تریپتوفان در غلظت ۱^{-۱} ۱۰ مولار باعث افزایش تعداد گره، در غلظت ۱۰^{-۳} ۱۰ مولار کاهش وزن تازه و خشک گره و در غلظت ۱۰^{-۱} ۱۰ مولار و ۱۰^{-۲} ۱۰ مولار

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر خصوصیات ریشه گندم

Table 3. The results of analysis of variance of the effect of treatments on wheat root traits

Source of variation	Degree of freedom	Mean square				
		Root fresh weight	Root dry weight	Root volume	Root issue density	Root moisture content
Block	3	0.020 ^{ns}	0.120 ^{ns}	0.477 ^{ns}	0.000 ^{ns}	0.013 ^{ns}
Treatment	3	0.600**	0.006 ^{ns}	1.087*	0.008**	0.081**
Error	9	0.640	0.008	0.228	0.001	0.140

^{ns} غیر معنی‌دار، * و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال یک و ۵ درصد
^{ns}: Not significant, * Significant at P < 0.05, ** Significant at P < 0.01



شکل ۳ - میانگین وزن تازه ریشه، حجم ریشه، چگالی ریشه و درصد رطوبت وزنی ریشه گندم در تیمارهای آزمایشی. شاهد (بدون افزودن تریپتوفان و باکتری)، +Trp (افزودن تریپتوفان)، B (باکتری بدون افزودن تریپتوفان)، B + Trp (باکتری بعلاوه تریپتوفان). میانگین های داری حروف مشترک در سطح احتمال ۵٪ بر اساس آزمون دانکن، تفاوت معنی داری ندارند

Figure 3. Mean of root fresh weight, root volume, root density and root moisture weight percentage of wheat in treatments. Control (without adding tryptophan and bacteria), +Trp (adding tryptophan), B (bacteria without adding tryptophan), B + Trp (bacteria plus tryptophan). Means similar letters, are not significantly different according to Danka's test at 5 % probability level

اولیه به ترتیب به میزان ۴۰ و ۷۰ درصد شده‌اند (Verbon & Liberman, 2016). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که علیرغم عدم وجود تغییرات معنی‌دار در وزن خشک ریشه، خصوصیات نظیر چگالی و حجم آن از کاربرد تریپتوفان متأثر گردید. شکل ۴ و شکل ۵ تصاویری از ریشه گندم در تیمارهای مختلف این مطالعه را به تصویر می‌کشند، دقت در جزئیات تصاویر نشان می‌دهند که تیمارهای مذکور باعث تقویت ظهور تارهای کشنده شده‌اند، از آنجایی که تارهای کشنده در مقایسه با سایر بخش‌های ریشه اندازه ریزتر و سطح جذب بالایی داشته و دارای چگالی کمتری نسبت به سایر بخش‌ها می‌باشند می‌توانند توجیه کننده تغییرات در چگالی بافت ریشه، حجم و درصد رطوبت وزنی آن باشند. دانشمندان علوم کشاورزی معتقدند که کمیت زیاد ریشه الزاماً به معنی فعالیت بیشتر ریشه

بر طبق نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) وزن خشک ریشه از کاربرد باکتری و تریپتوفان متأثر نگردید به عبارت دیگر تیمارهای آزمایشی نتوانستند بر این صفت تاثیر گذار باشند. حجم ریشه و چگالی آن اگرچه در اثر مایه‌زنی باکتریایی تغییر نیافت ولی کاربرد تریپتوفان در حضور یا عدم حضور باکتری به طور یکسان باعث افزایش حجم ریشه (۷۰ درصد) و کاهش چگالی ریشه (۶۰ درصد) شدند و از بین تیمارهای مورد مطالعه فقط تیمار باکتری + تریپتوفان موجب افزایش درصد رطوبت وزنی ریشه (۱۸ درصد) گردید (شکل ۳). مشخص شده که مایه‌زنی باکتری *P. simiae* بر آرابیدوپسیس باعث افزایش تقسیم سلولی در مریستم ریشه و مایه‌زنی باکتری *B. megaterium* موجب کاهش آن شده است. با این حال مشخص شده که هر دو این باکتری‌ها باعث کاهش طول ریشه

رویشی همان گونه که عنوان شده ناشی از اختلالات هورمونی در گیاه خواهد بود.

نیست و آن چیزی که باعث تشدید فعالیت ریشه می گردد وجود ریشه های ریز می باشد (Birouste *et al.*, 2013). با توجه به تغییرات مطلوب ایجاد شده در ریشه دلیل کاهش عملکرد بخش



شکل ۴- تصویر ریشه گندم در پاسخ به تیمارهای مختلف به ترتیب از چپ به راست: شاهد (A) ، +TRP (B) ، باکتری (C) و باکتری بعلاوه تریپتوفان TRP (D). دایره سفید در بالای هر تصویر به عنوان مقیاس بوده و قطری برابر با ۲ سانتی متر دارد

Figure 4. Image of wheat root in response to different treatments from left to right, respectively: control, +TRP, bacteria and bacteria plus tryptophan TRP. The white circle at the top of each image is as a scale and has a diameter of 2 cm



شکل ۵- تصویر میکروسکوپی از توزیع تارهای کشنده در اطراف ریشه های فرعی و اصلی گندم در تیمارهای مختلف، به ترتیب از چپ به راست شاهد، +TRP ، باکتری و باکتری بعلاوه تریپتوفان TRP

Figure 5. Microscopic image of the distribution of root hairs around the secondary and main roots of the wheat under different treatments, from left to right control, +TRP, bacteria and bacteria plus TRP tryptophan, respectively

چند در محیط هیدروپونیک به سبب عرضه کافی آب و عناصر نمی توان کارایی آنها را دقیق ارزیابی کرد ولی به جهت محدودیت عناصر فوق در خاک احتمال اینکه بتوانند بر فعالیت ریشه بیافزایند، زیاد است. ریشه کارایی مهمی در تولید محصولات کشاورزی به ویژه در شرایط دیم دارد لذا از این منظر، یافته های این تحقیق مهندسی ریشه گیاه با کاربرد پیش ماده ساخت متابولیت های میکروبی مانند اکسین را تایید نموده و بر ضرورت تحقیقات در این مورد تاکید می نماید. علاوه بر این در سالهای اخیر کودهایی با ترکیبات اسید آمینه ای وارد بازار شده است، چنانچه در محتوای آنها اسید آمینه تریپتوفان باشد، بایستی با احتیاط مورد مصرف قرار گیرند.

نتیجه گیری کلی

کاربرد تریپتوفان با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر هم در شرایط همراه با مایه زنی باکتریایی و هم در شرایط بدون مایه زنی باکتریایی باعث افت عملکرد اندام هوایی گندم گردید. با توجه به ارتباط بین تولید اکسین و تریپتوفان می توان این امر را ناشی از زیادی تولید اکسین و بروز اختلالات فیزیولوژیکی ناشی از آن عنوان کرد. لذا این غلظت برای تریپتوفان توصیه نمی گردد. در عین حال با توجه نتایج حاصل از تصاویر ریشه به ویژه تصاویر میکروسکوپی تغییرات مرفولوژیکی ریشه بخصوص رشد فزاینده تارهای کشنده ناشی از کاربرد تریپتوفان مشاهده گردید. هر

References

- Abbas S.H., Sohail M., Saleem M., Mahmood T., Aziz I., Qamar M., and Arif M. 2013. Effect of L-tryptophan on plant weight and pod weight in chickpea under rainfed conditions. *Science Technology Development*, 32(4): 277-280.
- 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.
- Ambreen A., and Shahida H. 2014. Auxins as One of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 63 (3): 261–266.
- Bent E., Tuzan S., Chanway C.P., and Enebak S. 2000. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 47:793-800.
- Birouste M., Zamora-Ledeza E., Bossard C., Pérez-Ramos I.M., and Roumet C. 2013. Measurement of fine root tissue density: a comparison of three methods reveals the potential of root dry matter content. *Plant and Soil*, 374(1-2).
- De_Souza R., Ambrosini A., and Passaglia L.M.P. 2015. Growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4): S1415.
- Etesami H., Alikhani H.A., and Akbari AA. 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(11): 1576-1584.
- Gupta G., Parihar S.S., Ahirwar N.K., Snehi S.K., and Singh V. 2015. Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): current and future prospects for development of sustainable agriculture. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 7(2):96–102.
- Hassan T., and Bano A. 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 (1): 190-201.
- Karimi E., Ali Asgharzag N., Nishabouri M.R., and Esfandiari E. 2017. The effect of biofilm growth promoting bacteria on wheat yield and its components in response to late growth water deficit stress in rainfed wheat. *Iranian rainfed crop research*, 6(1): 87-102. (In Persian)
- Karimi E., Ali Asgharzag N., Nishabouri M.R., and Esfandiari E. 2019. Isolation, Molecular identification and evaluation of growth stimulating characteristics of biofilm producing bacteria from the rhizosphere of non-crop plants in Northwest of Iran. *Journal of Soil Applied Research*, 7 (2): 14-28. (In Persian)
- Kawasaki A., Donn S., Ryan P.R., Mathesius U., Devilla R., and Jones A. 2016. Microbiome and exudates of the root and rhizosphere of *Brachypodium distachyon*, a model for wheat. *PLOS ONE*, 11(10):32-45.
- Khan S.h., Yu H., Li Q., Gao Y., Sallam B.N., Wang H., Liu P., and Jiang W. 2019. Exogenous application of amino acids improves the growth and yield of lettuce by enhancing photosynthetic assimilation and nutrient availability. *Agronomy*, 9: 266-275.
- Martens D.A., and Frankenberger W.T. 1992. Stability of microbia produce auxins derived from L- tryptophan added to soil. *Plant and Soil* 155 (4): 263-270.
- Moe L.A. 2013. Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany*, 100: 1692–1705.
- Mohite B., 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(3): 638-649.
- Muneer M., Saleem M., Abbas S.H., Hussain I., and Asim M. 2009. Using L-Tryptophan to influence the crop growth of maize at different harvesting stages. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 6: 251-255.
- Mustafa A., Hussain A., Naveed M., Ditta A., Nazli Z.E.H., and Sattar A. 2016. Response of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) to soil and foliar applied L-tryptophan. *Soil and Environment*, 35: 76–84.
- Mustafa A., Imran M., Ashraf M., and Mahmood K. 2018. Perspectives of using L-tryptophan for improving productivity of agricultural crops: A review. *Pedosphere*, 28(1): 16–34.
- Nazir N., Kamili A., and Shah D. 2018. Mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth – A Review. *International Journal of Management Technology and Engineering*, 8: 709-721.
- Paciorek T., Zazimalova E., Ruthardt N., Petrsek J., Stierhof YD., Kleine-Vehn J., Morris DA., Emans N., Jurgens G., and Geldner N. 2005. Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435: 1251–1256.
- Verbon E.H., and Liberman L.M. 2016. Beneficial microbes affect endogenous mechanisms controlling root development. *Trends in Plant Science*, 21(3): 218-229.
- Yasmin H., Asia N., Naz R., Asghari B., and Rumana L. 2017. l-tryptophan-assisted PGPR-mediated induction of drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Interactions*, 12 (1): 567-578.
- Yassen A.A., Mazher A.A.M., and Zaghoul S.M. 2010. Response of anise plants to nitrogen fertilizer and foliar spray of tryptophan under agricultural drainage water. *New York Science Journal*, 3(9): 120-127.
- Zahir Z.A., Asghar H.N., Akhtar M.J., and Arshad M. 2005. Precursor (L-tryptophan)-inoculum (*Azotobacter*) interaction for improving yields and nitrogen uptake of maize. *Journal of plant nutrition*, 28(5): 805-817.

Co-Application of Tryptophan Amino Acid and *Bacillus Simplex* as a Plant Growth Promoting Bacteria Effects on Bread Wheat Yield in Greenhouse Condition

Esmail Karimi^{1*}, Zahra Mohammadi², Ezzat Allah Esfandyari³

(Received: December 2020 Accepted: June 2021)

Abstract

L-tryptophan is a precursor of auxin synthesis by PGPRs. In soil, this precursor derived from hydrolysis of soil organic matter protein. Lack of sufficient soil organic matter especially in rained condition could be limiting factor in this topic. For this purpose, an experiment was designed to evaluate the effect of tryptophan in the presence and absence of growth promoting bacteria on wheat growth. The results showed that in LB and root exudate mediums auxin was produced respectively 41.1 and 20.9 mg.L⁻¹ by *B. simplex* 16 just when tryptophan added at 5 mM concentration. Bacterial inoculation of wheat seeds, addition of 100 mg.L⁻¹ tryptophan and co-application of tryptophan and bacterial inoculation treatments respectively increased 9%, decreased 16% and decreased 20% the dry matter yield of wheat shoots compared to the control. Due to the use of tryptophan in both bacterial and non-bacterial inoculation conditions, root tissue density decreased 60% but root volume increased 70%. Microscopic studies and whole root images showed that both bacteria and tryptophan treatments caused morphological changes, especially in the hair roots section. According to the results of this study, the use of tryptophan at a concentration of 100 mg.L⁻¹ is not recommended to increase wheat growth due to the potential for auxin stress and developmental disorders.

Keywords: Hydroponic culture, root exudate, microbial auxin, root volume

Karimi E., Mohammadi Z., Esfanyari E., Jafarzadeh J. 2022. Co-application of tryptophan amino acid and *bacillus simplex* as a plant growth promoting bacteria effects on bread wheat yield in greenhouse condition. *Applied Soil Research*, 10(2): 91-102.

1. Assistant Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh.

2. MSc Student, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Maragheh.

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

* Corresponding Author Email: sm_ka80@yahoo.com