

جداسازی و شناسایی باکتری های محرک رشد از ریزوسفر گندم و ارزیابی ویژگی های محرک رشد و مهار زیستی آنها

Isolation and identification of plant growth-promoting bacteria from the rhizosphere of wheat and evaluation of their growth-promoting and biocontrol properties

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1401.11.2.3.2>

DOR:20.1001.1.25885073.1401.11.2.3.2

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Volume 11, Number 2
2023

<http://gebsj.ir/>

<https://ecc.isc.ac/showJournal/23064>

احسان حسنونند، مصطفی درویش نیا، حسین میرزایی نجفقلی*، سمیرا پاکباز

Ehsan Hasanvand, Mostafa Darvishnia, Hossein Mirzaei Najafgholi* and Samira Pakbaz

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding Author, Email: پست الکترونیکی: mirzaei.h@lu.ac.ir

mirzaei.h@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۴)

چکیده

واژه‌های کلیدی

مهار زیستی،

F. graminearum

Pseudomonas

PGPR

تلقیح بذور با ریزوباکتری‌های بومی افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR)، رویکردی مناسب در مدیریت سلامت، بهبود تولید و کیفیت محصولات کشاورزی می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه از ریزوسفر گیاهان گندم در شهرستان سلسله و ارزیابی ویژگی‌های مفید جدایه‌های باکتریایی می‌باشد. از بین ۱۰۰ جدایه باکتریایی جدا شده از خاک اطراف ریزوسفر گندم، چهار جدایه توسط غربال‌گری با استفاده از آزمون حلالیت فسفات انتخاب شدند. سپس توانایی چهار جدایه برتر از نظر تولید ایندول استیک اسید، سیدروفور، پروتاز، حرکت توده‌ای باکتریایی، تشکیل بیوفیلم و اثر آن‌ها بر روی جوانه‌زنی بذور گندم در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. این چهار جدایه از نظر ویژگی‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی بررسی و بر اساس تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه 16s rDNA با عنوان *Pseudomonas sp.*، *Acinetobacter calcoaceticus* و *Exiguobacterium sp.* شناسایی شدند. در این تحقیق، در بین چهار جدایه باکتریایی استرینی از *Pseudomonas* بیشترین میزان تولید IAA ($5/59 \mu\text{g ml}^{-1}$)، سیدروفور (۲/۳۵ cm)، پروتاز (۱/۷ cm) و انحلال فسفات ($\mu\text{g ml}^{-1}$) را از خود نشان داد. بیشترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر *Fusarium graminearum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم مربوط به جدایه *P. brassicacearum* بود که به میزان ۴۹/۳۳ درصد ارزیابی شد.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2, 2023

Abstract

Seed inoculation with endemic plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) is a suitable approach in health management, improving the production and quality of agricultural products. The purpose of this research is to isolate and identify plant growth enhancing bacteria from the rhizosphere of wheat plants in Selseleh city (Iran) and to evaluate the beneficial characteristics of bacterial isolates. The screening of PGPR isolates was done using tests of the ability to produce indole acetic acid (IAA), siderophore, protease, bacterial swarming motility, biofilm formation, phosphate solubility and investigating the effect of bacterial isolates on wheat seeds germination in laboratory conditions. Among the 100 bacterial isolates extracted from the soil around the rhizosphere of wheat, the best four isolates were selected. The superior isolates were identified based on their morphological and biochemical characteristics as well as the nucleotide sequence of the 16sDNA region as *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas brassicacearum*, *Exiguobacterium* sp and *Acinetobacter calcoaceticus*. In this research, *Pseudomonas* sp. strain has the highest IAA production ($5.59 \mu\text{g ml}^{-1}$), siderophore production (2.35 cm), protease production (1.7 cm) and phosphate dissolution ($390 \mu\text{g ml}^{-1}$) among four bacterial isolates. The highest percentage of inhibiting the growth of pathogenic fungus *Fusarium graminearum*, the cause of Fusarium blight disease of wheat spike, was related to *P. brassicacearum* isolate, which was evaluated as 49.33%.

Key words: Biocontrol, *F. graminearum*, *Pseudomonas* and PGPR.

مقدمه

اکولوژیکی پایدار، از نظر اقتصادی بادوام و از نظر اجتماعی قابل پذیرش می باشد (Zortea et al. 2018). تنوع و شمار جمعیت میکروبی باکتری ها به عنوان فراوان ترین و متنوع ترین میکروارگانیسم ها در ریزوسفر گیاهان بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از خاک های غیرریزوسفری می باشد (Glick, 2012). حدود دو تا پنج درصد باکتری ها به عنوان باکتری های محرک رشد گیاه (PGPR Plant growth promoting bacteria) شناخته شده اند (Goswami et al. 2016). از نظر تکاملی به نظر می رسد که این باکتری ها حد واسط باکتری های ساپروفیت و بیماری زای گیاهی باشند. در واقع این باکتری ها، ساپروفیت هایی هستند که بدون ایجاد آسیب در میزبان، توانسته اند خود را در گیاه حفظ کنند (Vocciante et al. 2022). این میکروارگانیسم ها باعث افزایش رشد، باروری گیاه و بالا بردن تحمل گیاه در برابر تنش های محیطی و بیمارگرها می شوند (Haggag, 2010). سازوکارهای مستقیم PGPR شامل فراهم ساختن فسفر قابل جذب برای گیاه، تثبیت نیتروژن اتمسفری، جداسازی و مهیا نمودن عناصر نادر مانند آهن با استفاده از حامل های سیدروفوری و تولید هورمون های گیاهی نظیر

گندم (*Triticum aestivium* L.) یکی از مهم ترین گیاهان زراعی است که با سطح زیر کشت ۲۱۶ میلیون هکتار و تولید بیش از ۷۵۰ میلیون تن در سال ۲۰۲۰، در سطح وسیعی از زمین های کشاورزی دنیا و از جمله در ایران کشت می شود (CGIAR, 2021). سطح زیر کشت گندم در ایران حدود شش میلیون هکتار با تولید سالانه حدود ۱۳/۵ میلیون تن است. از طرفی نیاز سالانه کشور به گندم حدود ۱۴ میلیون تن است (Ahmadi et al. 2021). تامین امنیت غذایی جمعیت در حال رشد و خطرات زیست محیطی ناشی از استفاده از سموم شیمیایی، تنش های شوری، خشکی، آفات و بیماری ها از مهم ترین مسایل و چالش های پیش روی بشر می باشد (Glick, 2012). عوامل بیماری زای قارچی در صورت عدم مدیریت مناسب می توانند عملکرد سالانه کشاورزی را تا ۳۰ درصد کاهش دهند (Goswami et al. 2016). در مواجهه با مشکلات فوق، استفاده از پتانسیل زیستی خاک یا جامعه میکروبی مفید خاک اعم از باکتری ها و قارچ ها در جهت حفظ سلامت خاک های کشاورزی و کاهش مسائل زیست محیطی مفید و امید بخش می باشد. استفاده از این تکنولوژی از نظر زیستی امکان پذیر، از نظر

محیط آگار غذایی (NA) استفاده شد. پس از رشد پرگنه‌های باکتریایی روی محیط کشت، تک پرگنه‌ها براساس رنگ، اندازه و شکل ظاهری، انتخاب شدند (Schaad, 2001; Ahmadi *et al.*, 2021).

غربال‌گری جدایه‌های باکتریایی براساس میزان انحلال فسفات: در خاک‌های آهکی ایران، علی‌رغم بالا بودن فسفر کل در خاک، به دلیل کاربرد بلندمدت کودهای فسفره و کارایی پایین آنها، وجود PH بالا، درصد زیاد کربنات کلسیم، کمی مواد آلی و خشکی خاک باعث شده است که مقدار جذب فسفر کمتر از مقدار لازم برای تامین رشد بهینه اکثر محصولات کشاورزی باشد. از این رو یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های مورد نظر برای غربال‌گری جدایه‌های باکتریایی، بررسی میزان انحلال فسفات توسط آنها می‌باشد. به منظور غربال‌گری اولیه جدایه‌های باکتریایی، از محیط کشت اسپربر-آگار (Sperber Agar) استفاده شد. جدایه‌های باکتریایی روی محیط کشت اسپربر آگار کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. هاله شفاف اطراف کلنی باکتری‌ها به عنوان فعالیت مثبت باکتری در حل فسفات معدنی محسوب می‌شود. قطر این هاله پس از یک هفته اندازه‌گیری گردید. این آزمون در سه تکرار برای هر جدایه باکتریایی انجام شد (Sperber, 1985). همچنین به منظور تخمین کمی توانایی انحلال فسفات با کشت گونه‌های باکتری از محیط اسپربر مایع استفاده شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها با غلظت CFU/ml 10^9 به محیط اسپربر مایع اضافه گردید. پنج روز پس از مایه‌زنی و رشد باکتری‌ها، سوسپانسیون‌های باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. یک میلی لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط گردید. پس از ۲۰ دقیقه، شدت جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد (Sperber, 1985).

شناسایی جدایه‌های باکتریایی با استفاده از روش‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی و مولکولی با استفاده از ژن 16s rDNA: چهار جدایه باکتریایی که دارای بیشترین مقدار انحلال فسفات بودند، انتخاب و

جیبرلین، سیتوکین و اکسین می‌باشند. اثر غیرمستقیم باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه از طریق افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی با تشکیل ساختارهایی مانند بیوفیلم صورت می‌پذیرد. همچنین بسیاری از ریزجانداران خاک قادر به انحلال شکل‌های غیرقابل جذب کانی‌های معدنی فلزدار از طریق ترشح اسیدهای آلی هستند (Idris *et al.* 2004; Van Hamet *et al.* 2003). ریزوسفر خاستگاه اغلب باکتری‌های اندوفیت است. تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها راهکاری جهت حفظ و بقا در شرایط تنش‌های محیطی و حضور بیمارگرهای گیاهی می‌باشد. باکتری‌های ساکن ریزوسفر از طریق شیمی‌آرایی به میزبان نزدیک می‌شوند و پس از ورود اغلب در فضای بین‌سلولی ریشه تکثیر می‌شوند (Hallmann *et al.* 1998). عواملی نظیر صفات ذاتی میکروارگانیسم‌ها، ژنوتیپ گیاه، مرحله‌ی رشد، وضعیت فیزیولوژیکی، نوع بافت گیاهی، شرایط محیطی و شیوه‌های کشاورزی، تعیین کننده‌ی کلونیزاسیون میکروارگانیسم‌ها می‌باشند (Brader *et al.* 2014). این میکروارگانیسم‌ها پتانسیل بالقوه‌ای جهت بهره‌مندی در صنعت کشاورزی و ارتقای کیفیت محصولات زراعی را دارند (Rosenblueth *et al.* 2006; Rokni *et al.* 2021).

با توجه به محدودیت‌ها از جمله تهیه نهاده‌های شیمیایی، آلودگی‌های زیست‌محیطی و مدیریت بیماری‌های خاک‌زی در بهبود کیفی و کمی محصولات مهمی مانند گندم، شناسایی و بررسی باکتری‌های بومی افزایش دهنده رشد گیاه و اختصاصی محصول گندم امری ضروری و مهم می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی ریزوسفر گندم، غربال‌گری جدایه‌های باکتریایی براساس آزمون‌های تولید سیدروفور، انحلال فسفات، تولید بیوفیلم، تولید هورمون ایندول استیک اسید، تولید پروتاز، حرکت توده‌ای، خاصیت آنتاگونیستی و تحمل شوری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی پرگنه‌های باکتریایی از نمونه‌های خاک: نمونه‌های ریشه گندم به همراه خاک ریزوسفر از مناطق مختلف شهرستان سلسله استان لرستان در فصل بهار سال ۱۴۰۰ جمع‌آوری شد. به منظور جداسازی باکتری از روش کشت سری رقت متوالی بر روی

تولید ترکیبات سیدروفور توسط جدایه‌های باکتریایی: تشخیص نیمه کمی توان تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها با استفاده از محیط Cas-Agar. به روش الکساندر و زوبر (1991) انجام شد (Alexander and Zuberer, 1991). جدایه‌هایی که قادر به تولید سیدروفور بودند، بر پایه‌ی تشکیل هاله نارنجی رنگ، تشخیص داده شدند. تست‌های پتری حاوی جدایه‌های باکتریایی در سه تکرار و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

توانایی تولید پروتئاز: سنجش فعالیت پروتئازی با تلقیح ۲۰ میکرولیتر از جمعیت 10^8 CFU/ml هر جدایه باکتری به صورت لکه‌ای در سه تکرار بر روی محیط کشت SMA (Skim Milk Agar) با استفاده از روش انتشار در آگار انجام شد. تست‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. فعالیت پروتئاز با ایجاد یک ناحیه شفاف در اطراف کلنی در سطح محیط کشت SMA نشان داده می‌شود (Jones et al. 2007).

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم: جهت بررسی کمی و کیفی تشکیل بیوفیلم از میکروپلیت الیزا استفاده گردید (George, 2011). در این آزمون از جمعیت 10^8 CFU/ml جدایه‌های باکتریایی در محیط کشت LB درون چاهک‌های پلیت الیزا استفاده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت روی شیکرانکوباتور با سرعت ۶۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها با محلول کریستال ویوله یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و پس از شست‌وشو، ساختارهای بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعد با استفاده از محلول استیک اسید ۳۰ درصد و اندازه‌گیری میزان جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان تشکیل بیوفیلم از نظر کمی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمون در سه تکرار انجام شد (Narimani et al. 2017).

آزمون حرکت توده‌ای باکتری: برای انجام آزمون حرکت توده‌ای از محیط کشت NB استفاده گردید. پس از تهیه سوسپانسیون 1×10^8 CFU/ml از هر جدایه باکتریایی، با شست‌وشوی سلول‌های باکتریایی با بافر PBS در سه مرحله پلی ساکاریدهای خارج سلولی حذف گردید. سپس میزان ۲۰ میکرولیتر از هر جدایه باکتریایی

براساس آزمون‌های فنوتیپی- بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. آزمون‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز، هوازی/بی‌هوازی، هیدرولیز نشاسته، رشد در NaCl ۵، ۷، ۱۰ و ۱۵ درصد، تولید سیانید هیدروژن، تولید آمونیاک، رشد در دمای ۴، ۲۸، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، احیای نترات، هیدرولیز ژلاتین و آرژنین هیدرولاز براساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام شدند (Schaad et al. 2001). به منظور صحت شناسایی جدایه‌های باکتریایی، ابتدا DNA جدایه‌ها براساس کیت استخراج دی‌ان‌ای شرکت سیناژن، استخراج گردید. سپس به منظور تکثیر ناحیه ژن rDNA 16s از آغازگرهای عمومی (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و 16sF و (5'ACGGCTACCTTGTTACGACT3') 16sR استفاده شد (Weisburg, 1991). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر آغازگر رفت و برگشت، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه با دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از تکثیر ژن مورد نظر و ارزیابی کیفیت آن روی ژل آگارز یک درصد، محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت پیشگام ارسال گردید. نتیجه توالی‌یابی در پایگاه داده‌ای NCBI ارزیابی شد (Ahmadi et al. 2021).

تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط جدایه‌های باکتریایی: اندازه‌گیری کیفی توان جدایه‌ها در تولید هورمون IAA با استفاده از محیط DF صورت گرفت (Bric et al. 1991). اندازه‌گیری کمی توان تولید هورمون IAA با استفاده از روش رنگ‌آمیزی سالکوفسکی انجام شد (Glickmann and Dessaux, 1995).

میکرولیتر از ۴ جدایه باکتریایی با غلظت 1×10^7 CFU/ml با سه تکرار در چهار طرف دیسک قارچی به فاصله ۲/۵ سانتی متر به صورت خطی کشت شد. تشتک های پتری در انکوباتور با دمای ۲۸ سانتی گراد نگهداری شدند و پس از گذشت هفت روز قطر پرگنه قارچ اندازه گیری و با شاهد مقایسه گردید. درصد بازدارندگی هر سویه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Moreira et al. 2014).

$$100 \times \frac{\text{بایگین رشد قارچ در تیمار - بایگین رشد قارچ در شاهد}}{\text{بایگین رشد قارچ در شاهد}} = \text{درصد بازدارندگی}$$

تجزیه و تحلیل آماری: داده های اولیه در نرم افزار Excel وارد و تجزیه های آماری با استفاده از نرم افزار SAS ver.9.2 انجام شد. مقایسه میانگین ها بر اساس روش چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه ها براساس آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی

در جداسازی اولیه تعداد ۱۰۰ باکتری از نمونه های خاک جداسازی گردید. در نهایت تعداد چهار جدایه برتر از نظر میزان انحلال فسفات، انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج آزمون های فنوتیپی-بیوشیمیایی صورت گرفته به منظور شناسایی باکتری های استخراج شده از خاک به اختصار در جدول ۱ ارائه گردیده است. به منظور تشخیص جدایه های باکتریایی علاوه بر آزمون های فنوتیپی-بیوشیمیایی، یک قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای 16s-R و 16s-F طراحی شده براساس ناحیه 16S rDNA تکثیر شد (شکل ۱). پس از تکثیر، توالی یابی و بلاست کردن ناحیه تکثیر شده در پایگاه داده ای NCBI و هم چنین با توجه به نتایج آزمون های فنوتیپی-بیوشیمیایی جدایه ها شناسایی شدند. براساس خصوصیات فنوتیپی-بیوشیمیایی و توالی یابی بخشی از ناحیه ژن 16S rDNA، جدایه های باکتریایی *Pseudomonas sp.*، *A. calcoaceticus* و *P. brassicacearum*، *Exiguobacterium sp.* شناسایی شدند (جدول ۱). بعد از بلاست در پایگاه داده ای NCBI جدایه باکتریایی *Pseudomonas sp.* با شماره دسترسی OP765892 بیشترین شباهت را با جدایه های *P. koreensis* و *Pseudomonas*

روی دیسک های کاغذی شش میلی متری بر روی محیط کشت NA حاوی آگار ۰/۶ درصد قرار داده شد (Narimani et al. 2017). آزمون در سه تکرار انجام و میزان تحرک باکتری به مدت یک هفته اندازه گیری شد.

تعیین میزان تحمل جدایه های باکتریایی به نمک طعام: این آزمون با توجه به اهمیت تحمل فشار اسمزی و میزان شوری بالای زمین های کشاورزی در اکثر مناطق کشور انجام شد. بدین منظور چهار سطح شوری شامل پنج، هفت، ۱۰ و ۱۵ درصد از سدیم کلرید (NaCl) در شرایط آزمایشگاه روی جدایه های باکتریایی آزمایش شد. رشد باکتری ها پس از ۴۸ ساعت در غلظت های مختلف نمک مورد بررسی قرار گرفت (Bano and Mussarat, 2009).

آزمون جوانه زنی و کشت بذرها در شرایط آزمایشگاه: از محیط کشت NB برای تهیه مایه تلقیح جدایه های باکتریایی استفاده شد. از هر جدایه جمعیت 1×10^7 CFU/ml تهیه گردید. پس از ضد عفونی بذور توسط اتانول ۷۰ درصد و شست و شو با آب مقطر سترون، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه درون سوسپانسیون باکتریایی تلقیح شدند. بذرها در پتری مرطوب درون اتاقک رشد در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای اندازه گیری سرعت جوانه زنی، هر دوازده ساعت بذره های جوانه زده شمارش شد. تنها زمانی که طول ریشه چه به ۲ میلی متر برسد، بذر به عنوان جوانه زده به شمار می آید. در پایان روز دهم درصد جوانه زنی و شاخص بنیه اندازه گیری شدند. همه اندازه گیری ها بر پایه ی دستورکارهای ISTA انجام شد. سرعت جوانه زنی (Abdul Baki and Anderson, 1973) و شاخص بنیه (Magurie, 1962) با استفاده از معادله های زیر محاسبه شدند:

$$\text{بذره های جوانه زده در هر بار شمارش} \sum$$

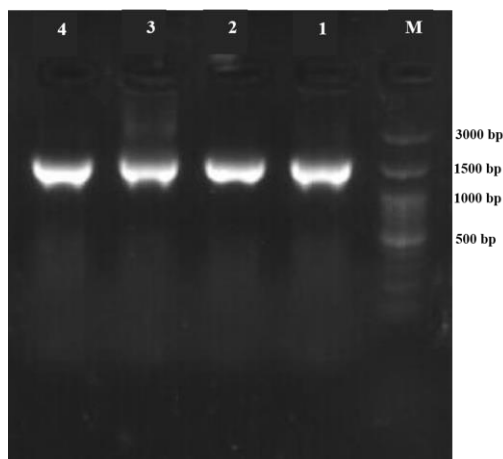
زمان شمارش

$$= \text{سرعت جوانه زنی}$$

$$\text{درصد جوانه زنی} \times (\text{میانگین طول ساقه چه} + \text{میانگین طول ریشه چه}) = \text{شاخص بنیه}$$

آزمون مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه: جهت سنجش فعالیت ضدقارچی جدایه ها، پس از کشت قارچ *F. graminearum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم در محیط کشت PDA، یک بلوک از قارچ به مرکز محیط کشت PDA اضافه گردید و ۱۰

کشت اسپربر مایع، جدایه های *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum* با 390 ± 25 و $359/6 \pm 17$ میکروگرم بر میلی لیتر فسفر بیشترین میزان حل کنندگی فسفات را نشان دادند (شکل ۴) و (جدول ۳ و ۲).



شکل ۱- محصول PCR حاصل از استفاده از جفت آغازگر 16s-F/16s-R در جدایه های نماینده. M مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی، ۱) *Pseudomonas sp.* ۲) *P.*

brassicacearum ۳) *A. calcoaceticus* ۴) *Exiguobacterium sp.*

Fig 1. PCR product from using primer pairs 16s-R/16s-F in representative isolates. M 3000 bp markers, 1) *Pseudomonas sp.* 2) *P. brassicacearum* 3) *A. calcoaceticus* 4) *Exiguobacterium sp.*

sp. با شماره های دسترسی MT629852.1 و FJ786057.1 داشت. هم چنین جدایه *P. brassicacearum* با شماره دسترسی OP769216 بیشترین شباهت را با جدایه های *P. brassicacearum* با شماره های دسترسی OK135820.1، MK267297.1، MT634394.1 و MT634395.1 داشت. جدایه *Exiguobacterium sp.* با شماره دسترسی OP766420، بیشترین شباهت را با جدایه های *Exiguobacterium sp.* با شماره های دسترسی KY962736.1، HF562461.1، DQ019168.1، MK414904.1 و MG758045.1 داشت. جدایه *A. calcoaceticus* با شماره دسترسی OP770352 بیشترین شباهت را با جدایه های *A. calcoaceticus* با شماره های دسترسی MN250321.1، MW632034.1، KY753249.1 و KP137409.1 داشت (شکل ۲).

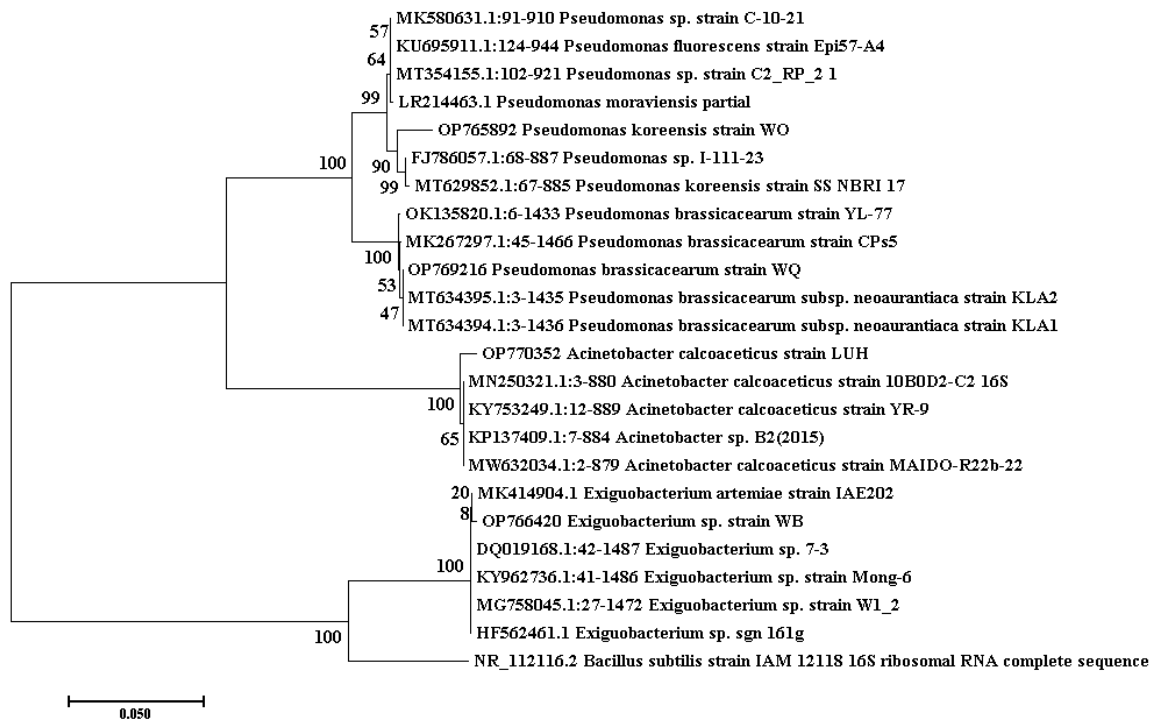
بررسی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول در جدایه ها

نتایج آزمون توانایی انحلال فسفات توسط جدایه های باکتریایی نشان داد که چهار جدایه در محیط کشت جامد توان انحلال فسفات معدنی بیشتر از سه میلی متر را داشتند. بیشترین و کمترین میزان تولید هاله حل کننده فسفات به مقدار $1/61 \pm 0/16$ و $0/0 \pm 35/06$ سانتی متر به ترتیب متعلق به جدایه های *Pseudomonas sp.* و *A. calcoaceticus* بود. همچنین روی محیط

جدول ۱- ویژگی های فنوتیپی-بیوشیمیایی باکتری های جداسازی شده از خاک ریزوسفر گندم

Table 1. Phenotypic-biochemical characteristics of bacteria isolated from wheat rhizosphere soil.

Characteristic	Isolates			
	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>P. brassicacearum</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Exiguobacterium sp.</i>
Gram stain	-	-	-	+
Type of metabolism	O	O	O	F
Oxidase	+	+	-	+
Catalase	+	+	+	+
starch hydrolysis	-	-	-	+
growth in NaCl (%)				
5	+	+	-	+
7	+	+	-	+
10	+	-	-	+
15	-	-	-	+
HCN production	-	+	-	-
casein hydrolysis	+	+	+	+
ammonia production	+	+	+	+
growth at				
4 °C	-	-	-	+
28	+	+	+	+
37	+	+	+	+
45	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	-	+
Gelatin hydrolysis	+	-	-	+
Arginine dihydrolase	+	+	-	+



شکل ۲- درخت تبارزایی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از خاک ریزوسفر گندم براساس تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rRNA توسط نرم‌افزار MEGA7 به روش Neighbor-joining با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap ساخته شد.

Fig 2. Phylogeny tree of bacterial isolates isolated from wheat rhizosphere soil based on 16S rRNA gene sequence analysis constructed by MEGA7 software using Neighbor-joining method with 1000 replicates of bootstrap test.

کمی نیز با هم مقایسه شدند. در این بررسی گونه *Pseudomonas* sp. با میانگین ۰/۲۵ بیشترین میزان جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر را نشان داد.

توانایی جدایه‌ها در تولید پروتئاز

در بررسی کیفی آزمون تولید پروتئاز، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه در محیط کشت جامد اختصاصی کازین آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بیشترین هاله شفاف ایجاد شده به ترتیب مربوط به جدایه *Pseudomonas* sp. و *P. brassicacearum* با میانگین 0.22 ± 0.1 و 0.16 ± 0.1 سانتی‌متر بود (شکل ۳).

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم

نتایج میزان تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌ها از روش میکروپلیت الیزا استفاده شد. بعد از رنگ‌آمیزی با استفاده از میکروسکوپ نوری ساختار بیوفیلم مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). رنگ آبی در شکل نشان‌دهنده تشکیل و اتصال ساختار بیوفیلم به چاهک

آزمون تولید ایندول استیک اسید

مقدار تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها، از ۱/۳۷ (A. *calcoaceticus*) تا ۵/۵۹ (جدایه *Pseudomonas* sp.) میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. مقدار IAA تولید شده توسط هر جدایه در جدول ۲ بیان شده است.

ارزیابی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های باکتریایی

نتایج آزمون کیفی روی محیط کشت CAS-آگار نشان داد که چهار گونه *Pseudomonas*, *P. brassicacearum*, *Exiguobacterium* sp. و *A. calcoaceticus* توانایی تولید سیدروفور را دارند. ظهور هاله‌ی نارنجی رنگ در اطراف پرگنه‌های باکتریایی نشان‌دهنده‌ی تولید سیدروفور می‌باشد (شکل ۳). در این آزمون نسبت قطر هاله به قطر کلنی در جدایه‌ها متغیر بوده و بیشترین توانایی تولید سیدروفور (بیشترین نسبت به ناحیه‌ی قطر هاله) پس از هفت روز متعلق به جدایه *Pseudomonas* sp. با نسبت 0.3 ± 0.35 سانتی‌متر بود. چهار گونه‌ای که توانایی تولید سیدروفور را دارا بودند، از نظر

با هم متفاوت و اشکال مختلفی از تحرک را نشان دادند (شکل ۴). بیشترین میزان تحرک در بین جدایه‌ها به ترتیب مربوط به گونه‌های *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum* با میانگین مقادیر $36/2 \pm 3/0$ و $33/3 \pm 0/1$ سانتی متر بود (جدول ۳ و ۲).

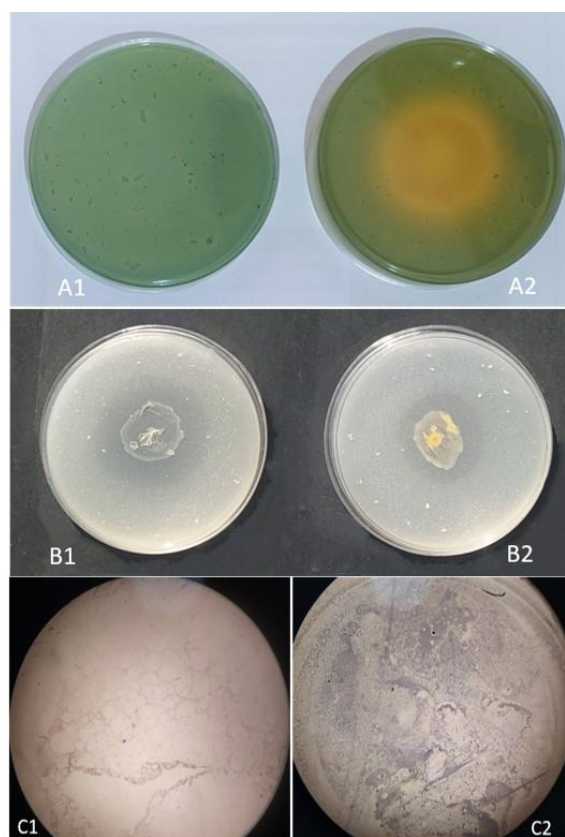
آزمون مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در آزمون کشت متقابل حاکی از آن است که هر چهار جدایه باکتریایی قادر به جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بوده و تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان دادند. میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر به ترتیب در جدایه *P. brassicacearum* با مقدار $49/33$ درصد و کمترین متعلق به جدایه *A. calcoaceticus* با مقدار $32/33$ درصد ارزیابی شد (جدول ۳ و ۲).

می‌باشد. ساختار بیوفیلم در باکتری *P. brassicacearum* دارای بیشترین میزان تراکم و گسترش بود. هم‌چنین کمترین میزان تراکم و گسترش بیوفیلم در بین گونه‌ها مربوط به گونه *A. calcoaceticus* بود. به منظور ارزیابی کمی میزان توانایی جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم از اسید استیک 30 درصد در طول موج 550 نانومتر استفاده شد. با مقایسه میانگین‌ها در بین گونه‌های مورد استفاده، گونه‌های *P. brassicacearum* و *Pseudomonas sp.* به ترتیب با میانگین ضریب جذب $0/139$ و $0/109$ در طول موج 550 نانومتر بیشترین میزان تولید بیوفیلم را نشان دادند. هم‌چنین باکتری‌های *Exiguobacterium sp.* و *A. calcoaceticus* به ترتیب دارای میانگین ضریب جذب $0/069$ و $0/061$ بودند (جدول ۳ و ۲).

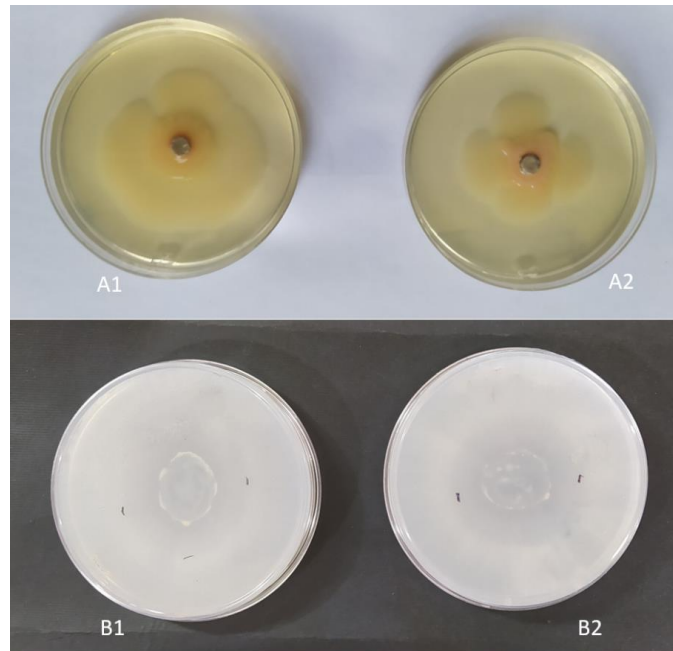
بررسی حرکت توده‌ای جدایه‌های باکتری

بررسی میزان حرکت توده‌ای جدایه‌ها روی محیط کشت NA $0/6$ درصد نشان داد که جدایه‌ها از نظر سرعت تحرک و نحوه حرکت



شکل ۳- تولید سیدروفور (ظهور هاله نارنجی رنگ) توسط جدایه منتخب باکتریایی بر روی محیط کشت CAS-آگار. (A1 شاهد، A2) جدایه *Pseudomonas sp.* (B2) تولید پروتئاز (ظهور هاله شفاف) به ترتیب در جدایه *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum* (C) بررسی تشکیل و ساختار بیوفیلم باکتریایی در روش میکروپلیت الایزا. (C1) باکتری *A. calcoaceticus* و (C2) باکتری *P. brassicacearum*.

Fig 3. Production of siderophore (appearance of orange halo) by selected bacterial isolate on CAS-agar medium. A1) Control, A2) *Pseudomonas sp.* isolate. B1) Protease production (appearance of clear halo). C) Investigation of formation and the structure of bacterial biofilm by microplate ELISA method C1) *A. calcoaceticus* and C2) *P. brassicacearum*.



شکل ۴- A) حرکت توده‌ای باکتریایی روی محیط کشت NA ۰/۶ درصد. A1) *Pseudomonas sp.* A2) *P. brassicacearum*. B1) توانایی انحلال فسفات (هاله شفاف اطراف پرگنه باکتری) بر روی محیط کشت Sperber agar توسط *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum*. B2) توانایی

Fig 4. Bacterial swarming movement on NA 0.6 percent culture medium. A1) *Pseudomonas sp.* A2) *P. brassicacearum*. B1) The ability of phosphate solubilization (clear halo around the bacterial colony) on the Sperber agar medium by *Pseudomonas sp.* and *P. brassicacearum*.

جدول ۲- تجزیه واریانس ساده فاکتورهای موثر در رشد گیاه و بازدارنده از بیمارگر قارچی.

Table 2. Simple variance analysis of effective factors in plant growth and inhibition of fungal pathogens.(average of squares)

Sources of changes	Degrees of freedom	IAA	Siderophore	Protease	Biofilm	swarming	Quantitative dissolution of phosphate	Qualitative dissolution of phosphate	Colony growth	Growth inhibition
treatment	4	15.90**	0.02**	1.03**	0.008**	5.82**	0.50**	0.54**	2.15**	1112.16**
Rep	2	0.02 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.00005 ^{ns}	0.008 ^{ns}	0.00008 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.008 ^{ns}	8.26 ^{ns}
C.V.	***	3.53	18.14	15.12	16.11	12.62	1.31	27.29	4.45	13.43

*** و ** به ترتیب معنی داری در سطوح ۵ و ۱ درصد، ns: سطوح غیر معنی داری

* and ** are significant at 5 and 1% levels respectively, ns: non-significant level.

جدول ۳- مقایسه میانگین فاکتورهای موثر در رشد گیاه و بازدارنده از بیمارگر قارچی *F. graminearum*

Table 3. Comparison of average effective factors in plant growth and inhibition of fungal pathogen *F. graminearum* (average)

Sources of changes	IAA	Siderophore	Protease	Biofilm	swarming	Quantitative dissolution of phosphate	Qualitative dissolution of phosphate	Colony growth	Growth inhibition
<i>Pseudomonas sp.</i>	5.59a	0.25a	1.73a	0.109b	3.36a	0.042a	1.61a	2.36c	42.33ab
<i>P. brassicacearum</i>	3.36c	0.19b	1.1b	0.139a	3.33a	0.035b	0.41b	1.83d	49.33a
<i>A. calcoaceticus</i>	1.37d	0.07c	0.50c	0.061c	1.63c	0.019c	0.35b	2.30c	39.33bc
<i>Exiguobacterium sp.</i>	3.81b	0.11c	0.30d	0.069c	2.23b	0.034b	0.56b	2.80b	32.33c
Control	0e	0d	0e	0c	0d	0d	0d	4.10a	0d

میانگین‌های با حروف مشترک در یک ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.

The average with common letters in the same column do not have a significant difference at the 5% probability level.

جدول ۴- بررسی تجزیه واریانس جدایه های باکتریایی در شاخص بنیه، سرعت جوانه زنی، درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه گندم در اتاقک رشد.

Table 4. Investigating the variance analysis of bacterial isolates in vigor index, seed germination rate, seed germination percentage, root length and stem length wheat in growth chamber. (average of squares)

Sources of changes	degrees of freedom	root length	stem length	root fresh weight	stem fresh weight	root dry weight	stem dry weight	germination percentage	germination rate	vigor index
treatment	4	2.55**	0.43**	0.03**	0.002**	0.0002**	0.00001**	19.26**	5.68**	32712**
Rep	2	0.09 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.000001 ^{ns}	0.000001 ^{ns}	1.66 ^{ns}	0.01 ^{ns}	2009 ^{ns}
C.V.	***	8.40	5.37	3.85	2.77	4.83	4.01	0.42	1.1	1.34

* به ترتیب معنی داری در سطوح ۵ و ۱ درصد، ns: سطوح غیرمعنی دار

* and ** are significant at 5 and 1% levels respectively, ns: non-significant level.

جدول ۵- بررسی مقایسه میانگین اثر جدایه های باکتریایی در شاخص بنیه، سرعت جوانه زنی، درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه گندم در اتاقک رشد

Table 5. Comparing the average effect of bacterial isolates in vigor index, seed germination rate, seed germination percentage, root length and stem length wheat in Growth chamber. (average)

Sources of changes	root length (cm)	stem length (cm)	root fresh weight (gr)	stem fresh weight (gr)	root dry weight (gr)	stem dry weight (gr)	germination percentage (%)	germination rate	vigor index
<i>Pseudomonas sp.</i>	5.76a	3.90b	0.66b	0.69a	0.07a	0.074a	98a	16.43a	898.87b
<i>P. brassicacearum</i>	4.26b	4.50a	0.76a	0.70a	0.063b	0.076a	96.66b	15.81b	927.44a
<i>A. calcoaceticus</i>	3.56c	3.96b	0.57c	0.67ab	0.056c	0.064bc	95.33c	13.95d	730.59c
<i>Exiguobacterium sp.</i>	4.60b	4.43a	0.56c	0.66ab	0.065ab	0.067b	94.33d	14.69c	830.81c
Control	3.5c	3.60c	0.50d	0.63b	0.046d	0.061c	91.33e	13.02e	686.31e

میانگین های با حروف مشترک در یک ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.

The average with common letters in the same column do not have a significant difference at the 5% probability level.

بحث

امروزه با توجه به کاربرد بیش از اندازه کودهای شیمیایی و آلودگی های زیست محیطی ناشی از مصرف بی رویه نهاده ها در مدیریت مزارع، هدف اصلی پژوهش حاضر یافتن روش های جایگزین مناسب، کارآمد و سازگار با محیط زیست می باشد (Khosravi *et al.* 2015). از این رو کاربرد PGPR در افزایش رشد کمی و کیفی محصول و مبارزه با عوامل بیماری زا به دلیل داشتن خصوصیات نظیر در دسترس گیاه قرار دادن عناصر غذایی مانند فسفر، آهن، نیتروژن و گوگرد، تولید هورمون های گیاهی، کلونیزاسیون بافت های گیاهی، رقابت با بیمارگر بر سر غذا و مکان، تولید آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی، ترشح ترکیبات ضدقارچی و القا مقاومت سیستمیک به عنوان روش جایگزین و موثر، مطرح می باشد (Bhattacharyya and Jha, 2012; Mirzaei Najafgholi *et al.* 2018; Ashrafi *et al.* 2020; Aeini *et al.* 2015). در تحقیق حاضر ۱۰۰ جدایه بومی باکتریایی از خاک ریزوسفر گیاه گندم جداسازی

تحمل شوری

نتایج میزان تحمل جدایه ها به شوری نشان داد از بین چهار جدایه، بجز *A. calcoaceticus* مابقی جدایه ها قادر به تحمل سطوح مختلف شوری بودند. به شکلی که جدایه *Exiguobacterium sp.* شوری ۲۰ درصد، جدایه *Pseudomonas sp.* شوری ۱۰ درصد و جدایه *P. brassicacearum* شوری ۷ درصد را تحمل کردند.

توانایی جوانه زنی و قوه نامیه ی بذر

همه جدایه ها سرعت جوانه زنی بالاتر از شاهد را داشتند. بر پایه ی جدول ۵، تفاوت معنی داری بین تیمارهای حاوی باکتری و شاهد از نظر درصد جوانه زنی بذر وجود داشت. بین جدایه ها از نظر شاخص بنیه تفاوت معنی داری وجود داشت، به طوری که این شاخص از ۹۲۷/۴۰±۴۴ در جدایه *P. brassicacearum* تا ۶۸۶/۳۰ متغیر بود (جدول ۴ و ۵).

تحرك فسفر پیوند شده با عناصر آهن و آلومینیوم، آزادسازی فسفر از منابع آلی و معدنی و نیز افزایش پخشیدگی فسفر از راهکارهای دیگری است که در حضور باکتری‌های حل‌کننده فسفر در محیط منجر به افزایش حلالیت و قابلیت جذب این عنصر می‌گردند (Chen et al. 2008). استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های شور از اهمیت خاصی برخوردار است. بدین منظور میزان تحمل باکتری‌های جدا شده نسبت به شوری بررسی گردید. چن و همکاران گزارش کردند که بیشترین میزان تحمل شوری باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر چند گیاه زراعی، سه درصد کلرید سدیم بوده است. در تحقیق حاضر، جدایه‌های *Pseudomonas sp.*، *Exiguobacterium sp.* و *Pseudomonas brassicacearum* قادر به تحمل میزان شوری ۷ تا ۲۰ درصد بودند. در بررسی‌های انجام شده گونه‌های *Pseudomonas brassicacearum* و *Pseudomonas sp.* بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم را داشتند. شواهد زیادی دال بر اثربخشی بهتر باکتری‌های PGPR با میزان تشکیل بیوفیلم بالا در مقایسه با باکتری‌های دیگر وجود دارد. هم‌چنین تشکیل بیوفیلم توسط باکتری‌های PGPR یک استراتژی مهم در سازگاری برای بقا و توانایی کلینزاسیون در ریزوسفر گیاهان می‌باشد (Ansari and Ahmad, 2018; Kasim et al. 2016). نتایج آزمایش‌های کشت متقابل بر رشد میسلیم قارچ بیمارگر *F. graminearum* در شرایط آزمایشگاه نشان داد که چهار جدایه باکتریایی اثر بازدارندگی بر رشد قارچ بیمارگر را دارند و قطر کلونی در مقایسه با شاهد کاهش یافته است. تحقیقات نشان می‌دهد که این اثرات می‌تواند به دلیل ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، تولید سیدروفور و ترکیبات فرار و غیرفرار ضد قارچی باشد (Ben Abdallah et al. 2016). نتایج نشان داد که چهار سویه باکتریایی قادر به تولید آنزیم پروتئاز بودند. این آنزیم دارای توانایی مهار زیستی در برابر قارچ‌های بیمارگر بوده و در تجزیه دیواره‌ی سلولی قارچ‌های بیمارگر دخیل می‌باشد (Ben Abdallah et al. 2016). همچنین جدایه‌های مورد آزمایش در این تحقیق توانایی تولید سیدروفور را داشتند. سیدروفور در تعاملات میکروبی ریزوسفر دارای اهمیت بوده و در شرایط کمبود آهن تولید شده و با جذب آهن سبب تقویت گیاه میزبان و محدود کردن عامل بیمارگر می‌گردد (Eisendle et al. 2004). هورمون‌های گیاهی با منشا

شد که از بین آن‌ها چهار جدایه که دارای بیشترین میزان انحلال فسفات بودند، انتخاب و ویژگی‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی و توالی ژن 16S rRNA و هم‌چنین اثر آن‌ها بر جوانه‌زنی گندم بررسی شد. در این بررسی استرین‌های باکتریایی *Pseudomonas sp.*، *Exiguobacterium sp.*، *Pseudomonas brassicacearum* و *Acinetobacter calcoaceticus* به‌عنوان جدایه‌های برتر معرفی شدند. در بررسی‌های پژوهشگران دیگر نیز جدایه‌های *Pseudomonas brassicacearum*، *Acinetobacter calcoaceticus* و *Pseudomonas sp.* به‌عنوان PGPR معرفی گردیده‌اند (Alsharif et al. 2020; Presta et al. 2016; Vanissa et al. 2020; Belimov et al. 2007). کلینزاسیون مؤثر ریشه توسط باکتری‌های جنس سودموناس و تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف در منطقه‌ی ریزوسفر می‌تواند عامل مهمی در رشد گیاه میزبان و کنترل بیماری‌های گیاهی به‌خصوص بیمارگرهای خاک‌زاد باشد (Weller 2007). یکی از مهم‌ترین راهکارهای افزایش عملکرد محصولات کشاورزی، به‌ویژه گیاهان گلخانه‌ای، فراهم کردن عناصر غذایی مورد نیاز گیاه به شکل قابل جذب در محیط رشد گیاه می‌باشد. فسفر یکی از عناصر غذایی ضروری برای رشد و توسعه گیاه محسوب می‌شود که به صورت فسفات معدنی به خاک اضافه می‌شود. متأسفانه بخش بزرگی از آن به صورت نامحلول در می‌آید و از دسترس گیاه خارج می‌شود. افزایش انحلال فسفر به‌وسیله برخی باکتری‌های محیط ریزوسفر می‌تواند سبب افزایش رشد گیاه گردد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات نقش عمده‌ای در انحلال شکل غیرقابل دسترس فسفر در خاک ایفا می‌کنند (Richardson and Simpson, 2011). پژوهش‌های زیادی در زمینه باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تثبیت‌کننده نیتروژن انجام شده است. بسیاری از این مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از این باکتری‌ها می‌تواند سبب افزایش کارایی محصولات مختلف گردد (Vanissa et al. 2020). جدایه‌های جنس *Pseudomonas* در پژوهش حاضر تاثیر بسزایی بر ارتفاع ساقه‌چه و رشد ریشه‌چه در مقایسه با شاهد داشتند. براساس نتایج پژوهشی، مواد ترشح شده به‌وسیله باکتری‌های حل‌کننده فسفات مانند اگزالات، لاکتات، سیترات، سوکسینات، آنیون‌های کربوکسیلیک و پروتون‌ها که منجر به کاهش PH محیط می‌شوند، در افزایش حلالیت ترکیبات فسفات کلسیم نقش دارند. افزایش رشد و ترشحات ریشه گیاه، افزایش

نتیجه گیری کلی

در بررسی حاضر استرین های باکتریایی *Acinetobacter* *Pseudomonas brassicacearum calcoaceticus* و *Exiguobacterium sp.* به عنوان جدایه های برتر معرفی شدند. درک نحوه عمل، تنوع و توزیع اکولوژیکی و تعامل آن ها با محیط، به منظور بررسی سازگاری این عوامل و موفقیت آن ها در افزایش رشد گیاهان در جهت تولیدات گیاهی سالم دارای اهمیت می باشد. با توجه به اینکه سویه های باکتریایی حاضر کارایی بالایی در تولید فاکتورهای موثر در رشد گیاه و هم-چنین فعالیت ضدقارچی دارند بنابراین می توان آن ها را به عنوان یک گزینه مناسب در تولید گیاهان سالم، تحت بررسی بیشتری قرار داد.

منابع

- Abdul Baki AA, Anderson JD. 1973.** Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science* 13: 630-633.
- Aeini M, Khodakaramian G, Mirzaei Najafgholi H. 2018.** Sugar beet leaf culturable endophytic bacterial composition from the major sugar beet growing areas in the west of Iran. *Journal of Genetic Resources* 4: 105-113.
- Ahmadi A, Mirzaei Najafgholi H, Aeini M, Kakolvand K. 2021.** Isolation and identification of othello, atlantis, and puma super herbicide-resistant bacteria isolated from the soil of wheat farms. *Biological Journal of Microorganism* 10: 67-77. (In Farsi with English abstract).
- Ahmadi E, GholamzadehChitgar M, Hagh Ghadam M, Heidari A. 2021.** Effectiveness of metaldehyde Lumakidin® against snails and slugs in the greenhouse of *Spathiphyllum* and lettuce field and its comparison with the efficiency of Ferricol® and Sabzarang® in ornamental flower greenhouse. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 44: 107-122.
- Alexander D, Zuberer D. 1991.** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils* 12(1): 39-45.
- Alsharif W, Saad MM, Hirt H. 2020.** Desert microbes for boosting sustainable agriculture in extreme environments. *Frontiers in Microbiology* 11: 16-26.
- Ansari FA, Ahmad I. 2018.** Biofilm development, plant growth promoting traits and rhizosphere colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: a promising PGPR. *Advances in Microbiology* 8: 235.
- Ashrafi A, Salehzadeh M, Khezrinezhad N. 2020.** Detection and identification of tomato wilt disease in east Azerbaijan Province and controlling it using antagonist bacteria. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 19: 28-39. (In Farsi with English abstract).

میکروبی ترکیبات مهم در افزایش رشد و تحمل تنش های محیطی گیاه بوده و سبب ایجاد مقاومت نسبت به بیمارگر می شوند (Yasmin et al. 2017). هورمون ایندول استیک اسید باعث افزایش تکثیر و توسعه ریشه گیاه شده و در نتیجه موجبات افزایش مقاومت میزبان را به آلودگی بیمارگر فراهم می سازد (González-Lamothe et al. 2012). توانایی تولید هورمون ایندول استیک اسید و انحلال فسفات در هر چهار جدایه مشاهده شد. با توجه به تولید فاکتورهایی بهبوددهنده رشد گیاه مانند انحلال فسفات، تشکیل بیوفیلم، تولید سیدرفور و تولید هورمون IAA توسط جدایه های مورد بررسی، هر چهار جدایه باکتریایی در مقایسه با شاهد سبب رشد بیشتر گیاهچه های گندم در شرایط آزمایشگاه شدند. نتایج این تحقیق با نتایج Khan و همکاران (۲۰۱۹) Patel و همکاران (۲۰۲۲) و Díez-Méndez and Rivas (۲۰۱۷) مشابهت دارد.

- Bano A, Mussarat F. 2009.** Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils* 45: 405-413.
- Belimov AA, Dodd IC, Safronova IV, Hontzeas N, Davies J. 2007.** *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1485-1495.
- Ben-Abdallah RA, Mejdoub-Trabelsi B, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddin H, Daami-Remadi M. 2016.** Isolation of endophytic bacteria from *Withania somnifera* and assessment of their ability to suppress *Fusarium* wilt disease in tomato and to promote plant growth. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 7(352): 1-11.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 4: 1327-1350.
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trogenitz F, Sessitsch A. 2014.** Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30-37.
- Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. 1991.** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 535-538.
- Chandrashekara C, Bhatt JC, Kumar R, Chandrashekara KN. 2012.** Suppressive soils in plant disease management. pp. 241-256. In: Singh, V.K., Singh, y. & Singh, A. (eds.). *Eco-Friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management*. International Book Distributors, 682 P.
- Chen Z, Liu Sh. 2008.** Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. *Bioresource Technology* 99: 6702-6707.
- Díez-Méndez A, Rivas R. 2017.** Improvement of saffron production using *Curtobacterium herbarum* as a bioinoculant under greenhouse conditions. *AIMS microbiology* 3(3): 354-364.
- Eisendle M, Oberegger H, Buttinger R, Illmer P, Hass H. 2004.** Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-

- mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*. Eukaryotic Cells 2: 561-563.
- Glick BP. 2012.** Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica: 963401.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995.** A Critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 61: 793-796.
- González-Lamothe R, Oirdi M, Brisson N, Bouarab K. 2012.** The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. Plant Cell 24: 762-777.
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. 2016.** Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food and Agriculture 2: 1-19
- Haggag WM. 2010.** Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases. Life Science Journal 7(2): 57-62.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Rodriguez-Kbana R, Kloepper JW. 1998.** Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. Soil Biology and Biochemistry 30(1): 925-37.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. 2004.** Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thaspi goesingense*. Applied and Environmental Microbiology 70: 2667-2677.
- Jones B, Sun F, Marchesi JR. 2007.** Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. Letters in applied microbiology 45: 418-420.
- Kasim WA, Gaafar RM, Abou-Ali RM, Omar MN, Hewait HM. 2016.** Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. Annals of Agricultural Sciences 61: 217-227.
- Khan MA, Asaf S, Khan AL, Ullah I, Ali S, Kang SM, Lee IJ. 2019.** Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. Annals of Microbiology 69: 797-808.
- Khosravi S, Tohidfar M. 2015.** Reduction of applied pesticides and cancer with the cultivation of transgenic crops. Genetic Engineering and Biosafety Journal 4: 1-10.
- Mirzaei Najafgholi H, Narimani S, Acini M, Taghavi SM, Tarighi S, Javaheri M. 2015.** Investigation the performance and biological control of the various tomato cultivars against the bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*). Biocontrol in Plant Protection 2: 47-57. (In Farsi with English abstract).
- Moreira RR, Nesi CN, De-Mio LLM. 2014.** *Bacillus* spp. and *pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control glomerella leaf spot. Biological Control 72: 30- 37.
- Narimani S, Bazgir E, Mirzaei Najafgholi H. 2017.** Evaluation of effective factors on survival and activity of petroleum degradation bacteria in bioremediation process. Cellular and Molecular Researches 30: 91-99. (In Farsi with English abstract).
- O'Toole GA. 2011.** Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments: (47): 2437
- Patel M, Patel K, Al-Keridis LA, Alshammari N, Badraoui R, Elalbali AM, Al-Soud WA, Hassan MI, Yadav DK, Adnan M. 2022.** Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria *Curtobacterium oceanosedimentum* improves growth attributes and strengthens antioxidant system in chili (*Capsicum frutescens*). Sustainability 14(7): 4335.
- Presta L, Fondi M, Perrin E, Maida I, Miceli E, Chiellini C, Maggini V, Bogani P, Di-Pilato V, Rossolini GM. 2016.** *Arthrobacter* sp. EpRS66 and *Arthrobacter* sp. EpRS71: draft genome sequences from two bacteria isolated from *Echinacea purpurea* rhizospheric soil. Frontiers in Microbiology 7: 1417.
- Richardson AE, Simpson RJ. 2011.** Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Plant physiology 156: 989-996.
- Rokni N, Alizadeh HS, Bazgir E, Darvishnia M, Mirzaei Najafgholi H. 2021.** The tripartite consortium of *Serendipita indica*, *Trichoderma simmonsii*, and bell pepper (*Capsicum annum*). Biological Control 158: 104608.
- Rosenblueth M, Martinez-Romero E. 2006.** Bacterial endophytes and interactions with hosts. Molecular Plant Microbe Interactions 19(8): 827-37.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001.** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edit. New York: American Phytopathology Society Press. 65-180.
- Sperber, JI. 1958.** The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9: 778-781.
- Van Hammet JD, Singh A, Ward OP. 2003.** Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4): 503-549.
- Vanissa TTG, Berger B, Patz S, Becker M, Turečková V, Novák O, Tarkovská D, Henri F, Ruppel S. 2020.** The response of maize to inoculation with *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. in phosphorus-deficient, salinity-affected soil. Microorganisms 8(7): 1005.
- Voccianta M, Grifoni M, Fusini D, Petruzzelli G, Franchi E. 2022.** The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plants environmental stresses. Applied Sciences 12(3): 1231.
- Waller F, Achatz B, Kogel KH. 2007.** Analysis of the plant protective potential of the root endophytic fungus *Piriformospora indica* in cereals. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 45: 343-354.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Bacteriology Research 173(2): 697-703.
- Yasmin S, Hafeez FY, Mirza MS, Rasul M, Hafiz MI, Arshad HMI, Zubair M, Iqbal M. 2017.** Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. Frontiers in Microbiology 8: 1-23.
- Zortea RB, Maciel VG, Passuello A. 2018.** Sustainability assessment of soybean production in Southern Brazil: A life cycle approach. Sustainable Production and Consumption 13: 102-112.