مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۱، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
صفحه ۲۴۲-۲۳۰

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

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

احسان حسنوند، مصطفی درویش‌نیا، حسین میرزایی نجفقلی* ، سمیرا پاکباز

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

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding Author, Email : نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی *
mirzaei.h@lu.ac.ir
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۴)

چکیده

تلقیح بذور با ریزوباکتری‌های بومی افزاینده رشد گیاه (PGPR)، رویکردی مناسب در مدیریت سلامت، بهبود تولید و کیفیت محصولات کشاورزی می‌باشد. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه از ریزوسفر گیاهان گندم در شهرستان سلسله و ارزیابی ویژگی‌های مفید جدایه‌های باکتریایی می‌باشد. از بین ۱۰۰ جدایه باکتریایی جداشده 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، پروتئاز، 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. ، *Pseudomonas brassicacearum*، *Exiguobacterium* sp. و *Acinetobacter calcoaceticus* شناسایی شدند. در این تحقیق، در بین چهار جدایه باکتریایی استرینی از *Pseudomonas* بیشترین میزان تولید IAA (۵/۵۹ µg ml^{-1})، سیدروفور (۲/۳۵ cm)، پروتئاز (۱/۷ cm) و انحلال فسفات (µg ۳۹۰ 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.

واژه‌های کلیدی

مهار زیستی،
F. graminearum،
Pseudomonas ،
PGPR

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

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 µg ml^{-1}), siderophore production (2.35 cm), protease production (1.7 cm) and phosphate dissolution (390 µg 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

گندم (*Triticum aestivium* L.) یکی از مهم‌ترین 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 زمین‌های کشاورزی دنیا و از جمله در ایران کشت می‌شود (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 ۱٤ میلیون تن است (Ahmadi *et al.* 2021). تامین امنیت غذایی جمعیت در حال رشد و خطرات زیست محیطی ناشی از استفاده از سموم شیمیایی، تنش‌های شوری، خشکی، آفات و بیماری‌ها از مهم‌ترین مسایل و چالش‌های پیش‌روی بشر می‌باشد (Glick, 2012). عوامل بیماری زای قارچی در صورت عدم مدیریت مناسب می‌توانند 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 باکتری‌ها و قارچ‌ها در جهت حفظ سلامت خاک‌های کشاورزی و کاهش مسائل زیست محیطی مفید و امید بخش می-باشد. استفاده از این تکنولوژی از نظر زیستی امکان‌پذیر، از نظر اکولوژیکی پایدار، از نظر اقتصادی بادوام و از نظر اجتماعی قابل پذیرش می‌باشد (Zorteaa *et al.* 2018). تنوع و شمار جمعیت میکروبی باکتری‌ها به عنوان فراوان‌ترین و متنوع‌ترین میکروارگانیسم‌ها در ریزوسفر گیاهان بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از خاک‌های غیرریزوسفری می‌باشد (Glick, 2012). حدود دو تا پنج درصد باکتری‌ها به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR Plant growth promoting bacteria,) شناخته شده‌اند (Goswami *et al.* 2016). از نظر تکاملی به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها حد واسط باکتری‌های ساپروفیت و بیماری‌زای گیاهی باشند. در واقع این باکتری‌ها، ساپروفیت‌هایی هستند که بدون ایجاد آسیب در میزبان، توانسته‌اند خود را در گیاه حفظ کنند (Vocciante *et al.* 2022). این میکروارگانیسم‌ها باعث افزایش رشد، باروری گیاه و بالا بردن تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی و بیمارگرها می‌شوند (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 حامل‌های سیدروفوری و تولید هورمون‌های گیاهی نظیر

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

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 غیرقابل‌جذب 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، آلودگی-های زیست‌محیطی و مدیریت بیماری‌های خاک‌زی در بهبود کیفی و کمی محصولات مهمی مانند گندم، ، شناسایی و بررسی باکتری-های 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 پروتئاز، 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 محیط آگار غذایی (NA) استفاده شد. پس از رشد پرگنه‌های باکتریایی روی محیط‌کشت، 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 این‌رو یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های مورد نظر برای غربال‌گری جدایه‌های باکتریایی، بررسی میزان انحلال فسفات توسط آن‌ها می‌باشد. به منظور غربال‌گری اولیه جدایه‌های باکتریایی، از محیط‌کشت اسپربر-آگار (Sperber Agar) استفاده شد. جدایه‌های باکتریایی روی محیط‌کشت 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

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 ٤، ۲۸، ۳۷ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد، احیای نیترات، 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 16s rDNA از آغازگرهای عمومی 16sF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و 16sR (5'ACGGCTACCTTGTTACGACT3') استفاده شد (Weisburg, 1991). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/٤ 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 ۹٤ درجه‌ی سانتی گراد، ۳۰ چرخه با دمای واسرشت سازی ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ٦۲ درجه‌ی سانتی گراد 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). اندازه گیری کمی توان تولید هورمون IAA با استفاده از روش رنگ‌آمیزی سالکوفسکی انجام شد (Glickmann and Dessaux, 1995).

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 (۱۹۹۱) انجام شد (Alexander and Zuberer, 1991). جدایه‌هایی که قادر به تولید سیدروفور بودند، بر پایه‌ی تشکیل هاله نارنجی رنگ، تشخیص داده شدند. تشتک‌های پتری حاوی جدایه‌های باکتریایی در سه تکرار و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۸ 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. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ 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 محیط‌کشت LB درون چاهک‌های پلیت الیزا استفاده شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲٤ ساعت روی شیکرانکوباتور با سرعت ٦۰ 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 محیط‌کشت 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 پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی حذف گردید. سپس میزان ۲۰ میکرولیتر از هر جدایه باکتریایی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

روی دیسک‌های کاغذی شش میلی‌متری بر روی محیط‌کشت NA حاوی آگار ۰/٦ درصد قرار داده شد (Narimani *et al.* 2017). آزمون در سه تکرار انجام و میزان تحرک باکتری به مدت یک هفته اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان تحمل جدایه‌های 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. بدین‌منظور چهار سطح شوری شامل پنج، هفت، ۱۰ و ۱۵ درصد از سدیم کلرید (NaCl) در شرایط آزمایشگاه روی جدایه های باکتریایی آزمایش شد. رشد باکتری‌ها پس از ٤٨ ساعت در غلظت‌های مختلف نمک مورد بررسی قرار گرفت (Bano and Mussarat, 2009).

آزمون جوانه‌زنی و کشت بذرها در شرایط آزمایشگاه: از محیط-کشت NB برای تهیه مایه تلقیح جدایه‌های باکتریایی استفاده شد. از هر جدایه جمعیت 1×10^{7} CFU/ml تهیه گردید. پس از ضدعفونی 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 ٢٤ درجه سانتی‌گراد و دوره روشنایی ١٦ ساعت روشنایی و ٨ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای اندازه‌گیری سرعت جوانه‌زنی، هر دوازده ساعت بذرهای جوانه‌زده شمارش شد. تنها زمانی‌که طول ریشه‌چه به ۲ میلی‌متر برسد، بذر به عنوان جوانه‌زده به شمار می‌آید. در پایان روز دهم درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه اندازه‌گیری شدند. همه اندازه‌گیری‌ها بر پایه‌ی دستورکارهای ISTA انجام شد. سرعت جوانه‌زنی (Abdul Baki and Anderson, 1973) و شاخص بنیه (Magurie, 1962) با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شدند:

$$\text{سرعت جوانه‌زنی} = \frac{\sum(\text{بذرهای جوانه‌زده در هر بار شمارش})}{\text{زمان شمارش}}$$

درصد جوانه‌زنی × (میانگین طول ساقه‌چه + میانگین طول ریشه‌چه) = شاخص بنیه

آزمون مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه: جهت سنجش فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها، 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 میکرولیتر از ٤ جدایه باکتریایی با غلظت 1×10^{7} CFU/ml با سه تکرار در چهار طرف دیسک قارچی به فاصله ۲/۵ سانتی‌متر به صورت خطی کشت شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری شدند و پس از گذشت هفت روز قطر پرگنه قارچ اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید. درصد بازدارندگی هر سویه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Moreira *et al.* 2014).

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{میانگین رشد قارچ در تیمار} - \text{میانگین رشد قارچ در شاهد}}{\text{میانگین رشد قارچ در شاهد}} \times ۱۰۰$$

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های اولیه در نرم‌افزار Excel وارد و تجزیه‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS ver.9.2 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس روش چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه‌ها براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی

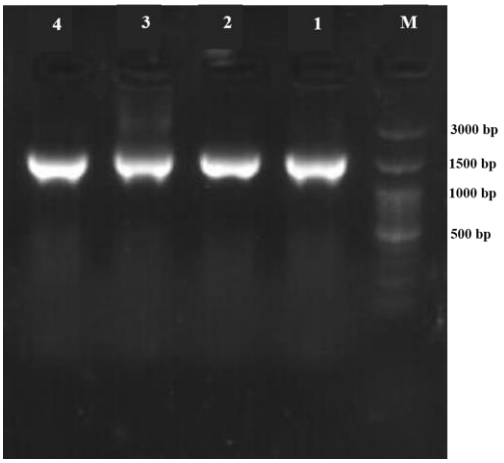
در جداسازی اولیه تعداد ۱۰۰ باکتری از نمونه‌های خاک جداسازی گردید. در نهایت تعداد چهار جدایه برتر از نظر میزان انحلال فسفات، انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی صورت گرفته به منظور شناسایی باکتری‌های استخراج شده از خاک به اختصار در جدول ۱ ارائه گردیده است. به منظور تشخیص جدایه‌های باکتریایی علاوه بر آزمون‌های 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، توالی‌یابی و بلاست کردن ناحیه تکثیر شده در پایگاه داده‌ای NCBI و هم‌چنین با توجه به نتایج آزمون‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی جدایه‌ها شناسایی شدند. براساس خصوصیات فنوتیپی-بیوشیمیایی و توالی‌یابی بخشی از ناحیه ژن 16S rDNA، جدایه‌های باکتریایی *Pseudomonas* sp.، *Exiguobacterium* sp.، *P. brassicacearum* و *A. calcoaceticus* شناسایی شدند (جدول ۱). بعد از بلاست در پایگاه داده‌ی NCBI جدایه باکتریایی *Pseudomonas* sp. با شماره دسترسی OP765892 بیشترین شباهت را با جدایه‌های *P. koreensis* و *Pseudomonas*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

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

بررسی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول در جدایه‌ها

نتایج آزمون توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌های باکتریایی نشان داد که چهار جدایه در محیط کشت جامد توان انحلال فسفات معدنی بیشتر از سه میلی‌متر را داشتند. بیشترین و کمترین میزان تولید هاله حل‌کننده فسفات به مقدار ۱/۶۱±۰/۱۶ و ۰/۰±۳۵/۰۶ سانتی‌متر به ترتیب متعلق به جدایه‌های *Pseudomonas sp.* و *A. calcoaceticus* بود. همچنین روی محیط کشت اسپربر مایع، جدایه‌های *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum* با ۳۹۰±۲۵ و ۳۵۹/۶±۱۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر بیشترین میزان حل‌کنندگی فسفات را نشان دادند (شکل ٤) و (جدول ۲و۳).



شکل ۱- محصول PCR حاصل از استفاده ازجفت آغازگر 16s-F/16s-R در جدایه‌های نماینده. M مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی، ۱) *Pseudomonas* sp. ۲) *P. brassicacearum* ۳) *A. calcoaceticus* ٤) *Exiguobacterium* sp.

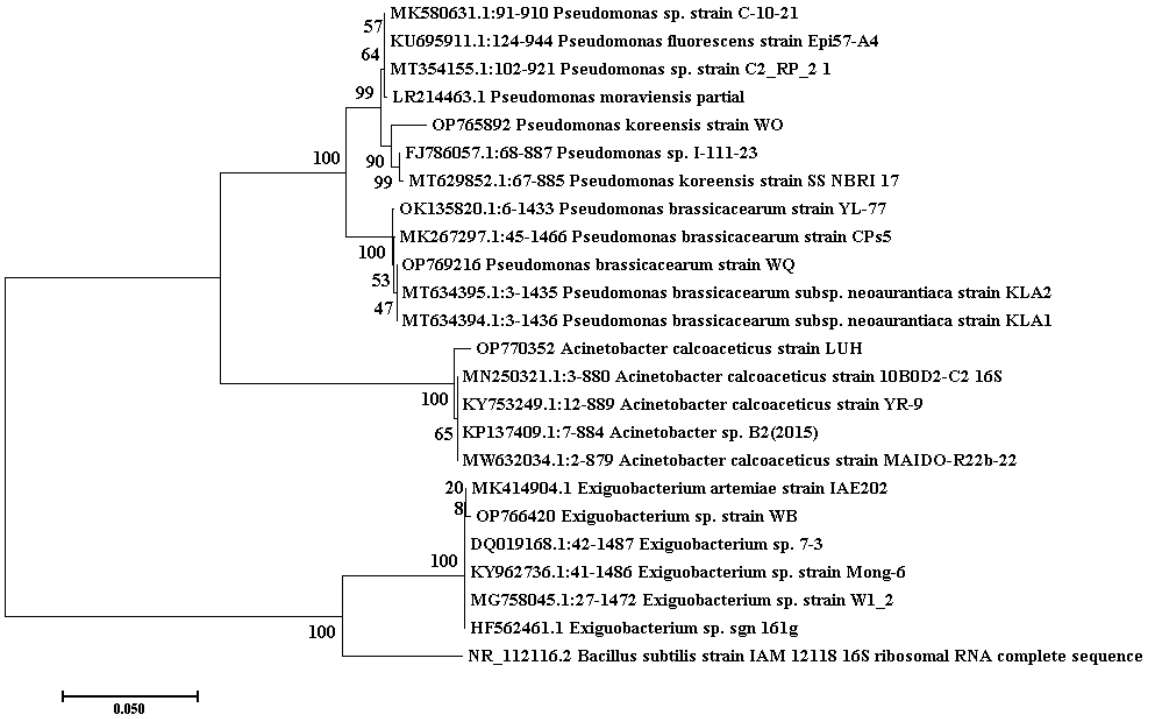
Fig 1. PCR product from using primer pairs 16s-R/16s-F in representative isolates. M 3000 bp markers, 1) *Pseudomonas* sp. 2) *P. brassicacearum* 3) *A. calcoaceticus* 4) *Exiguobacterium* sp.

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی-بیوشیمیایی باکتری‌های جداسازی شده از خاک ریزوسفر گندم

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

	Isolates			
Characteristic	***Pseudomonas* sp.**	***P. brassicacearum***	***A. calcoaceticus***	***Exiguobacterium sp.***
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	+	+	-	+

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]



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.

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 محیط‌کشت CAS–آگار نشان داد که چهار گونه *Pseudomonas* sp.، *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 سیدرفور (بیشترین نسبت به ناحیه‌ی قطر هاله) پس از هفت روز متعلق به جدایه *Pseudomonas* sp. با نسبت ۲/۳۵±۰/۳ سانتی‌متر بود. چهار گونه‌ای که توانایی تولید سیدرفور را دارا بودند، از نظر 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 کازئین 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 ۰/۲۲ ± ۱/۴ و ۱/۱۶±۰/۱ سانتی‌متر بود (شکل۳).

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 شاختار بیوفیلم به چاهک

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

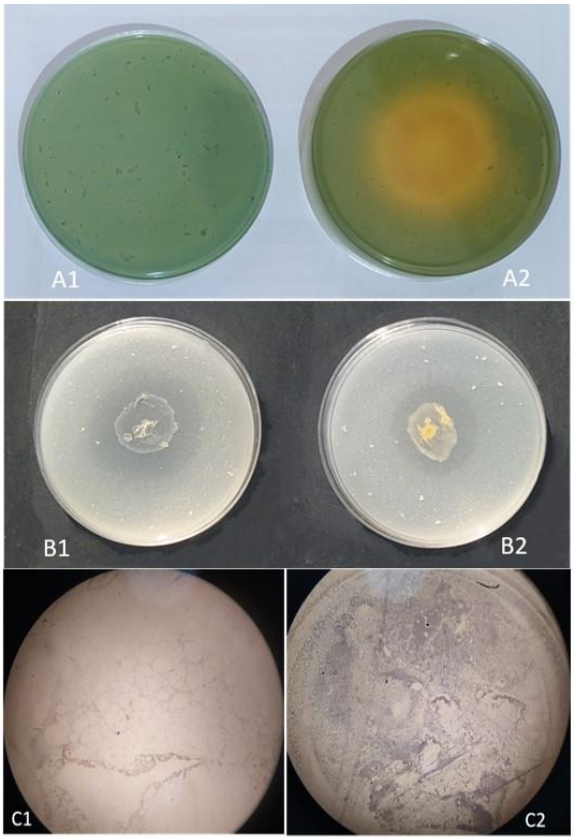
می‌باشد. ساختار بیوفیلم در باکتری *P. brassicacearum* دارای بیشترین میزان تراکم و گسترش بود. هم‌چنین کمترین میزان تراکم و گسترش بیوفیلم در بین گونه‌ها مربوط به گونه *A. calcoaceticus* بود. به منظور ارزیابی کمی میزان توانایی جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم از اسید استیک ۳۰ درصد در طول موج ۵۵۰ نانومتر استفاده شد. با مقایسه میانگین ها در بین گونه‌های مورد استفاده، گونه‌های *P. brassicacearum* و *Pseudomonas* sp. به ترتیب با میانگین ضریب جذب ۰/۱۳۹ و ۰/۱۰۹ در طول موج ۵۵۰ نانومتر بیشترین میزان تولید بیوفیلم را نشان دادند. هم‌چنین باکتری‌های *Exiguobacterium* sp. و *A. calcoaceticus* به ترتیب دارای میانگین ضریب جذب ۰/۰۶۹ و ۰/۰۶۱ بودند (جدول ۲و۳).

بررسی حرکت توده‌ای جدایه‌های باکتری

بررسی میزان حرکت توده‌ای جدایه‌ها روی محیط‌کشت NA ۰/٦ درصد نشان داد که جدایه‌ها از نظر سرعت تحرک و نحوه حرکت با هم متفاوت و اشکال مختلفی از تحرک را نشان دادند (شکل ٤). بیشترین میزان تحرک در بین جدایه‌ها به ترتیب مربوط به گونه‌های *Pseudomonas* sp. و *P. brassicacearum* با میانگین مقادیر ۳/۰±۳٦/۲ و ۰/۱±۳/۳۳ سانتی‌متر بود (جدول ۲و۳).

آزمون مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه

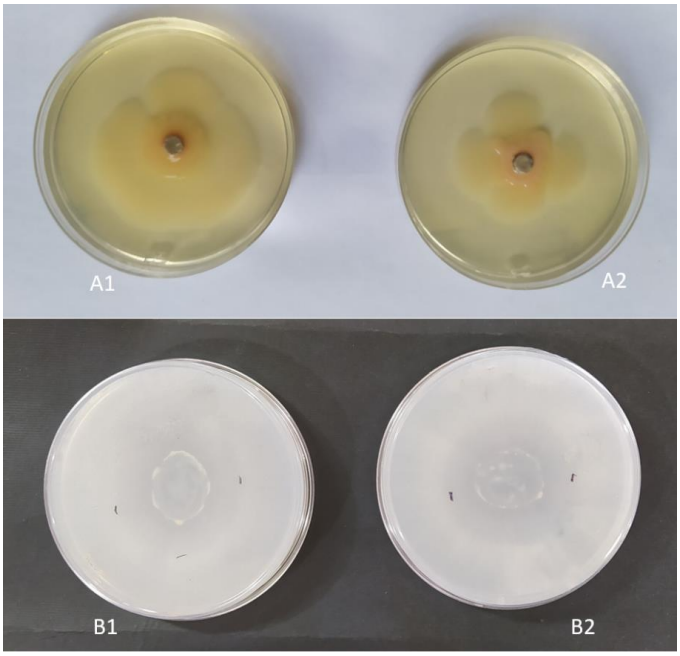
بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در آزمون کشت متقابل حاکی از آن است که هر چهار جدایه باکتریایی قادر به جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بوده و تفاوت معنی‌داری با شاهد نشان دادند. میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر به ترتیب در جدایه *P. brassicacearum* با مقدار ٤۹/۳۳ درصد و کمترین متعلق به جدایه *A. calcoaceticus* با مقدار ۳۲/۳۳ درصد ارزیابی شد (جدول ۲و۳).



شکل ۳- تولید سیدروفور (ظهور هاله نارنجی رنگ) توسط جدایه منتخب باکتریایی بر روی محیط‌کشت CAS-آگار. A1) شاهد، A2) جدایه *Pseudomonas* sp. B1 و B2) تولید پروتئاز (ظهور هاله شفاف) به‌ترتیب 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*.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]



شکل ٤– A) حرکت توده‌ای باکتریایی روی محیط کشت NA ۰/٦ درصد. A1) *Pseudomonas sp.* A2) *Pseudomonas brassicacearum*.B1 و B2: توانایی انحلال فسفات (هاله شفاف اطراف پرگنه باکتری) بر روی محیط کشت Sperber agar توسط *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum*

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	0.00005ns	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 معنی‌داری در سطوح ۵ و ۱ درصد، ns: سطوح غیرمعنی‌دار

* 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
Pseudomonas sp.	5.59a	0.25a	1.73a	0.109b	3.36a	0.042a	1.61a	2.36c	42.33ab
P. brassicacearum	3.36c	0.19b	1.1b	0.139a	3.33a	0.035b	0.41b	1.83d	49.33a
A. calcoaceticus	1.37d	0.07c	0.50c	0.061c	1.63c	0.019c	0.35b	2.30c	39.33bc
Exiguobacterium sp.	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 معنی‌داری با هم ندارند.

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

جدول ٤- بررسی تجزیه واریانس جدایه‌های باکتریایی در شاخص بنیه، سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه 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	0.09ns	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 معنی‌داری در سطوح ٥ و ١ درصد، ns: سطوح غیرمعنی‌دار

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

جدول ٥- بررسی مقایسه میانگین اثر جدایه‌های باکتریایی در شاخص بنیه، سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه 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
Pseudomonas sp.	5.76a	3.90b	0.66b	0.69a	0.07a	0.074a	98a	16.43a	898.87b
P. brassicacearum	4.26b	4.50a	0.76a	0.70a	0.063b	0.076a	96.66b	15.81b	927.44a
A. calcoaceticus	3.56c	3.96b	0.57c	0.67ab	0.056c	0.064bc	95.33c	13.95d	730.59c
Exiguobacterium sp.	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

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

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

تحمل شوری

نتایج میزان تحمل جدایه‌ها به شوری نشان داد از بین چهار جدایه، بجز *A. calcoaceticus* مابقی جدایه‌ها قادر به تحمل سطوح مختلف شوری بودند. به شکلی که جدایه *Exiguobacterium* sp. شوری ٢٠ درصد، جدایه *Pseudomonas* sp. شوری ١٠ درصد و جدایه *P. brassicacearum* شوری ٧ درصد را تحمل کردند.

توانایی جوانه‌زنی و قوه نامیه‌ی بذر

همه جدایه‌ها سرعت جوانه‌زنی بالاتر از شاهد را داشتند. بر پایه‌ی جدول ٥، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای حاوی باکتری و شاهد از نظر درصد جوانه‌زنی بذر وجود داشت. بین جدایه‌ها از نظر شاخص بنیه تفاوت معنی‌داری وجود داشت، به طوری‌که این شاخص از ٩٢٧/٤٠±٤٤ در جدایه *P. brassicacearum* تا ٦٨٦/٣٠ متغیر بود (جدول ٤ و ٥).

بحث

امروزه با توجه به کاربرد بیش از اندازه کودهای شیمیایی و آلودگی-های زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه نهاده‌ها در مدیریت مزارع، هدف اصلی پژوهش حاضر یافتن روش‌های جایگزین مناسب، کارآمد و سازگار با محیط‌زیست می‌باشد (Khosravi *et al*. 2015). از این رو کاربرد PGPR در افزایش رشد کمی و کیفی محصول و مبارزه با عوامل بیماری‌زا به دلیل داشتن خصوصیاتی نظیر در دسترس گیاه قرار دادن عناصر غذایی مانند فسفر، آهن، نیتروژن و گوگرد، تولید هورمون‌های گیاهی، کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی، رقابت با بیمارگر بر سر غذا و مکان، تولید آنزیم‌های تجزیه-کننده دیواره سلولی، ترشح ترکیبات ضدقارچی و القا مقاومت سیستمیک به عنوان روش جایگزین و موثر، مطرح می‌باشد (Bhattacharyya and Jha, 2012; Mirzaei Najafgholi *et al*. 2015; Ashrafi *et al*. 2020; Aeini *et al*. 2018). در تحقیق حاضر ١٠٠ جدایه بومی باکتریایی از خاک ریزوسفر گیاه گندم جداسازی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

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 *Acinetobacter calcoaceticus*، *Pseudomonas brassicacearum* و *Pseudomonas* sp. به عنوان PGPR معرفی گردیده‌اند (Alsharif *et al.* 2020; Presta *et al.* 2016; Vanissa *et al.* 2020; Belimov *et al.* 2007). کلنیزاسیون 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. متاسفانه 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 تثبیت کننده 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 تحرک 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 باکتری های PGPR یک استراتژی مهم در سازگاری برای بقا و توانایی کلنیزاسیون در ریزوسفر گیاهان می‌باشد (Ansari and Ahmad, 2018; Kasim *et al.* 2016). نتایج آزمایش‌های کشت متقابل بر رشد میسلیوم 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 تجزیه کننده 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

میکروبی ترکیبات مهم در افزایش رشد و تحمل تنش‌های محیطی گیاه بوده و سبب ایجاد مقاومت نسبت به بیمارگر می‌شوند (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 می‌سازد (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 جدایه‌های مورد بررسی، هر چهار جدایه باکتریایی در مقایسه با شاهد سبب رشد بیشتر گیاهچه‌های 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.

نتیجه‌گیری کلی

در بررسی حاضر استرین‌های باکتریایی *Acinetobacter calcoaceticus*، *Pseudomonas brassicacearum*، *Exiguobacterium* sp. و *Pseudomonas* sp. به‌عنوان جدایه‌های برتر معرفی شدند. درک نحوه عمل، تنوع و توزیع اکولوژیکی و تعامل آن‌ها با محیط، به منظور بررسی سازگاری این عوامل و موفقیت آن‌ها در افزایش رشد گیاهان در جهت تولیدات گیاهی سالم دارای اهمیت می‌باشد. با توجه به اینکه سویه‌های باکتریایی حاضر کارایی بالای در تولید فاکتورهای موثر در رشد گیاه و هم-چنین فعالیت ضدقارچی دارند بنابراین می‌توان آن‌ها 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 Journa l 9: 28-39. (In Farsi with English abstract).

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. Supressive 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–

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]

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 incogenita* 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, Aeini 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, Elasbali 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, Tarkowská 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.

Vocciante M, Grifoni M, Fusini D, Petruzzelli G, Franchi E. 2022. The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plants evironmental stresses. Applied Sciences 12(3): 1231.

Waller F, Achatz B, Kogel KH. 2007. Analysis of the plant protective potential of the root endopytic fungus *Piriformospora indica* in cereals. Berlin Heidelbeg: Spriger-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.

Zorteaa 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1401.11.2.20.9]