Arch

نشریه پژوهش‌های حفاظت آب و خاک
جلد بیست و ششم، شماره چهارم، ۱۳۹۸
۱۷۳-۱۸۹
http://jwsc.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwsc.2019.16082.3134

خاک ریزوسفری گندم دیمزار به‌عنوان یک منبع مفید برای جداسازی باکتری‌های فلورسنت مقاوم به شوری و خشکی

جمال کریم‌زاده[۱]، *حسینعلی علیخانی[۲] و حسن اعتصامی[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه تهران، [۲]استاد گروه علوم خاک، دانشگاه تهران،
[۳]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۳/۱۹

چکیده

سابقه و هدف: امروزه لزوم پرداختن به تولید محصولات کشاورزی استراتژیک مانند گندم در محیط‌های تحت تنش جهت دست‌یابی به حداکثر پتانسیل برای تأمین غذا ضرورتی انکارناپذیر است. باکتری‌های *سودوموناس فلورسنت* از مهم‌ترین ریزوباکتری‌های مفید خاکزی هستند که با داشتن خصوصیات محرک رشدی متعدد عملکرد گیاهان را افزایش می‌دهند.

مواد و روش‌ها: این پژوهش به‌منظور غربالگری ۱۵ جدایه باکتری *سودوموناس فلورسنت* از خاک ریزوسفری گیاه گندم دیمزار از نظر خصوصیات محرک رشدی مثل توان تولید آنزیم ۱- آمینوسیکلو پروپان-۱- کربوکسیلیک اسید- دآمیناز (ACC- دآمیناز)، ایندول-۳- استیک اسید (IAA)، سیدروفور (Siderophore)، حلالیت فسفات‌های نامحلول معدنی (TCP) و هیدروژن سیانید (HCN) (در شرایط شوری و غیرشور)، مقاومت به شوری و خشکی اعمال شده با پلی‌اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ (PEG 6000) (با پتانسیل‌های اسمزی ۵-، ۱۰- و ۱۵- بار) صورت گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که همه ۱۵ جدایه دارای توانایی رشد در سطوح مختلف خشکی بودند. در سطح شوری ٤ و ۱۰ درصد نمک سدیم کلرید نیز به‌ترتیب ۱۰ و ۲ جدایه توانایی رشد را داشتند. همچنین تمامی این جدایه‌ها توان انحلال TCP و تولید آنزیم ACC- دآمیناز، IAA، سیدروفور و ۹ جدایه توانایی تولید HCN را داشتند. در حضور شوری ٤ درصد نمک همه جدایه‌ها قابلیت انحلال TCP، تنها ۸ جدایه توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز، ۱۳ جدایه توان تولید IAA، ٦ جدایه توان تولید سیدروفور و ٤ جدایه نیز دارای توانایی تولید HCN بودند. در این پژوهش دو جدایه باکتری ریزوسفری (Rh_{10} و Rh_9) به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب و شناسایی شدند. شناسایی توالی ژن 16S rRNA این جدایه‌ها نشان داد که مشابهت نزدیکی با سویه‌های *Pseudomonas helmanticensis* OHA11 و *Pseudomonas baetica* a390 دارند.

* مسئول مکاتبه: halikhan@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری: با توجه به این‌که مجموعه قابل‌ملاحظه‌ای از *سودوموناس‌های فلورسنت* جداسازی‌شده از ریزوسفر گندم دیمزار در این پژوهش توانستند در شوری ٤ درصد به خوبی رشد کنند و به‌علاوه باکتری‌های مورد مطالعه در سطوح مختلف تنش خشکی، در فشار اسمزی ۱۵- بار یا ۳۷/٦۲ درصد پلی‌اتیلن گلیکول (PEG 6000) توانایی رشد داشتند، در ضمن این باکتری‌ها علاوه بر مقاومت به شوری و خشکی قادر به تولید مؤلفه‌های تحریک رشد گیاه (PGPs) در شرایط شور و غیرشور بودند. به‌ویژه این‌که نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که بعضی از جدایه‌های بومی خاک‌های دیمزار کشور توانایی تولید آنزیم ACC- دآمیناز را داشتند البته در تنش شوری ٤ درصد نمک سدیم کلرید این توانایی به‌طور چشمگیری کاهش (٤٦/٦ درصد) یافته و حتی در بعضی از جدایه‌ها تولید این آنزیم متوقف شد. بنابراین بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان بیان کرد که خاک ریزوسفری گندم دیمزارها می‌تواند منبع مناسبی برای جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنت* باشد که برخی از این جدایه‌ها نیز توانایی حفظ ویژگی‌های محرک رشدی خود را در شرایط شور دارند. علاوه بر این، از آن‌جایی‌که در شرایط دیم مصرف کودهای شیمیایی موجب افزایش مضاعف شوری خاک می‌گردد استفاده از چنین باکتری‌هایی (*سودوموناس*‌های حل‌کننده فسفات) می‌تواند برخی از محدودیت‌های تولید گندم در دیمزارها را کاهش دهد. با این وجود کاربرد آن‌ها به عنوان کود زیستی نیازمند آزمون‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای بیش‌تر است.

واژه‌های کلیدی: دیمزار، ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، فسفات‌های نامحلول، مقاوم به شوری و خشکی، ACC- دآمیناز

مقدمه

گندم (*Triticum aestivu*m L.) از سازگارترین گونه‌های غلات در شرایط آب و هوایی متفاوت می‌باشد. این محصول در گروه محصولات استراتژیک و غذای اصلی جوامع بشری می‌باشد (۲۷). تنش‌های مختلف محیطی از جمله دمای بالا، شوری و خشک‌سالی بر تولید گندم تأثیرگذار هستند. در این بین شور شدن خاک‌ها با نرخ افزایش سالانه حدود ۱۰ درصد و خشکی، از مخرب‌ترین تنش‌های محیطی می‌باشند که سبب کاهش شدید سطح زیر کشت، باروری و کیفیت محصولات کشاورزی می‌گردند (٤۱). این در حالی است که برای تأمین نیاز غذایی جمعیت پیش‌بینی‌شده تا سال ۲۰۵۰، افزایش قابل‌توجه (حدود ۵۰ درصد) در عملکرد الزامی به‌نظر می‌رسد (۱۷). برای برآورده نمودن این الزام، مصرف بیش‌تر کودهای شیمیایی و افزایش سطح زیر کشت یک راهکار است، اما استفاده از کودهای شیمیایی در دیمزارها به‌علت افزایش شوری خاک معمول نیست. از آن‌جایی‌که ایران نیز جزو مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان است و با توجه به وجود املاح زیاد در منابع خاک و آب، ارائه راهکارهای مدیریتی در جهت مقابله با این شرایط تنشی ضروری است. بر طبق پژوهش‌های گذشته، استفاده از پتانسیل‌های زیستی در برابر این گونه تنش‌ها از مهم‌ترین راهکارهای موجود است و نقش ریزجانداران در بهبود فراهمی مواد غذایی برای گیاهان رشد کرده تحت تنش‌های محیطی یک استراتژی مهم و مرتبط با شیوه‌های عملیات کشاورزی هوشمند است (۱۸ و ۳۳). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) از جمله منابع زیستی می‌باشند که از طریق روش‌های مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش رشد گیاه می‌گردند (۱۹). از جمله باکتری‌های محرک رشد

www.SID.ir

Archive of SID

می‌توان به *سودوموناس‌های فلورسنت* اشاره نمود. اثرات مستقیم این باکتری‌ها (*سودوموناس‌ها*) با تحریک رشد گیاه از طریق روش‌های تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مانند تولید هورمون‌های گیاهی، تجزیه ACC مازاد توسط آنزیم ACC- دآمیناز، انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی، تسریع در فرآیند معدنی شدن و یا اثرات غیرمستقیم آن‌ها از طریق کنترل عوامل بیماری‌زا از جمله تولید ترکیبات مختلف مانند سیانید هیدروژن، سیدروفور و ... باعث افزایش رشد گیاهان تحت تنش شوری و خشکی می‌گردند (۳۷). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری و خشکی می‌توانند روی توان تحریک رشد گیاهان اثرات منفی داشته باشند؛ بنابراین، باکتری‌هایی باید به‌عنوان کود زیستی استفاده شوند که خود مقاوم به این تنش‌ها باشند تا بتوانند فراهمی عناصر غذایی برای گیاهان تحت شرایط تنشی را نیز افزایش دهند. باکتری‌های مقاوم به تنش‌های محیطی می‌توانند تحمل گیاهان را به خشکی، شوری و کارایی مصرف کودهای فسفره را افزایش دهند (۲۰). علیخانی و همکاران (۲۰۱۷) بیان نمودند که استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه تحت تنش شوری باعث افزایش عملکرد محصول می‌شوند (٤). در گزارشی رای و همکاران (۲۰۱۸) نیز بیان کردند که تلقیح گندم با گونه‌های PGPR مانند *سودوموناس* تحت تنش شوری باعث افزایش انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی، تثبیت نیتروژن مولکولی، تولید سیدروفور، تولید IAA و مصرف ACC می‌شوند (۳۵).

با توجه به این‌که در ایران تنش‌های محیطی به‌ویژه تنش خشکی و شوری خاک ازجمله چالش‌های مهم در تولید بخش کشاورزی محسوب می‌گردند (۲۵). هدف از این پژوهش، غربالگری باکتری‌های *سودوموناس فلورسنت* جداسازی‌شده از خاک ریزوسفری گیاه گندم دیمزار از نظر خصوصیات محرک رشد مثل توان تولید سیدروفور، آنزیم ACC- دآمیناز، IAA، HCN و انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی (در شرایط شور و غیرشور)، مقاومت به شوری و خشکی بود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های فلورسنت: در این مطالعه، ٤٠ جدایه باکتریایی که قبلاً از خاک ریزوسفری گندم دیمزار زنجان و قزوین جداسازی‌شده بودند از بانک ژن گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران تهیه شد. بر اساس ارزیابی فلورسنت از این ٤٠ جدایه، ۱۵ جدایه (Rh_1-Rh_{15}) قابلیت فلورسنت در محیط King B را دارا بودند و به‌عنوان جدایه‌های فلورسنت در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین تحمل به خشکی و شوری و ویژگی‌های محرک رشد گیاه جدایه‌ها: به‌منظور ارزیابی میزان تحمل جدایه‌ها به سطوح مختلف تنش خشکی از توان رشد آن‌ها در محیط کشت NB حاوی غلظت‌های مختلف PEG 6000 استفاده شد (غلظت‌های صفر، ۲۰۰/۲، ۲۹۵/۷ و ۳٦۷/۷ گرم پلی‌اتیلن گلیکول به‌ازای هر لیتر محیط کشت NB اضافه شد که معادل پتانسیل‌های آبی صفر، ۵-، ۱۰- و ۱۵- بار است). میزان رشد جدایه‌ها پس از ٤٨ ساعت با اندازه‌گیری OD محیط رشد آن‌ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر توسط دستگاه Bio-Tek Elx800 USA تعیین و درصد کاهش رشد هر جدایه در سطوح مختلف پلی‌اتیلن گلیکول در مقایسه با میزان رشد همان جدایه در محیط NB بدون پلی‌اتیلن گلیکول محاسبه گردید (۳). علاوه بر این، تحمل جدایه‌ها به سطوح مختلف شوری (چهار و ۱۰ درصد NaCl) با مشاهده و مقایسه آن‌ها با کیفیت کلنی‌های رشد یافته در پلیت‌های شاهد (NA بدون نمک) پس از ٤٨ ساعت

www.SID.ir

Archive of SID

ارزیابی گردید (۳۰). ارزیابی فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز، توان تولید IAA، انحلال کمی فسفات نامحلول معدنی (تری کلسیم فسفات TCP)، سیدروفور و HCN جدایه‌های ریزوسفری به‌ترتیب بر طبق روش پیشنهادی پنروز و گلیک (۲۰۰۳)، پتن و گلیک (۲۰۰۲)، اسپربر (۱۹۵۸)، شئون و نیلنز (۱۹۸۷) و دونت و همکاران (۲۰۰٤) انجام گرفت (۱۱، ۳۱، ۳۲، ٤۰ و ٤۲). به‌منظور توانایی جدایه‌ها در مصرف ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن، ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌ها (جمعیت یکسان شده 5×10^{9} CFU ml^{-1}) با روش قطره‌گذاری در سه سری پتری‌های حاوی محیط‌های DF بدون ACC (شاهد منفی)، محیط DF + سه میلی‌مولار ACC و یکدهم مولار سولفات آمونیوم (شاهد مثبت) کشت داده شدند. محیط‌های تلقیح شده به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. میزان رشد جدایه‌ها مطابق جدول ۱ ارزیابی شد (۵).

جدول ۱- درجه‌بندی توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز.

Table 1. The ability to produce the enzyme ACC- deaminase.

اندازه کلنی رشد یافته روی ACC Size of the colony grown on ACC	میزان رشد باکتری بر روی ACC The amount of bacterial growth on the ACC	درجه توان تولید ACC- دآمیناز Degree of Production Capacity ACC- Deamination
همانند اندازه کلنی در شاهد منفی Like the size of a colony in a negative control	بدون رشد Without growth	0
یک‌سوم اندازه کلنی در شاهد مثبت One -thirds of the size of the colony in the positive control	رشد کم Little growth	+1
دوسوم اندازه کلنی در شاهد مثبت Two -thirds of the size of the colony in the positive control	رشد متوسط Medium growth	+2
همانند اندازه کلنی در شاهد مثبت Like the size of the colony in the positive control	رشد زیاد Grow much	+3
بیش‌ازاندازه کلنی در شاهد مثبت More than colony size in positive control	رشد بسیار زیاد Grow a lot	+4

شناسایی جدایه‌های منتخب: به‌منظور شناسایی جدایه‌های برتر (۲ جدایه)، ابتدا DNA ژنومی آن‌ها با استفاده از کیت جداسازی (Promega, Madison, WI, USA) استخراج گردید. تکثیر ژن 16S rRNA بر طبق شرایط توصیف شده توسط ادواردز و همکاران (۱۹۸۹) صورت گرفت (۱۲).

ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای باکتریایی عمومی 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') و 1429R (5'- TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') تکثیر شد. توالی ژن‌های 16S rRNA بعد از خالص‌سازی محصولات PCR در شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین شد. اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA توسط نرم‌افزارهای Edit sequence (version 5.1) ویرایش گردید و توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR با توالی نوکلئوتیدهای موجود در Gen Bank مقایسه گردید.

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: آزمون‌های انجام شده در این پژوهش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار

www.SID.ir

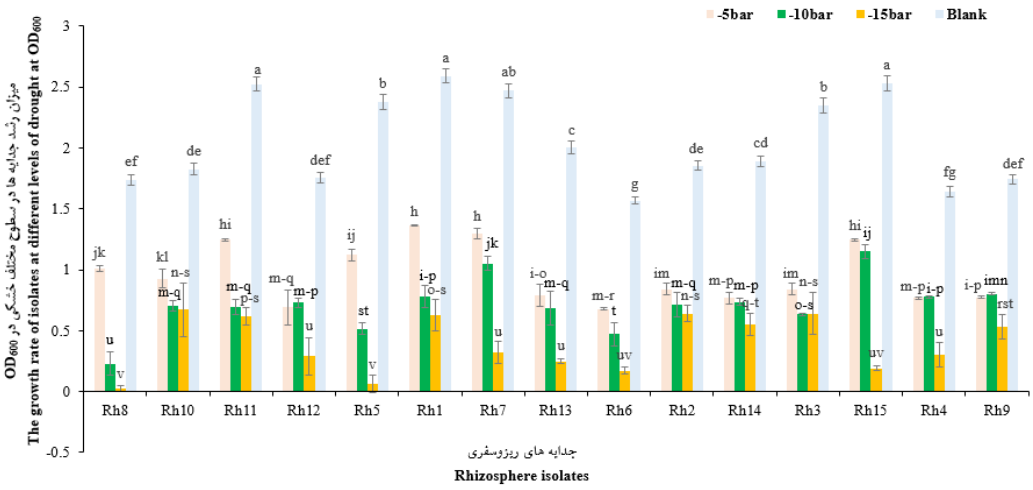
Archive of SID

صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS، مقایسه میانگین‌ها نیز به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد و رسم نمودارها با نرم‌افزار اکسل انجام گرفت.

نتایج و بحث

ارزیابی توان تحمل جدایه‌ها به شوری و خشکی: نتایج این ارزیابی نشان داد که از ۱۵ جدایه، تنها جدایه‌های Rh_3 و جدایه Rh_4 توانایی رشد در ۱۰ درصد نمک سدیم کلرید را داشتند؛ ولی در چهار درصد نمک سدیم کلرید، ۱۰ جدایه شامل Rh_2، Rh_3، Rh_9، Rh_{10}، Rh_{12}، Rh_4، Rh_8، Rh_{13}، Rh_{15} و Rh_{14} قادر به رشد بودند.

در ارزیابی تنش خشکی، تمام ۱۵ جدایه توانایی رشد در سطوح مختلف PEG 6000 را داشتند. جدایه‌های Rh_1، Rh_{15}، Rh_7 و Rh_{11} دارای حداکثر توان رشد در ۵- بار بودند. در ۱۰- بار نیز جدایه Rh_{15} دارای رشد حداکثر در مقایسه با سایر جدایه‌ها بود. در ۱۵- بار جدایه‌های Rh_3، Rh_1، Rh_9، Rh_2، Rh_{11}، Rh_{10} و Rh_{14} دارای بیش‌ترین رشد بودند (شکل ۱). مقایسه میانگین اثرات متقابل آن‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است. جدایه Rh_9 و Rh_{10} متحمل‌ترین جدایه‌ها به خشکی (۱۵- بار) بودند. به‌طورکلی با افزایش درصد PEG 6000 در محیط کشت، توانایی رشد جدایه‌ها کاهش یافت.



شکل ۱- اثرات متقابل خشکی و جدایه‌های باکتریایی ریزوسفری (Rh) روی رشد باکتری. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 1. Interaction of drought and bacterial isolates of rhizosphere (Rh) on growth of bacteria. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P<0.01.

ارزیابی ویژگی‌های محرک رشد جدایه‌ها در حضور و عدم حضور شوری: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی جدایه‌ها، تنش شوری و اثرات متقابل جدایه‌ها و تنش شوری بر صفات محرک رشد در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد. مقایسه میانگین اثرات متقابل آن‌ها در شکل‌های ۲، ۳ و ٤ نشان داده شده است.

بررسی توانایی تولید آنزیم ACC- دآمیناز باکتری‌ها نشان داد که تمام جدایه‌ها در محیط بدون تنش، به‌استثنای باکتری Rh_3 که رشد ضعیفی داشت

www.SID.ir

Archive of SID

دارای حداکثر توان تولید ACC بودند؛ ولی در تنش شوری چهار درصد نمک سدیم کلرید، توانایی تولید ACC جدایه‌ها کاهش داشت. طوری‌که تنها باکتری‌های Rh_{11}، Rh_5، Rh_7، Rh_{13}، Rh_2، Rh_{14}، Rh_{15} و Rh_3 دارای رشد متوسط در محیط دارای ACC بودند که این نشان‌دهنده اثرات منفی شوری بر توان تولیدکنندگی باکتری‌ها است (جدول ۲).

جدول ۲- توانایی تولید آنزیم ACC- دآمیناز و HCN جدایه‌های ریزوسفری (Rh) در حضور و عدم حضور شوری ٤ درصد NaCl.

Table 2. Ability to produce ACC-deaminase and HCN enzymes in rhizosphere isolates (Rh) in the presence and absence of 4% NaCl salinity.

جدایه	ACC- دآمیناز بدون تنش*	ACC- دآمیناز تحت تنش*	HCN بدون تنش**	HCN تحت تنش**
Rh_9	+4	0	+4	+1
Rh_{12}	+4	0	+4	+1
Rh_{11}	+4	+2	+4	+1
Rh_2	+4	+2	+3	0
Rh_5	+4	+2	+3	0
Rh_{10}	+4	0	+3	+1
Rh_6	+4	0	+1	0
Rh_8	+4	0	+1	0
Rh_7	+4	+2	+1	0
Rh_{15}	+4	+2	0	0
Rh_{13}	+4	+2	0	0
Rh_1	+4	0	0	0
Rh_3	+2	+2	0	0
Rh_{14}	+3	+2	0	0
Rh_4	+4	0	0	0

* توضیح اعداد ذکر شده در این جدول برای ACC- دآمیناز در جدول ۱ آمده است.

** اعداد ذکر شده در این جدول به‌ترتیب نشان‌دهنده میزان تولید HCN توسط هر جدایه می‌باشد (تغییر رنگ کاغذ صافی‌ها به رنگ کرم (۱)، قهوه‌ای روشن (۲)، قهوه‌ای تیره (۳) و آجری (٤) به‌ترتیب نشان‌دهنده تولید HCN کم، متوسط، زیاد و خیلی زیاد (با درجه‌بندی ۱ تا ٤) مشخص شد).

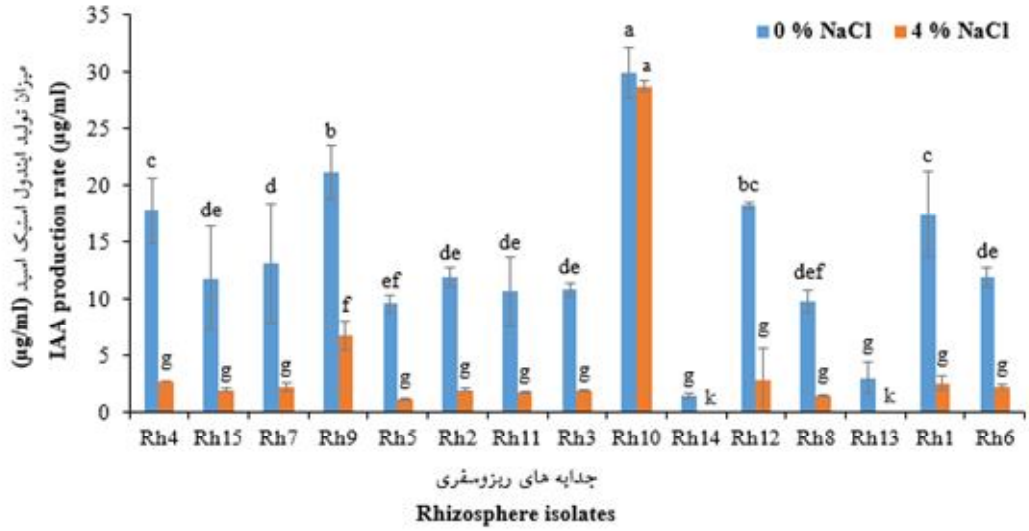
نتایج ارزیابی سیانید هیدروژن نشان داد که ٦۰ درصد جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش توانایی تولید سیانید هیدروژن در شرایط بدون تنش را دارا بودند. بدین‌صورت که جدایه‌های Rh_{12}، Rh_{11} و Rh_9 توانایی تولید HCN با درجه زیاد، Rh_{10}، Rh_2 و Rh_5 با درجه نسبتاً زیاد و Rh_8، Rh_7 و Rh_6 با درجه کم را داشتند ولی در تنش شوری چهار درصد نمک سدیم کلرید تنها جدایه‌های Rh_{10}، Rh_{12}، Rh_9 و Rh_{11} توانایی تولید HCN با درجه کم را داشتند (جدول ۲).

مقایسه میانگین داده‌ها همچنین نشان داد که بیش از ۸٦ درصد جدایه‌ها توانایی تولید IAA در سطح بدون شوری را داشتند. متوسط میزان IAA آزاد شده ۱۳/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و دامنه تولید آن نیز از ۱/٤٤ تا ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود؛ که به‌ترتیب به باکتری‌های Rh_{14} و Rh_{10} مربوط بود.

www.SID.ir

Archive of SID

ولی در تنش شوری چهار درصد نمک سدیم کلرید این توانایی به‌طور چشمگیری کاهش یافت، طوری‌که متوسط میزان IAA آزاد شده ۳/۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و دامنه تولید آن نیز از صفر تا ۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. در این مطالعه جدایه Rh_{10} در شرایط تنشی نیز توانایی بالایی (۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) در تولید IAA نشان داد. شایان ذکر است که جدایه‌های Rh_{13} و Rh_{14} علی‌رغم توانایی تولید IAA در عدم حضور NaCl در سطح چهار درصد سدیم کلرید فاقد توانایی تولید IAA بودند (شکل ۲).



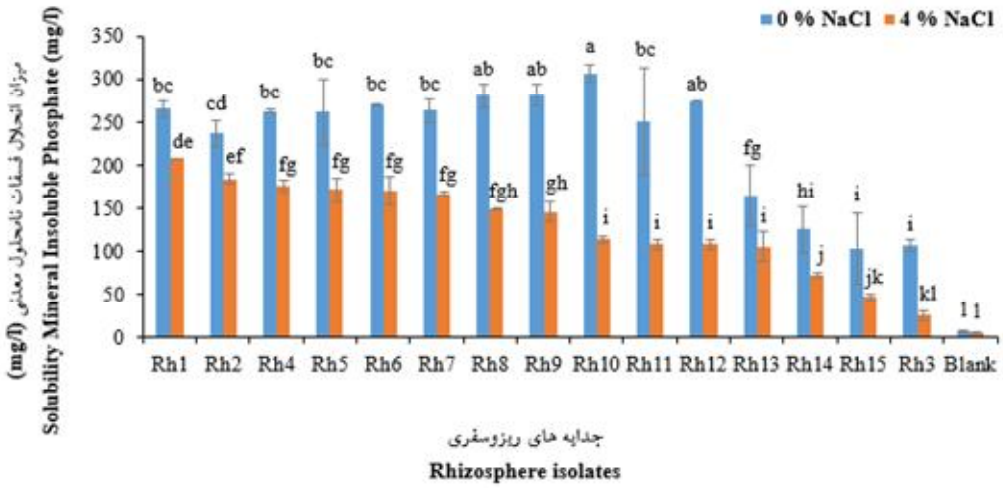
شکل ۲- اثرات متقابل جدایه‌های ریزوسفری (Rh) و شوری بر میزان تولید IAA. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 2. Interactions of Rhizosphere isolates (Rh) and salinity on IAA production. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P<0.01

نتایج ارزیابی انحلال TCP در محیط مایع توسط جدایه‌ها نشان داد که همه جدایه‌ها در شرایط بدون تنش توانایی بالایی در انحلال فسفات داشتند. متوسط میزان فسفر آزاد شده ۲۱۶ میلی‌گرم در لیتر و دامنه تولید آن نیز از ۱۰۳ تا ۳۰۵ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود که به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های Rh_3 و Rh_{10} بود. ولی در تنش شوری چهار درصد نمک سدیم کلرید توانایی حلالیت فسفات کاهش یافت. متوسط میزان فسفر آزاد شده ۱۲۲ میلی‌گرم در لیتر و دامنه تولید آن نیز از ۲۵ تا ۲۰۷ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود و به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های Rh_3 و Rh_1 بود. شایان ذکر است که شوری بر میزان انحلال فسفات جدایه‌ها اثرات منفی داشت. ولی با این وجود تمام جدایه‌ها قادر به انحلال فسفات نامحلول معدنی در محیط تحت تنش بودند (شکل ۳).

www.SID.ir

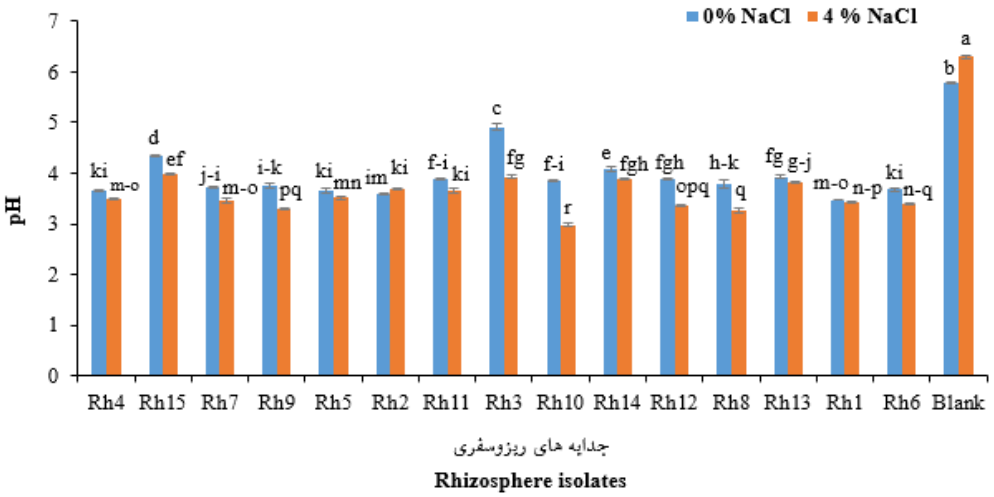
Archive of SID



شکل ۳- اثرات متقابل شوری و جدایه‌های ریزوسفری (Rh) بر میزان انحلال فسفات نامحلول معدنی. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 3. Interactions of salinity and rhizosphere isolates (Rh) on the dissolution of inorganic insoluble phosphate. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P<0.01.

مقایسه pH سوسپانسیون جدایه‌های مختلف با تیمار شاهد (بدون باکتری) نشان داد که تمامی جدایه‌ها موجب کاهش معنی‌دار pH شدند. کم‌ترین و بیش‌ترین کاهش pH در شرایط بدون تنش به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های Rh_3 و Rh_{10} بود؛ اما تحت تنش شوری کم‌ترین و بیش‌ترین کاهش pH مربوط به جدایه‌های Rh_3 و Rh_8 بود که با شاهد بدون تیمار باکتری اختلاف آماری معنی‌داری را نشان دادند. همچنین جدایه‌هایی که دارای حروف معنی‌داری مشترکی بودند از نظر این صفت تفاوت آماری قابل‌ملاحظه‌ای را با یکدیگر نداشتند (شکل ٤).



شکل ٤- اثرات متقابل شوری و جدایه‌های ریزوسفری (Rh) بر pH سوسپانسیون. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Figure 4. Interactions of salinity and rhizosphere isolates (Rh) on pH of suspension. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P<0.01.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج حاصل از ارزیابی توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های *سودوموناس فلورسنت* مورد مطالعه در سطح بدون تنش نشان داد که ۹۳/۳ درصد جدایه‌ها توانایی تولید سیدروفور در مدت ۷۲ ساعت را داشتند. بیش‌ترین و کم‌ترین قطر هاله (HD) به قطر کلنی (HC) به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های Rh_{14} (HD/HC=2) و Rh_3 (فاقد توانایی تولید سیدروفور) بود. این در حالی است که توانایی جدایه‌ها در سطح ٤ درصد نمک سدیم کلرید در تولید هاله‌های نارنجی رنگ (تولید سیدروفور) در محیط CAS کاهش یافت. ولی با این وجود جدایه‌های Rh_9، Rh_{10}، Rh_{15}، Rh_{13}، Rh_{14} و Rh_1 توانایی قابل‌ملاحظه‌ای در تولید سیدروفور در محیط‌های تنشی را داشتند که بیش‌ترین قطر هاله به قطر کلنی در این بین مربوط به جدایه Rh_{13} بود (جدول ۳).

جدول ۳- اثرات متقابل جدایه‌های ریزوسفری (Rh) و شوری بر میزان تولید سیدروفور. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک، به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد ندارند.

Table 3. Interactions of rhizosphere isolates (Rh) and salinity on the amount of Siderophore production. Means followed by the same superscript letters are not significantly different according to Duncan's multiple range test at P<0.01.

جدایه Isolate	سیدروفور (HD/HC) بدون تنش Siderophore (HD / HC) without stress	سیدروفور (HD/HC) تحت تنش Siderophore (HD / HC) under stress
Rh_4	1.35 ± 0.04^{cd}	0^{j}
Rh_{15}	1.36 ± 0.085^{cd}	0.43 ± 0.15^{hi}
Rh_7	1.06 ± 0.55^{f}	0^{j}
Rh_9	1.74 ± 0.056^{b}	0.53 ± 0.21^{hi}
Rh_5	1.12 ± 0.049^{f}	0^{j}
Rh_2	1.1 ± 0.031^{f}	0^{j}
Rh_{11}	1.51 ± 0.055^{c}	0^{j}
Rh_3	0^{j}	0^{j}
Rh_{10}	1.51 ± 0.30^{c}	0.33 ± 0.12^{i}
Rh_{14}	2.16 ± 0.058^{a}	0.76 ± 0.12^{g}
Rh_{12}	1.1 ± 0.017^{f}	0^{j}
Rh_8	1.13 ± 0.053^{ef}	0^{j}
Rh_{13}	1.33 ± 0.042^{cde}	1.2 ± 0.35^{def}
Rh_1	1.53 ± 0.046^{c}	0.56 ± 0.12^{h}
Rh_6	1.07 ± 0.25^{f}	0^{j}
Blank	0^{j}	0^{j}

شناسایی جدایه‌های برتر: در این پژوهش دو جدایه باکتری ریزوسفری به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب و شناسایی شدند. شناسایی ژن 16S rRNA این جدایه‌ها نشان داد که توالی‌های ژن 16S rRNA دو جدایه ریزوسفری مشابهت نزدیکی با سویه‌های *Pseudomonas helmanticensis* OHA11 و *Pseudomonas baetica* a390 داشت.

به خوبی مشخص شده است که ریزوسفر و اندوسفر گیاهان حاوی ریزجانداران محرک رشد گیاهی می‌باشند که تحت شرایط تنش‌های مختلف

www.SID.ir

Archive of SID

محیطی موجب افزایش رشد و عملکرد گیاهان می‌شوند (۱۵). اخیراً تأیید شده است که سویه‌های باکتریایی متحمل به تنش‌های محیطی (خشکی و شوری) با فعالیت ACC- دآمیناز و تولید IAA برای کاهش تنش شوری در گیاهان بسیار دارای اهمیت می‌باشند (۸). در این پژوهش مجموعه قابل‌ملاحظه‌ای از جدایه‌های فلورسنت از خاک ریزوسفری گیاه گندم دیمزار جداسازی شدند. این باکتری‌ها علاوه بر مقاومت به شوری و خشکی توانایی تولید مؤلفه‌های تحریک رشد گیاه در شرایط شور و غیرشوری را داشتند. این باکتری‌ها توانستند در شوری چهار درصد به خوبی رشد کنند. ویلی و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که PGPR توانایی رشد در ۸ درصد نمک سدیم کلرید را دارند (٤٥). در مطالعات گذشته نشان داده شده است که باکتری‌ها از طریق روش‌های مختلف به شوری مقاوم می‌شوند (به‌عنوان مثال از طریق دفع Na^+) (١٤). باکتری‌های مورد مطالعه در این پژوهش توانستند به خوبی در سطوح مختلف تنش خشکی (PEG 6000) رشد کنند (جدایه‌ها توانایی رشد در ۱۵- بار یا ۳۷/٦۲ درصد پلی اتیلن گلیکول را داشتند). باکتری‌های متحمل به شرایط تنشی در خاک به‌دلیل تأثیرگذاری بر چرخه عناصر، تجزیه ماده آلی، بهبود ساختمان خاک، افزایش باروری و حاصلخیزی خاک باعث بهبود ویژگی‌های خاکی می‌شوند. در مطالعات قبلی نیز به گزارش‌های متعددی از رشد باکتری‌های PGPR تحت تنش خشکی اشاره شده است. به‌عنوان مثال در پژوهشی رحمان و ناتیال (۲۰۰۲) گزارش کردند که سویه‌هایی از باکتری‌های ریزوبیا[1] توانایی تحمل ٤٥ درصد پلی‌اتیلن گلیکول را داشتند (۳۸). راوین کومار و همکاران (۲۰۱۲) نیز نشان دادند که سویه‌های *سودوموناس* توانایی رشد در ٤۰/۵ درصد پلی‌اتیلن گلیکول را دارند (۳٤). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که باکتری‌های مقاوم به شوری عمدتاً در برابر تنش کم‌آبی هم مقاوم هستند، زیرا اثرات هر دو عامل بر روی میکروارگانیسم‌ها یکسان می‌باشد (١٤).

در این پژوهش دو جدایه برتر به‌صورت *Pseudomonas helmanticensis* OHA11 و *Pseudomonas baetica* a390 شناسایی شدند. در یک مطالعه قبلی رامیرز و همکاران (۲۰۱٤) و لوپز و همکاران (۲۰۱۲) نیز باکتری‌هایی با این جنس را به‌عنوان باکتری‌های مقاوم به شوری و توانمند در تولید مؤلفه‌های تحریک رشد گیاه مثل انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی و IAA گزارش کردند (۲۳ و ۳٦).

اکثر باکتری‌های ارزیابی‌شده در این پژوهش توان تولید مؤلفه‌های تحریک رشد گیاه در حضور و عدم حضور نمک NaCl را داشتند. به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که شوری می‌تواند مقدار تولید این ویژگی‌ها را تحت‌تأثیر قرار دهد. یکی از راهکارهای گیاهان برای مقابله با بروز تنش‌های محیطی تولید ACC می‌باشد (١٦). گیاهان هنگامی که در معرض تنش‌های محیطی قرار می‌گیرند میزان اتیلن تنشی در آن‌ها افزایش پیدا می‌کند. تولید مقدار زیاد اتیلن منجر به کاهش رشد گیاه و به‌ویژه رشد ریشه‌ها می‌گردد. در چنین شرایطی باکتری‌ها می‌توانند از طریق آنزیم ACC- دآمیناز اثرات ناشی از اتیلن را کاهش دهند. به این صورت که باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری، ACC را که پیش‌نیاز تولید اتیلن است به‌وسیله آنزیم ACC- دآمیناز تجزیه نموده و در نتیجه از تجمع اتیلن تنشی در سیستم ریشه گیاه جلوگیری می‌کنند که باعث ایجاد سیستم‌های ریشه‌ای کارا و سالم در گیاه می‌گردد (٢٤). در پژوهشی بر روی ارزن انگشتی، چاندرا و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که مایه‌کوبی باکتری‌های محرک رشد مانند

1- Rhizobia

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌های *سودوموناس* تحت شرایط تنشی منجر به افزایش فعالیت ACC- دآمیناز می‌شود که از این طریق اثرات تنشی وارده بر گیاه کاهش یافته و باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌گردد (۱۰). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که بعضی از جدایه‌های بومی خاک‌های دیمزار کشور توانایی تولید این آنزیم را دارا هستند ولی در تنش شوری چهار درصد نمک سدیم کلرید این توانایی به‌طور چشمگیری کاهش (٤٦/٦ درصد) یافته و حتی در بعضی از جدایه‌ها تولید این آنزیم متوقف شد. نیلام و همکاران (۲۰۱۰) نیز در گزارشی نشان دادند که با افزایش سطوح شوری توانایی تولید ACC- دآمیناز برخی از سویه‌های باکتریایی به‌شدت کاهش پیدا می‌کند که نتیجه اثرات شوری بر فعالیت جدایه‌های باکتریایی می‌باشد (۲٦). در پژوهشی دیگر تحت شرایط تنشی که بر روی ۱۸ جدایه باکتریایی صورت گرفت نتایج به‌دست آمده نشان داد که تنها ۱٦ درصد از جدایه‌های باکتریایی، توانایی تولید آنزیم ACC- دآمیناز در شرایط تنش شوری را داشتند (۲۹).

در پژوهش صورت گرفته بیش از ۸٦ درصد جدایه‌ها توانایی تولید IAA را داشتند. متوسط میزان IAA آزاد شده ۱۳/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و دامنه تولید آن نیز از ۱/٤٤ تا ۳۰ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. احمد و همکاران (۲۰۰۵) نیز در گزارشی بیان کردند که اکسین تولید شده توسط *سودوموناس‌ها* در دامنه ۵/۳٤ تا ۵۳/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود (۲). از جمله صفات مهم محرک رشد باکتری‌ها برای گیاهان تولید IAA است، به‌طوری‌که این فیتوهورمون سیستم ریشه گیاه را توسعه داده و جذب مواد غذایی را بهبود می‌بخشد (۱۳). در پژوهشی بارناوال و همکاران (۲۰۱۷) بیان کردند که تلقیح گیاه گندم با باکتری‌های محرک رشد از طریق تولید IAA منجر به افزایش رشد و عملکرد این گیاه تحت شرایط تنشی می‌شوند (۷). مطالعات گذشته نشان می‌دهد که در محیط‌های شور میزان تولید IAA کاهش پیدا می‌کند. در این مطالعه، در تنش شوری چهار درصد نمک سدیم کلرید این توانایی به‌طور چشمگیری کاهش یافت به‌طوری‌که متوسط میزان IAA آزاد شده ۳/۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر و دامنه تولید آن نیز از صفر تا ۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. جدایه Rh_{10} در شرایط تنشی نیز تغییرات زیادی در میزان تولید IAA نشان نداد. ورانان و همکاران (۲۰۱٤) نیز در گزارشی بیان کردند که برخی از جدایه‌ها تحت تنش شوری توانایی تولید IAA آن‌ها تغییرات چندانی پیدا نکرد (٤٦). همچنین در پژوهشی که تحت تنش شوری بر روی ۱۰٦ جدایه باکتریایی صورت گرفت نتایج به‌دست آمده نشان داد که تنها ۳۵/۵ درصد از گونه‌های باکتریایی پتانسیل تولید IAA را دارند (٤٤).

به‌دلیل این‌که بخش بسیار زیادی از فسفر در خاک تثبیت می‌گردد، کاربرد ریزجانداران می‌تواند در فراهمی این عنصر بسیار دارای اهمیت باشد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که تحت تنش شوری جذب فسفر توسط گیاهان کاهش پیدا می‌کند (۱٤). در پژوهشی نشان داده شد که باکتری‌های PGPR توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی در هر دو محیط (بدون شوری و ۸ درصد نمک NaCl) را دارند ولی تحت شرایط تنشی این توانایی کاهش یافت (٤۵). باکتری‌های جداسازی شده در این پژوهش نشان دادند که توانایی بالایی در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی تحت شرایط تنشی را دارند. به‌طوری‌که متوسط میزان فسفر آزاد شده ۱۲۲ میلی‌گرم در لیتر و دامنه تولید آن نیز از ۲۵ تا ۲۰۷ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود. نوری و سعود (۲۰۱۲) در پژوهشی نشان دادند که تمامی جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* مورد مطالعه قادر به انحلال تری کلسیم فسفات بودند (۲۸). جدایه‌هایی که توانایی بالایی در

www.SID.ir

Archive of SID

انحلال تری کلسیم فسفات داشتند باعث کاهش pH محیط کشت (تا حدود pH=۳/۲) در مقایسه با شاهد بدون باکتری (که دارای pH=٦/۹) شدند. در پژوهش‌های دیگر نیز کاهش pH محیط کشت مایع باکتری‌های حل‌کننده فسفات گزارش شده است (۹). در یک مطالعه قبلی تومار (۱۹۹۷) در اندازه‌گیری فسفر محلول و pH آن در محیط مایع حاوی TCP مشاهده کرد که با کاهش pH محیط، انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی افزایش یافت (٤۳). ال- آزیم و همکاران (۲۰۰۷) نیز بیان کردند، تمام جدایه‌هایی که توانایی انحلال فسفات را دارند قادر به تولید اسیدهای آلی بوده و موجب کاهش pH محیط می‌شوند (۱۳).

آهن یک عنصر ریزمغذی و جزئی از ساختار بسیاری از آنزیم‌هایی می‌باشد که در فرآیندهای بیوشیمیایی از جمله تنفس، فتوسنتز و تثبیت نیتروژن دخیل هستند. فراهمی آهن در خاک‌های آهکی و شور بسیار پایین می‌باشد (۱). باکتری‌های PGPR فلورسنت اغلب، توان تولید سیدروفورها را دارند. سیدروفورها ترکیبات کوچک و کلات‌کننده آهن می‌باشند که باعث افزایش فراهمی آهن برای گیاهان می‌شوند (۲۱). با این‌حال توانایی باکتری‌ها برای افزایش قابلیت دسترسی آهن و سایر عناصر میکرو مانند Zn، Mn و Cu برای گیاهان هنوز به خوبی مشخص نشده است. نتایج به‌دست آمده از آزمون تولید سیدروفور نشان داد که سویه‌های *سودوموناس فلورسنت* مورد استفاده در این پژوهش قابلیت تولید سیدروفور را دارا بودند. در گزارشی رسولی‌صدقیانی و همکاران (۲۰۰۵) نیز نشان دادند که برخی از جدایه‌های *سودوموناس* توانایی تولید سیدروفور را دارا بودند (۳۷). در شرایط تنش شوری چهار درصد سدیم کلرید توان تولید سیدروفور به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش یافت. ویسکاردی و همکاران (۲۰۱٦) نیز نشان دادند که از ۱۰٦ جدایه مورد ارزیابی تنها ۲۰ درصد از آن‌ها توانستند تحت تنش شوری سیدروفور تولید کنند (٤٤). همچنین آرگاندونا و همکاران (۲۰۱۰) نیز در گزارشی بیان کردند که تحت‌تأثیر شوری تولید سیدروفور به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای کاهش پیدا می‌کند (٦).

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که ٦۰ درصد جدایه‌ها توان تولید HCN را داشتند. ولی در شرایط تنش شوری چهار درصد سدیم کلرید تولید HCN کاهش یافت. به خوبی ثابت شده است که گیاهان وقتی در معرض شوری قرار می‌گیرند حساسیت آن‌ها به بیماری‌های گیاهی افزایش پیدا می‌کند. یکی از متابولیت‌های ثانویه مهم در ریزجانداران که از گلایسین و پرولین به وجود می‌آید سیانید هیدروژن می‌باشد. اسچیپرز و همکاران (۱۹۸۷) در گزارشی بیان نمودند که این ترکیبات علاوه بر اثرات سمی برای قارچ‌های بیماری‌زا منجر به ایجاد ریشه‌های مویین نیز می‌شوند (۳۹). در پژوهشی دیگر توسط کرمر و سوئیسی (۲۰۰۱) نشان داده شد که از یک مجموعه شامل ۲۰۰۰ جدایه باکتری حدود ۳۲ درصد از آن‌ها توانایی تولید HCN را داشتند (۲۲).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به این‌که مجموعه فراوانی از *سودوموناس‌های فلورسنت* جداسازی‌شده از ریزوسفر گندم دیمزار در این پژوهش توانستند در شوری چهار درصد به خوبی رشد کنند و به‌علاوه باکتری‌های موردمطالعه در سطوح مختلف تنش خشکی، در فشار اسمزی ۱۵- بار یا ۳۷/٦۲ درصد پلی‌اتیلن گلیکول ٦۰۰۰ (PEG 6000) توانایی رشد داشتند، در ضمن این باکتری‌ها علاوه بر مقاومت به شوری و خشکی قادر به تولید مؤلفه‌های تحریک رشد گیاه در شرایط شور و غیرشوری بودند. به‌ویژه این‌که نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان

www.SID.ir

Archive of SID

داد که بعضی از جدایه‌های بومی خاک‌های دیمزار کشور توانایی تولید آنزیم ACC- دآمیناز را داشتند البته در تنش شوری چهار درصد نمک سدیم کلرید این توانایی به‌طور چشمگیری کاهش (٤٦/٦ درصد) یافته و حتی در بعضی از جدایه‌ها تولید این آنزیم متوقف شد.

بنابراین براساس نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که خاک ریزوسفری گندم دیمزارها می‌تواند منبع مناسبی برای جداسازی باکتری‌های فلورسنت باشد که برخی از این جدایه‌ها نیز توانستند ویژگی‌های محرک رشدی خود را در حضور نمک حفظ کنند. علاوه بر این، از آن‌جایی‌که در شرایط دیم مصرف کودهای شیمیایی موجب افزایش مضاعف شوری خاک می‌گردد استفاده از چنین باکتری‌هایی (*سودوموناس‌های* حل‌کننده فسفات) می‌تواند برخی از محدودیت‌های تولید گندم در دیمزارها را کاهش دهد. با این وجود کاربرد آن‌ها به‌عنوان کود زیستی نیازمند آزمون‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای بیش‌تر است.

به‌طورکلی براساس نتایج به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان نتیجه‌گیری کرد که اثرات منفی شوری بر روی توانایی تولید مؤلفه‌های تحریک رشد گیاه جدایه‌ها به‌ترتیب زیر است:

P- Solubilizing < IAA < ACC deaminase < Siderophore < HCN

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور در قالب یک طرح پژوهشی به شماره ٩٤٠١٧٢٣٥ انجام شده است که بدین‌وسیله سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

1. Abbas, G., Saqib, M., and Akhtar, J. 2015. Interactive effects of salinity and iron deficiency on different rice genotypes. J. Plant Nutr. Soil Sci. 178, 306-311. doi: 10.1002/jpln.201400358.
2. Ahmad, F., Ahmad, L., and Saghir, M. 2005. Indol acetic acid production by the indogenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of Tryptophan. Turk. J. Bio. 29: 29-34.
3. Ali, S.Z., Sandhya, V., and Rao, L.V. 2014. Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide- producing *fluorescent Pseudomonas* sp. Ann. Microb. 64: 493-502.
4. Alikhani, H.A., Etesami, H., and Mohammadi, L. 2017. Evaluation of the effect of rhizosphere and non-rhizosphere phosphate solvent on improvement of wheat growth indices under salinity and drought stress. J. Soil Biol. 6: 1/1397. (In Persian)
5. Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N., and Antoun, H. 2003. Potential Use of Native Rhizobia Strains as Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Effects of Selected Strains on growth Characteristics of Wheat, Corn and Alfalfa. University of Tehran. Karaj. (In Persian)
6. Argandona, M., Nieto, J.J., Iglesias-Guerra, F., Caldero´n, M.I., Garcı´a Estepa, R., and Vargas, C. 2010. Interplay between iron homeostasis and the osmotic stress response in the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. Appl. Environ. Microb. 76: 3575-3589.
7. Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S.S., Pandey, A., Chanotiya, C.S., and Kalra, A. 2017. Plant growth promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. Physiol. Plant. 161: 502-514.
8. Barra, P.J., Inostroza, N.G., Acuña, J.J., Mora, M.L., Crowley, D.E., and Jorquera, M.A. 2016. Formulation of bacterial consortia from avocado (*Persea Americana*

www.SID.ir

Archive of SID

Mill.) and their effect on growth, biomass and superoxide dismutase activity of wheat seedlings under salt stress. Appl. Soil Ecol. 102: 80-91.

9. Bar-Yosef, B., Rogers, R.D., Wolfarm, J.H., and Richman, E. 1999. *Pseudomonase cepaciemediated* rock phosphate solubilization in kaolinite and montmorilloni suspension. Soil. Sci. Soc. Am. J. 63: 1703-1708.
10. Chandra, D., Srivastava, R., Glick, B.R., and Sharma, A.K. 2018. Drought-Tolerant Pseudomonas spp. Improve the Growth Performance of Finger Millet (*Eleusine coracana* (L.) *Gaertn*.) Under Non-Stressed and Drought-Stressed Conditions. Pedosphere. 28: 227-240.
11. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., and Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in Chamaecytisus proliferus (tagasaste), a forage treeshrub legume endemic to the Canary Island. Plant Soil. 266: 261-272.
12. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., and Bottger, E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research. 17: 7843-7853.
13. El-Azeem, SAMA., Mehana, TA., and Shabayek, A.A. 2007. Some plant growth promoting traits of rhizobacteria isolated from Suez Canal region, Egypt. African Crop Sci. Conference Processing. 8: 1517-25.
14. Etesami, H., and Beattie, G.A. 2017. "Plant-microbe interactions in adaptation of agricultural crops to abiotic stress conditions," in Probiotics and Plant Health, eds V. Kumar, M. Kumar, S. Sharma, and R. Prasad. Singapore, Springer. Pp: 163-200.
15. Etesami, H., and K. Maheshwari, D. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects (Review). Ecotoxicology and Environmental Safety. 156: 225-246.
16. Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., and McConkey, B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Crit. Rev. Plant. Sci. 26: 227-242.
17. Godfray, H.C.J., Beddington, J.R., Crute, I.R., Haddad, L., Lawrence, D., Muir, J.F., Pretty, J., Robinson, S., Thomas, S.M., and Toulmin, C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. Science. 327: 812-818.
18. Hamilton, C.E., Bever, J.D., Labb´e, J., Yang, X.H., and Yin, H.F. 2016. Mitigating climate change through managing constructed microbial communities in agriculture. Agr. Ecosystem Environ. 216: 304-308.
19. Khalid, A., Arshad, M., and Zahir, Z.A. 2006. Phytohormones: Microbial production and applications, P 207-220. In: Uphoff, N., A.S. Ball, E. Fernandes, H. Herren, O. Husson, M. Laing, C. Palm, J. Pretty, P. Sanchez, N. Sanginga and J. Thies (eds.), Biological Approaches to Sustainable Soil System, Florida, USA.
20. Khan, M.S., Zaidi, A., and Ahmad, E. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms, Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer. Pp: 31-62.
21. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. Nature. 286: 885-886.
22. Kremer, R.J., and Souissi, T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Curr Microbiol. 43: 182-186.
23. López, J.R., Diéguez, A.L., Doce, A., De la Roca, E., De la Herran, R., Navas, J.I., Toranzo, A.E., and Romalde, J.L. 2012. Pseudomonas baetica sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, Dicologlossa cuneata (Moreau). Int. J. System. Evol. Microbiol. 62: 4. 874-882.
24. Mayak, S. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiol. Biochem. 42: 565-572.

www.SID.ir

Archive of SID

25.Moameni, A. 2010. Geographic Distribution and Salinity Levels of Iranian Soil Resources. Soil Research, 3: 1. (In Persian)
26.Neelam, T., and Meenu, S. 2010. Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. J. Plant Interactions. 5: 1. 51-58.
27.Noor Mohammad, G., Syadat, A., and Kashani, A. 2010. The first volume of cereal crops. Shahid Chamran. Uni. Public. Pp: 25-33. (In Persian)
28.Noori, M.S.Sh., and Saud, H.M. 2012. Potential Plant Growth-Promoting Activity of *Pseudomonas* sp. Isolated from Paddy Soil in Malaysia as Biocontrol Agent. Plant Pathology and Microbiology. 3: 1-4.
29.Orhan, F. 2016. Alleviation of salt stress by halotolerant and halophilic plant growth-promoting bacteria in wheat (*Triticum aestivum*). Brazil. J. Microbial. 47: 621-627.
30.Orhan, F., and Gulluce, M. 2015. Isolation and characterization of salt-tolerant bacterial strains in salt-affected soils of Erzurum, Turk. Geomicrobiol. J. 32: 521-529.
31.Patten, C.L., and Glick, B.R. 2002. Role of Pseudomonas putida indole acetic acid in development of host plant root system. Appl. Environ Microbiol. Pp: 3795-3801.
32.Penrose, D.M., and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum. 118: 10-15.
33.Pereg, L., and McMillan, M. 2015. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. Soil Biol. Biochem. 80: 349-358.
34.Praveen Kumar, G., Kishore, N., Leo Daniel Amalraj, E., Mir Hassan Ahmed, S.K., Rasul, A., and Desai, S. 2012. "Evaluation of *fluorescent Pseudomonas sp*. with single and multiple PGPR traits for plant growth promotion of sorghum in combination with AM fungi," Plant Growth Regulation 67: 2. 133-140.
35.Rai, A., Cherif, A., Cruz, C., and Nabti, E. 2018. Extracts from Marine Macroalgae and Opuntia cus-indica Cladodes Enhance Halotolerance and Enzymatic Potential of Diazotrophic Rhizobacteria and Their Impact on Wheat Germination under Salt Stress. Pedosphere, 28: 241-254.
36.Ramírez-Bahena, M.H., Cuesta, M.J., Flores-Félix, J.D., Mulas, R., Rivas, R., Castro-Pinto, J., Brañas, J., Mulas, D., González-Andrés, F., Velázquez, E., and Peix, Á. 2014. *Pseudomonas helmanticensis sp*. nov., isolated from forest soil. Int. J. System. Evol. Microbial. 64: 7. 2338-2345.
37.Rasouli Sadaghiani, M.H., Kavazi, K., Rahimian, H., Malakouti, M.J., and Asadi, H. 2005. Population Density and Identification of Fluorescent Pseudomonads Associated with Rhizosphere of Wheat. J. Soil Water Sci. 19: 224-234. (In Persian)
38.Rehman, A., and Nautiyal, C.S. 2002. Effect of drought on the growth and survival of the stress-tolerant bacterium Rhizobium sp. NBRI2505 sesbania and its drought sensitive transposon Tn5 mutant. Current Microbiology. 45: 5. 368-377.
39.Schippers, B., Bakker, A.W., and Bakker, A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann. Rev. Phytopathology. 25: 339-59.
40.Schwyn, B., and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry. 160: 47-56.
41.Shahbaz, M., and Ashraf, M. 2013. Improving salinity tolerance in cereals. Crit. Rev. Plant Sci. 32: 237-249.
42.Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust. J. Agric. Res. 9: 778-781.
43.Tomar, R.K.S. 1997. Effect of phosphate solubilizing bacteria and farmyard manure on the yield of blackgram (*Phaseolus mungo*). Ind. J. Agron. 38: 131-133.

www.SID.ir

Archive of SID

44. Viscardi, S., Ventorino, V., Duran, P., Maggio, A., De Pascale, S., Mora, M.L. and Pepe, O. 2016. Assessment of plant growth promoting activities and abiotic stress tolerance of Azotobacter chroococcum strains for a potential use in sustainable agriculture. J. Soil Sci Plant Nutr. 16: 3. 848-863.
45. Willey, J.M., Sherwood, L.M., and Woolverton, C.J. 2009. Prescott's principles of microbiology. New York: McGraw-Hill.
46. Woranan, N., Natthawoot, P., Aphidech, S., Narongrit, S., Pawinee, S., and Apinya, P. 2014. Salt-tolerant and plant growth promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. J. Plant Interactions. 9: 1. 379-387.

www.SID.ir

Arc

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Water and Soil Conservation, Vol. 26(4), 2019
http://jwsc.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jwsc.2019.16082.3134

Rhizosphere soil of dryland wheat as a useful source for isolating salinity and drought resistance Fluorescent Pseudomonas bacteria

J. Karimzadeh[1], *H.A. Alikhani[2] and H. Etesami[3]
[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, University of Tehran, [2]Professor, Dept. of Soil Science, University of Tehran, [3]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, University of Tehran
Received: 12.27.2018; Accepted: 06.09.2019

Abstract

Background and Objectives: Nowadays, the necessity of dealing with strategic agricultural production such as wheat in stressful environments is an indispensable necessity for achieving maximum potential for food supply. Fluorescent Pseudomonads bacteria are one of the most important group of beneficial soil rhizobacteria that increase the yield of plants with numerous growth-promoting properties

Materials and Methods: This research was carried out to screen 15 Fluorescent Pseudomonads isolates, isolated from rhizosphere soil of dry farming wheat, in terms of PGP traits such as 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, indole-3-acetic acid (IAA), Siderophore, solubilization of inorganic insoluble phosphates (Tricalcium phosphate: TCP) and hydrogen cyanide (HCN) (under non-saline and saline conditions), salinity resistance, drought resistance using polyethylene glycol (PEG 6000) (with osmotic potentials of -5, -10 and -15 bar).

Results: All 15 isolates had the ability to grow at different drought levels. At the salinity levels of 4 and 10% sodium chloride (NaCl), only 10 and two isolates had the ability to grow, respectively. All of these isolates were capable of dissolving TCP and producing ACC-deaminase, IAA, siderophore and 9 isolates capable of producing HCN. In the presence of salinity of 4% NaCl, all isolates were able to solubilize TCP, while only 8, 13, 6, and 4 isolates were able to produce ACC- deaminase IAA, Siderophore and HCN, respectively.

Conclusion: Considering the fact that a considerable amount of Pseudomonas fluorescent isolated from rhizosphere of wheat in this study were able to grow well in salinity of 4%, and also the studied bacteria at different levels of drought stress, in osmotic pressure of -15 Bar or 37.62% polyethylene glycol (PEG 6000) were able to grow. In addition to salinity and drought resistance, these bacteria were able to produce plant growth promoting components (PGPs) in the presence and absence of salinity. Specially, the results of this study showed that some native isolates of the dry farming soils of the country were able to produce the ACC- deaminase enzyme, although under salinity stress of 4% sodium chloride salt this ability was significantly reduced (46.6%) and even in some isolates stopped production of this enzyme. Therefore, based on the results of this study, it can be concluded that wheat rhizosphere soil of dry farming can be a suitable source for isolating Pseudomonas fluorescent bacteria, some of these isolates have the ability to maintain their growth promoting properties in saline conditions. In addition, the use of such bacteria (phosphate solubilizing pseudomonads) can reduce some of the limitations of wheat production in the drylands, as the use of fertilizers in dry conditions increases soil salinity. However, their application as bio-fertilizer requires further greenhouse and field tests.

Keywords: ACC-deaminase, Dry farming, Insoluble phosphate, plant growth promoting rhizobacteria, Salinity and drought resistance

* Corresponding Author; Email: halikhan@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir