Archive of SID

جداسازی و تعیین خصوصیات باکتری‌های محرک رشد گیاه از ریزوسفر تلخ‌بیان (*Sophora alopecuroides*)

پریسا افتخاری‌زاده و فاطمه یوسفی کوپائی[1]

دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهرکرد؛ **parisa.eftekharizadeh@yahoo.com**

استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهرکرد؛ **yousefi@sku.ac.ir**

دریافت: **97/12/4** و پذیرش: **98/8/12**

چکیده

باکتری‌های رایزوسفری افزایش‌دهنده‌ی رشد گیاه (PGPR) دسته‌ای از باکتری‌ها هستند که با تحریک رشد، سرکوب بیمارگرهای گیاهی و القا مقاومت به بیمارگرها باعث بهبود رشد می‌شوند. تحقیق حاضر به منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری گیاه تلخ‌بیان و بررسی صفات محرک رشدی آنها انجام شد. پنجاه‌ودو جدایه باکتری از ریزوسفر این گیاه جدا و ویژگی‌های فنوتیپی و ریخت‌شناسی آنها بررسی شد. سپس صفات محرک رشدی هر جدایه شامل حل‌کنندگی فسفات معدنی، تولید آمونیاک، تولید ایندول استیک اسید، تولید پروتئاز، تولید لیپاز و تولید HCN در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. توانایی حل فسفات جدایه‌ها با استفاده از دو محیط PVK (پیکوفسکایا) و NBRIP بررسی شد که در این دو محیط به ترتیب 44 و 18 جدایه توانایی حل فسفات نشان دادند. مقدار ایندول‌استیک‌اسید تولید شده توسط جدایه‌ها از 0/12 تا 37 میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. 83% از جدایه‌ها توانایی تولید آمونیاک، 87% توانایی تولید پروتئاز، 87% توانایی تولید لیپاز و 65% توانایی تولید HCN داشتند. بر اساس نتایج، سه جدایه (20، 37 و 48) که در هرسه آزمون انحلال فسفات معدنی، تولید آمونیاک و تولید ایندول استیک اسید واکنش مثبت نشان دادند؛ به‌عنوان گزینه‌های دارای پتانسیل استفاده به‌صورت کود زیستی و دو جدایه (13 و 43) که در هر سه آزمون تولید پروتئاز، لیپاز و HCN واکنش مثبت قوی نشان دادند؛ به‌عنوان جدایه‌های دارای پتانسیل کاربرد به‌عنوان عوامل کنترل زیستی معرفی شدند. ترادف 16S rDNA در سه جدایه دارای توانایی تحریک رشد گیاه تعیین و با آنالیز BLAST با ترادف‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد. بر مبنای ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی و نیز ترادف 16S rDNA نتیجه‌گیری شد که تعدادی از جدایه‌های محرک رشد گیاه جدا شده در این بررسی، به جنس‌های *Arthrobacter*، *Acinetobacter*، *Bacillus* و *Pseudomonas* تعلق دارند. نتایج تحقیق حاضر بیانگر حضور قابل توجه جمعیت باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه در ریزوسفر گیاه تلخ‌بیان است.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های رایزوسفری محرک رشد گیاه، تولید سیانید هیدروژن، حل فسفات نامحلول، کود زیستی

[1] نویسنده مسئول، آدرس: شهرکرد- بلوار رهبر- دانشگاه شهرکرد- دانشکده کشاورزی-گروه گیاهپزشکی- کدپستی: 8818634141

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تلخ‌بیان (*Sophora* spp.) از گیاهان دارویی، چندساله و از خانواده بقولات (Fabaceae) است. تا به حال 187 گونه از آن در دنیا گزارش شده (صفری و همکاران، 1387) که به طور گسترده در جنوب شرقی اروپا، جنوب آسیا، استرالیا، جزایر اقیانوس آرام غربی و آمریکای جنوبی پراکنده شده است (کریشنا و همکاران، 2012).

بین میکروارگانیسم‌های خاک و گیاه تعاملات خاص و پیچیده‌ای وجود دارد که بعضی از این روابط به سلامت و بهره‌بری گیاه کمک می‌کند. در سال‌های اخیر استفاده از میکروارگانیسم‌های تقویت‌کننده رشد گیاه به منظور بهبود رشد گیاه به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته است. از دیدگاه متخصصین میکروبیولوژی خاک، باکتری‌های محرک رشد گیاه یا اصطلاحا PGPR به گروهی از باکتری‌های ناحیه ریزوسفر اطلاق می‌شود که باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (کلوپر و شراس، 1978). این باکتری‌ها از انواع مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم برای تحریک و بهبود رشد گیاه استفاده می‌کنند. مکانیسم‌های مستقیم شامل انحلال فسفات معدنی و معدنی کردن فسفات آلی به شکل قابل جذب برای گیاه، تثبیت نیتروژن، فراهم نمودن آهن با ایجاد سیدروفور، تولید هورمون‌هایی نظیر جیبرلیک اسید، اکسین و سیتوکنین و تولید آنزیم ACC-deaminase می‌باشد. ACC-deaminase با کاهش میزان اتیلن در ریشه‌های گیاهان درحال رشد منجر به افزایش طول ریشه و در نتیجه افزایش رشد گیاه می‌شود. از مکانیسم‌های غیرمستقیم باکتری‌های ریزوسفر در افزایش رشد گیاه می‌توان به کنترل‌زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی، رقابت با عوامل بیماری‌زای گیاهی و نیز راه اندازی مسیر مقاومت القایی سیستمیک (ISR[1]) اشاره نمود. این گروه از باکتری‌ها با تولید ترکیباتی از قبیل کیتیناز، سیانید هیدروژن (HCN)، پروتئاز و لیپاز از رشد بیمارگرهای گیاهی ممانعت می‌کنند. همچنین با تولید سیدرفورها آهن را از دسترس عوامل بیماری‌زای گیاهی خارج می‌کنند (گلیک، 1995؛ گواسومی، 2016).

یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که باکتری‌های PGPR از طریق آن باعث افزایش رشد و نمو گیاه می شوند، تولید و ترشح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه به خصوص اکسین‌ها می‌باشد. اکسین‌ها گروهی از هورمون‌های گیاهی هستند که ایندول-3- استیک اسید (IAA) معمول‌ترین و شناخته‌شده‌ترین آنهاست (برنارد، 1995). این هورمون از فعال‌ترین اکسین‌های فیزیولوژیکی است. ایندول استیک اسید حاصل از متابولیسم ال- تریپتوفان می‌باشد که توسط بعضی از قارچ‌ها و باکتری‌های محرک رشد گیاه تولید می‌شود. اسپایپن و همکاران (2007) گزارش کردند که باکتری *Bacillus subtilis* مقادیر متغیری از هورمون IAA تولید می‌کند.

از مکانیسم‌های دیگر باکتری‌های PGPR در افزایش رشد و نمو گیاه انحلال فسفات و تثبیت نیتروژن است. باکتری‌های ریزوسفر با ترشح اسیدهای آلی و فسفاتاز می‌توانند ترکیبات فسفاته نامحلول را به فرم قابل جذب گیاه تبدیل کنند. طبق گزارشات، باکتری‌های مختلفی مانند *Rhizobium*، *Bacillus*، *Agrobacterium*، *Pseudomonas*، *Pantoea*، *Erwinia*، *Achromobacter*، *Burkholderia* و ... دارای توانایی حل فسفر معدنی نامحلول هستند (ناتیال،2000; برمپونگ، 2014). بعضی از باکتری‌های آزادزی قادر به تثبیت نیتروژن هستند. جنس *Azospirillum* یکی از میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن است که با ریشه غلات رابطه همیاری دارد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که این باکتری محرک رشد گیاه است (دوملین و همکاران، 1998).

کنترل زیستی عوامل بیمارگر از مکانیسم‌های غیرمستقیم افزایش رشد گیاه توسط باکتری‌های محرک رشد است. تولید سیانید هیدروژن یکی از سازوکارهای بسیار مهم کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی است. سیانید هیدروژن یک متابولیت ثانویه است که توسط برخی از باکتری‌ها مانند *Pseudomonas fluorescens* تولید می‌شود. سنتز سیانید هیدروژن توسط این باکتری به وسیله یک آنزیم غشایی انجام می‌گیرد که با تولید HCN و CO_2 موجب اکسید شدن گلایسین می‌شود (کاستریک، 1977). دشوال (2012) با استفاده از آزمون تولید HCN فعالیت آنتاگونیستی برخی از گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* در برابر *Sclerotinia sclerotiorum* (عامل پوسیدگی اسکلروتینیایی ریشه و طوقه بسیاری از گیاهان) را اثبات کرد.

پروتئازها ازجمله آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین و مهم‌ترین آنزیم‌های فعال در پدیده مایکوپارازیتیسم[2] و کنترل زیستی هستند (ویدیاساگار و همکاران، 2009). ماجومدار (2017) توانست از ریزوسفر گیاه جوت (کنف هندی) که از خانواده پنیرک (Malvaceae) می‌باشد، یک باکتری آنتاگونیستی با ظرفیت تولید پروتئاز قوی

[1] Induced Systemic Resistance

[2] mycoparasitism

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی کند. جدایه با استفاده از توالی16S rDNA به عنوان *Bacillus amyloliquefaciens* شناسایی شد. این جدایه فعالیت آنتاگونیستی قابل توجهی در برابر بیمارگرهای *Macrophomina phaseolina*، *Fusarium oxysporum*، *F. semitectum* و *Alternaria alternata* نشان داد. میزان بازدارندگی از رشد این قارچ‌ها توسط این باکتری در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب 61/5، 82/6، 85/4 و 85/2 درصد تعیین شد.

تولید لیپاز توسط باکتری‌های ریزوسفر نیز مانند تولید پروتئاز از مکانیسم‌های کنترل بیمارگرهای گیاهی به شمار می‌رود. آنزیم لیپاز نقش اختصاصی تبدیل تری‌گلیسیرید به گلیسرول و اسیدهای چرب را ایفا می‌کند که به این عمل لیپولیز می‌گویند. این آنزیم‌ها به میزان قابل توجهی توسط جانوران، گیاهان و میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند (شارما و همکاران، 2001). دگازمن و همکاران (2008) پژوهش‌هایی انجام دادند که منجربه جداسازی باکتری‌های نمک‌دوستی از جنس *باسیلوس* با توانایی تولید آنزیم لیپاز شد. جنس‌های باکتریایی *Acromobacter*، *Acinetobacter*، *Bacillus* و *Pseudomonas* و جنس‌های قارچی *Candida*، *Rhizopus* و *Geotrichum* به عنوان میکروارگانیسم‌های تجاری اصلی و منابع لیپاز خارج‌سلولی شناخته شده‌اند (شارما و همکاران، 2001).

در گیاهان خانواده *Fabacea* انواع باکتری‌های محرک رشد گیاه از جنس‌های مختلف گزارش شده است. به طور مثال باکتری‌هایی نظیر *Pseudomonas putida*، *P. fluorescens* و *Bacillus subtilis* از جمله رایزوباکترهای محرک رشد در گیاه باقلا می‌باشند (متوالی، 2015). با توجه به اینکه گزارشی در مورد باکتری‌های ریزوسفر گیاه تلخ‌بیان و بررسی صفات محرک رشدی آنها وجود نداشت و با توجه به اهمیت استفاده از این باکتری‌ها در تقویت رشد گیاه و نیز جلوگیری از عوامل بیماری‌زا، تحقیق حاضر به منظور جداسازی باکتری‌های ناحیه‌ی ریشه‌ی گیاه تلخ‌بیان و بررسی صفات محرک رشدی آنها انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری در تابستان 1396از بوته‌های تلخ‌بیان موجود در مزرعه حسن آباد واقع در منطقه اشکفتک شهرکرد در سه نوبت طی مدت سه ماه (از تیرماه تا مرداد) از نقاط مختلف مزرعه صورت گرفت. نمونه‌ها با ریشه از خاک خارج و در کیسه‌های نایلونی و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتری‌های ریزوسفر گیاه تلخ‌بیان

جداسازی به روش قدس علوی و همکاران (2013) با مقداری تغییر و به صورت زیر انجام گرفت. خاک اضافی هر بوته تلخ‌بیان تکانده شد. ریشه‌های مویی و نازک و لایه سطحی (پوست) ریشه‌های قطور و اصلی جدا شد و ریشه‌ها به قطعات دو سانتی‌متری تقسیم شدند. حدود یک گرم از ریشه‌های قطعه قطعه شده و خاک همراه آن به ارلن حاوی محلول سترون 0/85% نمک در آب مقطر و 0/025% توین20 منتقل شدند. ارلن‌ها به مدت دو ساعت بر روی تکان‌دهنده الکتریکی با سرعت 400 حرکت رفت و برگشتی در دقیقه قرار گرفت. از هر ارلن سری رقت (غلظت 10^{-1} تا 10^{-4}) تهیه شد و در نهایت مقدار 100 میکرولیتر از غلظت‌های 10^{-3} و 10^{-4} بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت آگار مغذی (NA) در دو تکرار کشت داده شد. کلونی‌های رشدیافته روی محیط‌کشت انتخاب و با کشت مخطط آنها و انتخاب تک‌کلونی‌های حاصله خالص‌سازی شدند.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

وضعیت کلونی‌ها از نظر ریخت‌شناسی شامل اندازه، شکل، رنگ، ارتفاع، حاشیه، بافت و شفافیت بررسی و ثبت شد. شکل میکروسکوپی هر باکتری با رنگ‌آمیزی و با بزرگنمایی 1000 میکروسکوپ بررسی شد. آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تعیین واکنش گرم، رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی، اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین، کاتالاز، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط king's B و توانایی لهیدگی سیب زمینی طبق روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام گرفت (شاد و همکاران، 2005).

بررسی صفات محرک رشدی

اندازه‌گیری توانایی حل تری‌کلسیم فسفات در محیط پیکوفسکایا (PVK)

ابتدا محیط جامد پیکوفسکایا (PVK) (در هر لیتر شامل 10 گرم گلوکز، 5 گرم تری کلسیم فسفات، 0/5 گرم عصاره مخمر، 0/5 گرم سولفات آمونیوم، 0/2گرم کلرید پتاسیم، 0/2گرم کلرید سدیم، 0/1 گرم سولفات منیزیوم، 0/3 میلی‌گرم سولفات آهن، 0/3 میلی‌گرم سولفات منگنز و 10 گرم آگار) تهیه شد. سپس جدایه‌ها از کشت تازه (24 ساعته)، به‌صورت لکه‌ای در وسط پتری حاوی محیط PVK در چهار تکرار کشت و به مدت پنج روز در انکوباتور و در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. جدایه‌هایی که توانایی انحلال فسفات تری‌کلسیم را داشته باشند، اطراف کلونی خود ایجاد هاله روشن می‌کنند. برای اندازه‌گیری توانایی انحلال فسفات، قطر هر کلونی و قطر هاله ایجاد شده توسط هر جدایه

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری شد. در نهایت با اندازه‌گیری نسبت قطر هاله به قطر کلونی توانایی انحلال فسفات در هر جدایه ارزیابی شد (کارپاگام و ناگالاکشمی، 2014).

اندازه‌گیری توانایی حل تری‌کلسیم فسفات در محیط NBRIP

ابتدا محیط NBRIP (در هر لیتر شامل 10 گرم گلوکز، 5 گرم تری‌کلسیم فسفات، 5 گرم کلرید منیزیوم، 0/25 گرم سولفات منیزیوم، 0/2 گرم کلرید پتاسیم، 0/1 گرم سولفات آمونیوم و 15 گرم آگار) تهیه شد. سپس جدایه‌ها به صورت لکه‌ای کشت و به مدت پنج روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. میزان توانایی انحلال فسفات در جدایه‌ها طبق روش قبل با اندازه‌گیری نسبت قطر هاله به قطر کلونی ارزیابی شد.

توانایی تولید IAA

توانایی تولید اکسین با رنگ‌سنجی و با استفاده از معرف سالکوفسکی انجام شد (بنت و همکاران، 2001). ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت NB (Nutrient Broth) حاوی تریپتوفان (50 میلی‌گرم در لیتر) کشت داده شدند. سپس به مدت 48 ساعت در دمای 28 درجه سلسیوس بر روی تکان‌دهنده الکتریکی با 120 حرکت در دقیقه قرار داده شدند. محیط کشت فاقد باکتری نیز به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. پس از رشد باکتری‌ها، محیط‌های کشت به مدت 15 دقیقه در 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از رونشین با دو میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (2% $FeCl_3$ 0/5 مولار در محلول 35 % $HClO_4$) مخلوط شد و به مکانی تاریک منتقل شد. بعد از 30 دقیقه مقدار جذب نوری در طول موج 535 نانومتر اندازه گیری شد. مقدار اکسین در هر نمونه با مقایسه جذب آن با نمودار استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه شد.

توانایی تولید HCN

برای انجام این آزمون به محیط کشت NA میزان 4/4 گرم بر لیتر گلیسین اضافه شد. از کاغذ صافی برش‌هایی به اندازه درب پتری‌ها تهیه شد و در آون به مدت یک ساعت در دمای 180 درجه سلسیوس استریل شد. جدایه‌ها به صورت مخطط در پتری‌ها کشت داده شدند. کاغذها در محلول حاوی دو درصد کربنات سدیم و 0/5 درصد اسید پیکریک غوطه‌ور شده و در داخل درب پتری قرار داده شدند. پتری‌ها با پارافیلم کاملا مسدود شد تا از خروج گاز سیانید هیدروژن جلوگیری شود و به مدت چهار روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. ایجاد رنگ نارنجی تا قرمز روی کاغذ بیانگر تولید HCN است. عدم تغییر رنگ کاغذ به عنوان واکنش منفی و عدم تولید HCN، ایجاد رنگ قهوه‌ای روشن به عنوان تولید HCN به میزان متوسط، ایجاد رنگ قهوه‌ای تیره به عنوان تولید HCN به میزان زیاد و ایجاد رنگ آجری به عنوان تولید HCN به میزان خیلی زیاد تلقی شد (کاستریک، 1977).

توانایی تولید پروتئاز

برای انجام این آزمون، محیط SMA[1] (در هر لیتر شامل 15 گرم شیر خشک، 0/5 گرم عصاره مخمر، 15 گرم آگار) تهیه شد. سپس جدایه‌ها از کشت تازه در محیط آگار مغذی (NA)، به صورت لکه‌ای در سه تکرار روی محیط SMA کشت داده شدند. باکتری‌های کشت داده شده به مدت چهار روز در دمای 28 درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. تشکیل هاله شفاف در اطراف کلونی‌های باکتری بیانگر توانایی تولید پروتئاز توسط باکتری‌ها است. براساس قطر هاله یا میزان شفافیت واکنش جدایه‌ها در سه سطح مثبت، مثبت ضعیف و منفی ثبت شدند (قدس‌علوی، 2013).

توانایی تولید آمونیاک

برای اندازه‌گیری میزان تولید آمونیاک، ابتدا محیط کشت پپتون واتر (10 گرم پپتون، 5 گرم NaCl، 5 گرم عصاره مخمر در یک لیتر آب) آماده شد. پس از تهیه و تنظیم اسیدیته، محیط به میزان مساوی 10 میلی‌لیتر در لوله‌های آزمایش توزیع و استریل شد. هر جدایه در دو تکرار کشت داده شد. سپس به مدت پنج روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد به هر لوله میزان 0/5 میلی‌لیتر از معرف نسلر اضافه شد. ایجاد رنگ قهوه‌ای تا زرد نشان‌دهنده‌ی مثبت بودن جواب آزمون و توانایی باکتری در تولید آمونیاک است. شدت رنگ ایجاد شده متناسب با غلظت آمونیاک تولید شده در محیط کشت است (آگبوجاتو و همکاران، 2015). در واقع پتاسیم یدید در حضور آمونیاک یا نمک‌های آمونیوم تولید رنگ قهوه‌ای تا زرد می‌کند. برای تهیه معرف نسلر مقدار 50 گرم پتاسیم یدید در 50 میلی‌لیترآب سرد حل شد و محلول اشباع کلراید جیوه (22گرم در 350 میلی‌لیتر آب) به آن اضافه شد تا زمانی که نشانه‌هایی از تشکیل رسوب دیده شود. سپس مقدار 200 میلی‌لیتر از سدیم هیدروکسید پنج نرمال (NaOH5N) به آن افزوده و به حجم یک لیتر رسانده شد. درنهایت محلول مورد نظر بی‌حرکت گذاشته شد تا ته‌نشین شود. سپس مایع رویی برداشته شد و به ظرف شیشه‌ای تیره رنگ منتقل و دور از نور خورشید نگهداری شد (برونو و اسورونز، 2010).

[1] Skim Milk Agar

www.SID.ir

Archive of SID

توانایی تولید لیپاز

این آزمون برای تعیین وجود یا عدم وجود آنزیم لیپاز در باکتری‌ها انجام می‌گیرد. محیط کشت لیپاز (10 میلی‌لیتر توئین80، 10 گرم پپتون، 5 گرم کلرور سدیم، 0/1 گرم کلرید کلسیم، 16 گرم آگار در حجم یک لیتر آب) تهیه شد. تمام مواد فوق به جز توئین80 با هم ترکیب و در اتوکلاو استریل شدند. توئین80 به صورت جداگانه تا نزدیک نقطه جوش حرارت داده شد و سپس به محیط استریل شده اضافه و کاملاً با محیط مخلوط شد. محیط کشت در پتری‌های استریل توزیع شد. باکتری‌های کشت تازه، به صورت لکه‌ای در وسط و در سه تکرار کشت داده شدند. سعی بر آن شد که میزان کلونی کشت داده شده و سطح زیر کشت در تمام موارد یکسان باشد تا میزان خطا به حداقل برسد. پتری‌ها به مدت 5 روز در دمای 28 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. ایجاد رسوب اطراف کلونی باکتری نشان دهنده مثبت بودن جواب آزمون و وجود آنزیم لیپاز است. میانگین اندازه رسوب ایجاد شده در اطراف هر کلونی در تکرارهای مختلف محاسبه شد. (قدس علوی و همکاران، 2013).

تعیین توالی ناحیه 16S rDNA

توالی ژن 16S rRNA در سه جدایه دارای خواص محرک رشد تعیین شد. به این منظور ابتدا استخراج DNA انجام شد و سپس در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R به ترتیب با ترادف AGAGTTTGATCCTGGCTCAG و GGTTACCTTGTTACGACTT قطعه مورد نظر تکثیر شد. مخلوط واکنش شامل 10 میکرولیتر master mix (2x) تهیه شده از شرکت سیناکلون، 3 میکرولیتر از هر آغازگر مستقیم و معکوس (به غلظت 10 پیکومول بر میکرولیتر)، 7 میکرولیتر آب سترون و یک میکرولیتر DNA خالص بود. چرخه دمایی مورد استفاده شامل پنج دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای 94°C و به دنبال آن 30 چرخه شامل ترتیب دمایی °C 94، °C 60 و °C 72 به ترتیب به مدت ۳۰،۳۰ و60 ثانیه و درنهایت 10 دقیقه در دمای °C 72 بود (اسلام و همکاران، 2016). محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تعیین توالی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شد. توالی حاصل از طریق آنالیز BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شد.

نتایج

بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی باکتری‌ها

مشخصات ظاهری کلونی، شکل و نحوه‌ی آرایش سلول‌های باکتری بررسی شد و همراه با نتایج مربوط به بررسی خصوصیات بیوشیمیایی، در شناسایی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در جدول یک خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی تعدادی از جدایه‌های محرک رشد ذکر شده است.

بررسی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول در جدایه‌ها

در محیط PVK، 85% از جدایه‌ها و در محیط NBRIP، 35% جدایه‌ها توانایی انحلال فسفات معدنی نشان دادند. در جدول دو توانایی انحلال فسفات هر جدایه در هر دو محیط کشت با بیان نسبت قطر هاله به قطر کلونی نشان داده شده است. به طور کلی در محیط PVK نسبت به NBRIP درصد بیشتری از جدایه‌ها توانایی انحلال فسفات نشان دادند ولی خوانش نتیجه و اندازه گیری هاله در NBRIP ساده‌تر بود. جدایه‌های 20، 40، 41 و 48 در هر دو محیط کشت توانایی انحلال فسفات معدنی نشان دادند و نسبت قطر هاله به قطر کلونی هر چهار جدایه در هر دو محیط بیشتر از سه بود. جدایه 42 در محیط PVK نسبت به سایرین قدرت بیشتری در انحلال فسفات داشت و نسبت قطر هاله به قطر کلونی 4/5 بود ولی در محیط NBRIP قدرت انحلال فسفات نشان نداد. در تحقیق حاضر در ارزیابی نهایی، جدایه‌هایی به‌عنوان جدایه‌های حل‌کننده فسفات نامحلول معرفی شدند که در هر دو محیط قدرت انحلال فسفات نشان دادند.

آزمون تولید ایندول استیک اسید

مقدار تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها، از 0/12 تا 37 میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. جدایه‌های ۲۲،۲۵P، 26، 37، 43، 45 و 52 بیش از 25 میکروگرم در میلی‌لیتر و جدایه‌های 8، 10، 20، 22، 33، 47، 48 و 51 بین 15 تا 25 میکروگرم در میلی‌لیتر ایندول‌استیک اسید تولید نمودند. بیشترین مقدار تولید ایندول‌استیک اسید مربوط به جدایه 37 با تولید 37/1 میکروگرم در میلی‌لیتر بود. مقدار اکسین تولید شده توسط هر جدایه در جدول شماره دو بیان شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی باکتری‌های دارای صفات محرک رشد جدا شده از رایزوسفر گیاه تلخ‌بیان

کد جدایه	شکل کلونی	رنگ کلونی	ارتفاع کلونی	حاشیه کلونی	شکل و ارایش سلول‌ها	واکنش گرم	متابولیسم گلوکز[a]	اکسیداز[b]	کاتالاز[c]	ایجاد رنگدانه فلورسنت	ژلاتیناز[b]
1	نقطه‌ای[d]	زرد	محدب	صاف	باسیلی	-	O	++	++	+++	++
5	نامنظم	شیری	محدب	صاف	استرپتوباسیل	+	N	-	++	+	++
6	گرد	زرد	محدب	صاف	استرپتوکوکسی	-	N	-	++	+	-
8	نامنظم	شیری	محدب	صاف	باسیلی	+	O	-	++	+	++
11	نقطه‌ای	کرمی	محدب	صاف	باسیلی	-	OF	+	++	-	++
13	نامنظم	کرمی	نوک‌دار	رشته‌ای	استرپتو باسیل	+	N	-	++	++	++
20	نقطه‌ای	شیری	محدب	صاف	کوکوباسیل	-	O	-	++	-	++
21	گرد	کرمی	نوک‌دار	صاف	دیپلو کوکسی	-	OF	-	++	+	++
22	گرد	زرد	محدب	صاف	کوکوباسیل	+	N	-	++	-	-
22p	گرد	شیری	محدب	صاف	دیپلوکوکسی	-	N	-	++	+	++
25	نقطه‌ای	زرد	محدب	صاف	کوکوباسیل	+	O	-	++	-	++
26	نقطه‌ای	کرمی	نوک‌دار	رشته‌ای	دیپلوکوکوباسیل	-	N	-	++	+	++
31	گرد	شیری	نوک‌دار	رشته‌ای	باسیلی	-	O	++	++	++	-
32	نقطه‌ای	شیری	محدب	صاف	کوکسی	-	OF	-	++	-	-
33	گرد	شیری	محدب	رشته‌ای	استرپتوباسیل	+	N	-	+	++	++
35	نقطه‌ای	شیری	محدب	صاف	استرپتوباسیل	-	O	-	++	-	++
37	گرد	کرمی	محدب	صاف	باسیلی	+	OF	-	++	+	-
40	نقطه‌ای	سفید	برجسته	رشته‌ای	کوکو باسیل	-	OF	++	++	-	-
41	گرد	کرمی	محدب	صاف	کوکوباسیل	-	O	++	++	+++	++
43	نامنظم	شیری	محدب	صاف	باسیلی	-	N	+	++	-	+
45	گرد	زرد	محدب	صاف	باسیلی	-	N	+	++	-	-
47	گرد	شیری	محدب	رشته‌ای	استافیلوکوکسی	-	N	-	++	-	-
48	نقطه‌ای	شیری	محدب	صاف	دیپلوکوکوباسیل	+	OF	++	-	++	+
52	گرد	زرد	محدب	صاف	باسیلی	-	OF	++	++	-	++
53	نقطه‌ای	شیری	محدب	صاف	باسیلی	-	O	++	++	+	-

a: در این آزمون نتایج به این صورت تفسیر می‌شوند; O: متابولیسم قند از مسیر اکسیداتیو. F: متابولیسم قند از مسیر تخمیر. OF: متابولیسم قند از هر دو مسیر و N: عدم مصرف قند در هر دو شرایط هوازی و بی‌هوازی.

b: واکنش جدایه‌ها در آزمون‌های اکسیداز و ژلاتیناز به سه صورت مثبت (++) ، مثبت ضعیف (+) و منفی (-) مشخص شد.

c: واکنش جدایه‌ها در آزمون‌های کاتالاز و ایجاد رنگدانه فلورسنت به چهار صورت مثبت قوی (+++) ، مثبت (++) ، مثبت ضعیف (+) و منفی (-) مشخص شد.

d: کلونی‌های کوچکتر از 1میلی‌متر به عنوان کلونی نقطه‌ای (puncti form) توصیف می‌شوند.

e: منظور از آرایش پرچینی، قرار گرفتن سلولها در کنار یکدیگر از طول می باشد که اصطلاحا به این نوع آرایشpalisade گفته می‌شود.

آزمون تولید آمونیاک

در آزمون تولید آمونیاک، در 83% از جدایه‌ها رنگ محیط تغییر یافت که بیانگر تولید امونیاک توسط این جدایه‌ها است. در50% رنگ قهوه‌ای ظاهرشد که به عنوان مثبت و در 33% رنگ زرد مایل به قهوه‌ای ظاهر شد که در گروه مثبت‌های ضعیف جای گرفتند(جدول دو).

www.SID.ir

Archive of SID

توانایی جدایه‌ها در تولید HCN، پروتئاز و لیپاز

در آزمون تولید HCN، 65% از جدایه‌ها (34جدایه) توانایی تولید HCN داشتند. توانایی تولید HCN در جدایه‌ها بر اساس شدت تغییر رنگ کاغذ صافی، در چهار سطح بسیار زیاد (مثبت بسیار قوی)، زیاد (مثبت قوی)، متوسط (مثبت متوسط) و منفی گروه‌بندی شد. 13% از جدایه‌ها دارای توانایی تولید HCN بسیار زیاد، 10% دارای توانایی تولید HCN زیاد و 42% نیز دارای توانایی تولید HCN متوسط بودند. سایر جدایه‌ها HCN تولید نکردند و تغییر رنگ مشاهده نشد. بالاترین میزان توانایی تولید HCN مربوط به جدایه‌های 21، 25، 32، 33، 35، 41و 45 بود. در بررسی آزمون تولید پروتئاز، 87% از جدایه‌ها دارای توانایی تولید پروتئاز بودند. از این میان 52% توانایی بالایی در تولید پروتئاز نشان دادند و 35% دیگر توانایی کمتری از خود نشان دادند و در گروه مثبت ضعیف طبقه بندی شدند. براساس آزمون تولید لیپاز، 87% از جدایه‌ها توانایی تولید آنزیم لیپاز را داشتند. در این بین جدایه‌ی 46 با میانگین شعاع رسوب 13 میلی‌متر بیشترین توانایی را از خود نشان داد. در جدول دو نتایج هر سه آزمون ارائه شده است.

جدول 2- واکنش باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر تلخه‌بیان در آزمون‌های انحلال فسفات و تولید آمونیاک[a]، ایندول استیک اسید، پروتئاز، لیپاز[b] و HCN (در واکنش انحلال فسفات اعداد نسبت قطر هاله به قطر کلونی می‌باشند و در آزمون لیپاز اعداد میانگین شعاع (mm) رسوب تولید شده در اطراف هر کلونی می‌باشد)

جدایه	انحلال فسفات		تولیداندول استیک اسید (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تولید آمونیاک	تولید پروتئاز	تولیدلیپاز (mm)	تولید HCN
	PVK	NBRIP					
1	2/33	3/9	11	+	+++	8/5	++
2	4/14	1/4	8/47	+++	+	8/5	-
3	-	1/84	8/29	+	+++	6/5	-
3P	3/30	-	8/72	-	+++	11/5	++
4	3/26	-	7/65	-	-	9/5	++
5	2/46	-	13/9	+++	+	-	+++
6	-	1/62	5/9	+++	+++	4/5	+++
7	2/28	-	8/18	+	+	3/5	-
8	3/14	-	21/3	+++	+	-	-
9	-	-	1/05	-	-	-	-
10	-	-	16/2	+	+	5	++
11	2/43	3	6/17	+	-	9	++
12	2/33	-	5/54	+++	+++	2/5	++
12p	1/43	-	4/82	+++	+++	2/5	-
13	3/18	-	3/44	+++	+++	8/5	+++
14	1/4	1/76	6/98	-	+++	-	++
20	3/5	3/82	23/7	+++	+++	7	-
21	3/26	-	0/86	+	-	8/5	++++
22	1/37	-	15/4	+++	+++	-	-
22p	1/71	-	32/7	+	+++	6/5	-
23	-	-	ND[c]	+++	+	7/5	++
23p	2	2/6	4/35	+++	+	7/5	++
24	2/25	-	1/94	+	+++	6/5	-
25	2/33	-	32/7	+++	+	8/5	++++
25p	3/43	-	3/56	-	+	7	-
26	2/71	1/2	35/6	+++	-	8/5	+++
27	2/53	-	1/67	+++	+++	6/5	-
29	3/71	-	13	+++	+	5/5	++
30	1/8	-	2/14	+	+++	12	-
31	3/15	2/2	1/56	+++	-	10	++

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه	انحلال فسفات		تولیداندول استیک اسید (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تولید آمونیاک	تولید پروتئاز	تولیدلیپاز (mm)	تولید HCN
	PVK	NBRIP					
32	2	-	8/17	-	+	8/5	++++
33	1/4	-	19	+	+	5	++++
34	2/43	-	6/10	+	+	-	++
35	-	1/74	4/60	+	+	8	++++
36	-	-	ND	+	+++	5/5	-
37	2/07	3/76	37/1	+++	+++	8/5	++
39	-	-	9/64	+++	+++	7/5	-
40	3/57	4/6	5/46	+++	+	8	++
41	3/71	3/7	2/53	+	+++	3/5	++++
42	4/5	-	6/54	+++	+++	7/5	++
43	3/30	-	27/7	+++	+++	6/5	+++
44	3/61	-	7/25	+	+++	6/5	-
45	3/26	-	32	-	+++	5/5	++++
46	3/43	1/8	1/98	-	+++	13	++
47	2/85	-	21	+++	+++	7/5	-
48	3/57	3	15/67	+++	+++	6/5	++
49	2/85	-	ND	+++	+	6	++
50	3/53	1/76	0/12	+	+	5/5	-
51	3/15	-	17/14	+++	+++	8/5	++
52	3/14	-	32/37	+	+++	-	++
53	3/28	-	15/82	+++	+	8/5	++
54	2/73	1/72	14/40	-	+++	5	++

a: در آزمون‌های تولید آمونیاک، پروتئاز، ایندول استیک اسید و HCN منظور از + ، ++، +++ و ++++ به ترتیب؛ مثبت ضعیف، مثبت متوسط، مثبت قوی و مثبت بسیار قوی است.

b: درآزمون تولیدلیپاز، اندازه میانگین شعاع بین صفر تا یک درگروه منفی، بین 2/5 تا 5/5 درگروه مثبت ضعیف، بین 5/6 تا 9/9 در گروه مثبت متوسط و میانگین بالاتراز 10 درگروه مثبت قوی طبقه بندی شدند.

c: تعیین نشده (Not Determined)

شناسایی جدایه‌های منتخب

در بین جدایه‌های دارای ویژگی محرک رشد، جدایه شماره 41 بر مبنای خصوصیات فنوتیپی از جمله واکنش منفی در آزمون گرم، رشد در شرایط هوازی (اکسیداسیون گلوکز در شرایط هوازی)، اکسیداز مثبت و ایجاد رنگدانه فلورسنت روی محیط King's B، احتمالاً به جنس *Pseudomunas* تعلق دارد (شاد و همکاران، 2005). جدایه شماره 6 بر مبنای ترادف ژن 16SrRNA، بیشترین شباهت را با *Acinetobacter* (شماره دسترسی MG719581.1) نشان داد. خصوصیات فنوتیپی بررسی شده در این جدایه نیز با موارد توصیف شده برای این جنس مطابقت دارد. از جمله این خصوصیات می‌توان به واکنش منفی در آزمون گرم، داشتن تحرک، شکل میله‌ای، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت اشاره کرد (هولت و همکاران، 1994). جدایه‌های شماره 25 و 48 نیز بر مبنای ترادف ژن 16S rRNA، بیشترین شباهت را با *Arthrobacter* (به ترتیب شماره دسترسی HE662686.1 و KJ190982.1) نشان دادند. خصوصیات فنوتیپی بررسی شده برای این دو جدایه نیز با موارد توصیف شده برای این جنس مطابقت دارد. از جمله این خصوصیات می‌توان به واکنش مثبت در آزمون گرم، کاتالاز مثبت در جدایه 25، داشتن تحرک و شکل میله‌ای اشاره کرد (هولت و همکاران، 1994). جدایه شماره 37 بر مبنای ویژگی‌های بیوشیمیایی از جمله واکنش مثبت در آزمون گرم، رشد در شرایط بی‌هوازی، کاتالاز مثبت و مشخصات ظاهری شامل رنگ کرمی و شکل گرد و محدب کلونی و شکل باسیلی سلول ها احتمالا به جنس باسیلوس تعلق دارد (هولت و همکاران، 1994).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر 52 جدایه باکتری از ریزوسفر گیاه تلخ‌بیان جداسازی شد و ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بعضی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و خواص محرک رشد گیاه در آنها بررسی شد. در ارزیابی توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌ها دو محیط PVK و NBRIP استفاده شد. ناتیال و همکاران (2000) دو محیط NBRIP و PVK را مورد مقایسه قرار دادند و اعلام کردند محیط NBRIP نسبت به PVK جهت نشان دادن توانایی انحلال فسفات مناسب‌تر است. با این حال در بررسی حاضر در محیط PVK نسبت به محیط NBRIP درصد بیشتری از جدایه‌ها توانایی انحلال فسفات نشان دادند. مقایسه مواد سازنده این دو محیط نشان می‌دهد که تفاوت عمده دو محیط در عدم وجود عصاره مخمر و غلظت بیشتر نمک‌ها در محیط NBRIP است. با توجه به اینکه بعضی از باکتری‌ها علاوه بر منبع کربن و ازت برای رشد احتیاج به وجود بعضی از فاکتورهای رشد مانند بعضی از اسیدهای آمینه دارند، احتمالاً جدایه‌هایی که در محیط PVK توانایی انحلال فسفات نشان دادند ولی در محیط NBRIP واکنش آنها منفی بود به خاطر عدم توانایی رشد مناسب در محیط NBRIP می‌باشد. بنابراین براساس نتایج تحقیق حاضر، علی‌رغم مشکل‌تر بودن خوانش نتیجه در محیط PVK، به نظر می رسد محیط PVK مناسب‌تر باشد. البته در این مورد ارزیابی کمی قدرت حل فسفات جدایه‌ها توصیه می‌شود.

65% از جدایه‌ها قادر به تولید HCN بودند که از این میزان 13% توان تولید HCN به میزان بسیار زیاد (واکنش مثبت قوی) داشتند. تولید HCN توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه به عنوان یکی از مکانیسم‌هایی معرفی شده است که منجر به جلوگیری از رشد قارچ‌های بیمارگر می‌شود. در اینجا لازم است عنوان شود که در تحقیق حاضر علی‌رغم اینکه برای جداسازی باکتری‌ها، از یک محیط کشت عمومی استفاده شد و هیچ گونه ماده ضدقارچی به محیط اضافه نشد، آلودگی قارچی در کشت‌ها مشاهده نشد. علت این امر ممکن است به حضور باکتری‌های تولیدکننده HCN و درنتیجه نامناسب بودن محیط ریزوسفر تلخ‌بیان برای رشد قارچ‌ها مربوط باشد.

جدایه‌هایی که در آزمون‌های حل فسفات، تولید آمونیاک و تولید ایندول استیک اسید، واکنش مثبت نشان دادند؛ پتانسیل استفاده به‌عنوان کودهای زیستی را دارند. در آزمون حل فسفات معدنی، جدایه‌هایی به‌عنوان حل‌کننده فسفات درنظر گرفته شدند که در هر دو محیط PVK و NBRIP واکنش مثبت نشان دادند. در این رابطه، در درجه اول جدایه‌های 20، 40، 41 و 48 که نسبت قطر هاله به قطر کلونی در آنها در هر دو محیط بیشتر از سه بود و در درجه دوم جدایه‌های 1، 11، 31 و 37 که نسبت قطر هاله به قطر کلونی در آنها در یک محیط بیشتر از سه و در محیط دیگر بیشتر از دو بود؛ به‌عنوان باکتری‌های دارای پتانسیل استفاده به‌صورت کودهای زیستی فسفاته درنظر گرفته شدند. در محیط PVK، توانایی حل فسفات نامحلول در جدایه‌های 42، 2، 29 و 44 بیش از سایر جدایه‌ها بود و به احتمال زیاد این جدایه‌ها نیز پتانسیل استفاده به عنوان کود زیستی فسفره را دارند. البته لازم به تاکید است که توانایی حل‌کنندگی فسفات نامحلول در تمام جدایه‌های معرفی شده باید به‌صورت کمی نیز ارزیابی شود. یساری (1392)، مطالعه‌ای جهت بررسی اثرات فسفر معدنی و باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر رشد و عملکرد رقم تلار سویا انجام داد. نتایج این بررسی بیانگر تاثیر مفید باکتری‌های حل‌کننده فسفات در افزایش عملکرد بود. بر اساس نتایج تحقیق ایشان، با کاربرد همزمان دو سویه باکتری حل‌کننده فسفات (*Pseudomonas fluorescens* و *P. putida*)، کاهش مصرف فسفر معدنی از 100 به 50 کیلوگرم در هکتار منجر به کاهش معنی‌داری در عملکرد دانه نشد.

در آزمون تولید آمونیاک جدایه‌های 2، 5، 6، 8، 12، 12P، 13، 20، 22، 23، 23P، 25، 26، 27، 29، 31،37، 39، 40، 42، 43، 47، 48، 49، 51، 53 توانایی خوبی از خود نشان دادند. این جدایه‌ها نیز پتانسیل استفاده به عنوان کودهای نیتراته را دارند. جدایه‌های 20، 31، 37، 40 و 48 در هر دو آزمون تولید آمونیاک و انحلال فسفات واکنش مثبت نشان دادند. بنابراین احتمالا گزینه‌های مناسبی برای ارزیابی به عنوان کود زیستی هستند. رائی‌پور و علی‌اصغرزاده (1386) اثرات متقابل سه گونه از باکتری‌های حل‌کننده فسفات و باکتری *Bradyrhizobium japanicum* را بر عملکرد و جذب پتاسیم، فسفر و نیتروژن و شاخص‌های غده‌بندی در سویا (*Glycin max* L. Harcor CV.) در شرایط گلخانه‌ای مطالعه نمودند و گزارش کردند که باکتری‌های حل‌کننده فسفات؛ وزن خشک، درصد فسفر، پتاسیم و نیتروژن بخش هوایی گیاه، تعداد، وزن تر و وزن خشک گره‌های ریشه‌ای را به‌طور معنی‌دار افزایش دادند. باکتری *Bradyrhizobium* که از باکتری‌های تثبیت کننده ازت است؛ بر تمام شاخص‌های ذکر شده و

www.SID.ir

Archive of SID

وزن دانه در بوته تأثیر معنی‌دار و مثبت داشت. همچنین اثرات متقابل این دو فاکتور بر وزن خشک، درصد فسفر و نیتروژن بخش هوایی گیاه معنی‌دار شد. بنابراین برای کاهش مصرف کودهای شیمیایی، استفاده از میکروارگانیسم‌هایی که هم توانایی تثبیت ازت و هم توانایی انحلال فسفات را داشته باشند، امیدبخش به‌نظر می‌رسد.

در آزمون تولید ایندول استیک اسید جدایه‌های 22P، 25، 26، 37، 43، 45، 52 با تولید بیش از 25 میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان مثبت قوی و جدایه‌های 8، 10، 20، 22، 33، 47، 48، 51 و 53 با تولید 15 تا 25 میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان مثبت متوسط تلقی شدند. عباس‌زاده و همکاران (1387) با ارزیابی توان تولید اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت در شرایط آزمایشگاهی و سپس بررسی تأثیر این سویه‌ها در رشد گیاهچه کلزا، نشان دادند که سویه‌های تولیدکننده اکسین به‌طور معنی‌داری سبب افزایش شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های کلزا شدند. همچنین پتن و گلیک (2002) بذر کلزا و انتهای قلمه‌های ماش را با سویه‌ی وحشی باکتری *Pseudomonas putida* (تولیدکننده اکسین به میزان تقریبا 32 میکروگرم در میلی‌لیتر) و سویه‌های موتانت (با تولید اکسین به میزان حدود 2 میکروگرم در میلی‌لیتر) تیمار نمودند و طول ریشه در گیاهچه کلزا و میزان تشکیل ریشه در ماش را در این دو تیمار مقایسه نمودند. نتایج آنها نشان داد که در بذر کلزای تیمار شده با سویه‌ی وحشی، طول ریشه 35 تا 50 درصد بیشتر از طول ریشه در بذر تیمار شده با سویه موتانت بود. همچنین میزان تشکیل ریشه در قلمه‌های ماش تیمار شده با سویه وحشی بیشتر از قلمه های تیمار شده با سویه موتانت بود. بنابراین جدایه‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر که در آزمون تولید اکسین به عنوان جدایه‌های دارای واکنش مثبت قوی تلقی شدند؛ احتمالاً باعث تقویت ریشه‌دهی و افزایش رشد گیاه خواهند شد.

با مقایسه واکنش جدایه‌ها در سه آزمون انحلال فسفات معدنی، تولید آمونیاک و تولید ایندول استیک اسید، مشخص شد که جدایه‌های 20، 37 و 48 در هر سه آزمون توانایی خوبی از خود نشان دادند؛ در نتیجه پتانسیل تبدیل شدن به کود زیستی قوی را دارند. جدایه‌های 25 و 26 نیز میتوانند جدایه‌های خوبی در این زمینه باشند؛ البته واکنش آن‌ها در آزمون حل فسفات مثبت ضعیف ارزیابی شد. مالسواری و بگیانارایانا (2013) باکتری‌های جداشده از ریزوسفر انواع گیاهان دارویی را از نظر صفات محرک رشد گیاه مطالعه نمودند. سپس تأثیر چهار جدایه که در آزمون‌های تولید ایندول‌استیک اسید، انحلال فسفات و تولید آمونیاک واکنش مثبت نشان داده بودند را بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه بذرهای سورگوم، ذرت و ماش بررسی نمودند. نتایج ایشان بیانگر تاثیر مثبت این چهار جدایه در افزایش میزان جوانه‌زنی، طول ریشه و طول ساقه گیاهچه‌ها بود و لذا این چهار جدایه را جهت استفاده به‌عنوان کود زیستی توصیه نمودند.

بعضی از باکتری‌های محرک رشد به‌عنوان عوامل کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی عمل می‌کنند. جدایه‌هایی که در آزمون‌های پروتئاز، لیپاز و HCN موفق عمل کردند، پتانسیل استفاده به عنوان عوامل کنترل زیستی را دارند. در آزمون تولید پروتئاز جدایه‌های 1، 3، 3P، 6، 12، 12P، 13، 14، 20، 22، 22P، 24، 27، 30، 36، 37، 39، 41، 42، 43، 45، 46، 47، 48، 51، 52، 54 توانایی بالایی از خود نشان دادند. در آزمون لیپاز نیز جدایه‌های 3P، 30، 31 و 46 توانایی خیلی خوبی نشان دادند و به عنوان مثبت قوی تلقی شدند. همچنین جدایه‌های 1، 2، 3، 4، 11، 13، 20، 21، 22P، 23، 23P، 24، 25، 25P، 26، 27، 29، 32، 35، 36، 37، 39، 40، 42، 43، 44، 45، 47، 48، 49، 50، 51 و 53 توانایی تولید لیپاز را داشتند ولی از نظر میزان تولید لیپاز نسبت به جدایه‌های قبلی در سطح پایین تری قرار داشتند. در آزمون تولید HCN نیز در درجه اول جدایه‌های 21، 25، 32، 33، 35، 41 و 45 توانایی خیلی خوب (واکنش مثبت بسیار قوی) و در درجه دوم جدایه‌های 5، 6، 13، 26 و 43 توانایی خوبی (واکنش مثبت قوی) از خود نشان دادند. از بین جدایه‌های قوی و کارآمد در سه آزمون پروتئاز، لیپاز و HCN می توان به دو جدایه 13 و 43 اشاره کرد. این دو جدایه پتانسیل بالایی برای استفاده به عنوان عوامل کنترل زیستی دارند. در درجه دوم می توان از جدایه‌های 1، 3، 37 و 48 نام برد. این چهار جدایه در هر سه آزمون، واکنش مثبت نشان دادند؛ البته در آزمون تولید HCN در گروه مثبت متوسط جای گرفتند و در دو آزمون دیگر واکنش قوی نشان دادند. همچنین دو جدایه 6 و 45 در آزمون لیپاز واکنش مثبت متوسط نشان دادند و در دو آزمون دیگر عملکرد بالایی داشتند. در نهایت در درجه سوم می‌توان به جدایه‌های 35 و 32 اشاره کرد که در آزمون پروتئاز در گروه مثبت ضعیف جای گرفتند و در دو آزمون دیگر توانایی بالایی داشتند. همچنین جدایه 41 که در آزمون لیپاز در گروه مثبت ضعیف جای گرفت و در دو آزمون دیگر قدرت بالایی نشان داد.

در این جا ذکر این نکته لازم است که اگرچه غالبا توانایی تولید HCN به‌عنوان یک ویژگی ضدقارچی مطرح

www.SID.ir

Archive of SID

می‌شود؛ فعالیت ضدقارچی عوامل کنترل زیستی در تمام موارد با تولید HCN همبستگی ندارد. زیرا سویه‌ها از مکانیسم‌های مختلفی برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها بهره می‌گیرند. به‌طور مثال گیتها و همکاران (2014) تأثیر ضدقارچی باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر گیاه ماش را نسبت به چند قارچ بیمارگر گیاهی بررسی کردند. بر طبق گزارش ایشان تأثیر ضدقارچی باکتری‌هایی که قادر به تولید HCN نبودند نسبت به باکتری‌های تولیدکننده‌ی HCN بیشتر بود. همچنین باید توجه شود که برهمکنش بین میکروارگانیسم‌ها بسیار پیچیده است. به‌طوری‌که یک باکتری دارای ویژگی‌های ضدقارچی (از قبیل توانایی تولید HCN و انواع آنزیم‌های خارج‌سلولی)، ممکن است از رشد یک قارچ جلوگیری و بر قارچ دیگر بی‌تأثیر باشد. ژوسیک و همکاران (2014) فعالیت ضدقارچی چند سویه سودوموناس محرک رشد جداشده از ریزوسفر یونجه و شبدر را بررسی نمودند و گزارش کردند که دو سویه دارای اثر ضدقارچی قابل‌توجهی بر چند گونه از قارچ آسپرژیلوس بودند درحالی‌که بر قارچ پنی‌سیلیوم تأثیر نداشتند. بنابراین برای استفاده از باکتری‌ها به عنوان عامل کنترل زیستی، لازم است تأثیر ضدقارچی آنها بر قارچ‌های مورد نظر ابتدا در شرایط آزمایشگاه و سپس گلخانه و مزرعه مورد بررسی قرار گیرد.

در تحقیق حاضر، بر اساس واکنش جدایه‌ها در شش آزمون انجام شده، دو جدایه 37 و 48 به‌عنوان مناسب‌ترین جدایه‌های PGPR معرفی می‌شوند زیرا در تمام آزمون‌ها کارایی به نسبت بالایی داشتند. البته لازم به ذکر است که جهت تعیین دقیق توانایی هر کدام از جدایه‌ها در انحلال فسفات و تولید آمونیاک لازم است ارزیابی کمی صورت گیرد. همچنین لازم است کارایی این جدایه‌ها در جهت افزایش رشد گیاه یا کنترل عوامل بیماری‌زا در شرایط گلخانه و مزرعه بررسی شود.

جدایه‌های محرک رشد شناسایی شده در این بررسی به جنس‌های *Pseudomonas*، *Arthrobacter*، *Acinetobacter* و *Bacillus* تعلق داشتند. هر چهار جنس مذکور درمطالعات مختلف به عنوان PGPR معرفی شده‌اند (فرخ، 2011؛ بانرجه، 2010؛ پاتل، 2017؛ چاکرابورتی، 2014؛ احمد، 2008). ژائو و همکاران (2011) باکتری اندوفیت *Bacillus cereus* را از گره ریشه تلخ‌بیان جدا کردند وگزارش نمودند که این باکتری قادر به تثبیت ازت، تولید سیدروفور، انحلال فسفات و تولید اکسین بوده و در شرایط آزمایشگاهی نسبت به چند قارچ بیمارگر گیاهی خاصیت ضدقارچی نشان داده است. در تحقیق حاضر نیز جدایه 37 که به عنوان *Bacillus* شناخته شد؛ در آزمون‌های تولید آمونیاک، انحلال فسفات، تولید اکسین، و تولید HCN واکنش مثبت نشان داد. در مطالعه‌ی دیگر ژائو و همکاران (2013) باکتری اندوفیت *Pseudomonas chlororaphis* را از گره ریشه تلخ‌بیان جدا و آن را به عنوان محرک رشد معرفی نمودند. همچنین نشان دادند که این باکتری می‌تواند سطح ریشه را نیز کلونیزه نماید. در تحقیق حاضر جدایه 41 به عنوان *Pseudomonas* sp. شناخته شد که از نظر توانایی انحلال فسفات و خاصیت ضدقارچی (با توجه به واکنش مثبت این جدایه در آزمون‌های تولید HCN و پروتئاز) با مشخصات گزارش شده برای *Pseudomonas chlororaphis* مطابقت داشت ولی توانایی آن در تولید اکسین کمتر بود.

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به زیان‌های زیست‌محیطی کاربرد آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی، روش‌های جایگزین از جمله استفاده از باکتری‌های تقویت‌کننده رشد و عوامل کنترل‌زیستی گزینه‌ی مناسبی است. در تحقیق حاضر با مطالعه باکتری‌های ریزوسفر گیاه تلخ‌بیان چندین جدایه باکتری به عنوان PGPR معرفی شدند. در این بین دو جدایه (37 و 48) که پتانسیل استفاده به عنوان کود زیستی و نیز عوامل کنترل زیستی بیمارگرها را داشتند؛ معرفی و شناسایی شدند. البته جهت تأیید، به آزمایش‌های دیگر و بررسی آنها در شرایط گلخانه و سپس مزرعه نیاز است. نتایج بررسی حاضر بیانگر این است که ریزوسفر گیاه تلخ‌بیان محیط مناسبی برای جلب و استقرار باکتری‌هایی است که دارای صفات محرک رشد گیاه هستند.

فهرست منابع :

1. راثی‌پور، ل. و علی‌اصغرزاده، ن. 1386. اثرات متقابل باکتری‌های حل‌کننده فسفات (*Bradyrhizobium japanicum*) بر شاخص‌های رشد، غده‌بندی و جذب برخی عناصر غذایی در سویا. نشریه علوم آب و خاک. جلد 11(40): 64-53

www.SID.ir

Archive of SID

2. ساریخانی، م.ر.، ملبوبی، م.ع.، ابراهیمی، م.1393 . باکتری‌های حل کننده فسفات: جداسازی باکتری‌ها و ژن‌های رمزکننده حل‌کنندگی فسفات، مکانیسم و ژنتیک انحلال فسفات. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی. جلد 6: 110- 77.

3. صفری، ه.، حسام‌زاده حجازی، م.، جلیلیان، ن. و ضیائی نسب، م.. 1387 بررسی تنوع کاریوتیپی در سه گونه از جنس تلخ‌بیان (*Sophora* sp.). دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران. جلد 16: 27-36

4. عباس‌زاده دهجی. پ.، اسدی‌رحمانی، ه.، صالح‌راستین، ن.، خاوازی، ک. و اشرف‌سلطانی، ع. 1387 ارزیابی توان تولید اکسین توسط سودوموناس های فلورسنت و اثرات آنها در رشد گیاهچه های کلزا (*Brassica napus* L.). مجله پژوهشهای خاک(علوم خاک و آب). جلد22 (2): 215-203

5. یساری، ا. 1392. بررسی اثرات باکتری‌های حل‌کننده فسفات به‌عنوان کودهای بیولوژیک و فسفر معدنی بر رشد و عملکرد سویا (*Glycin max*) رقم تلار در شمال ایران. نشریه تحقیقات کاربردی اکوفیزولوژی گیاهان. قابل دریافت از : http://arpe.gonbad.ac.ir/article-1-25-fa.pdf

6. Agbodjato, N.A., Noumavo, P.A., Baba-Moussa, F., Salami, H.A., Sina, H., Sèzan, A., Bankolé, H., Adjanohoun, A. and Baba-Moussa, L. 2015. Characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Central and Northern Benin (West Africa). Applied and Environmental Soil Science. [online] available at: http://dx.doi.org/10.1155/2015/901656
7. Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163: 173-181.
8. Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, CH. and Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. Australian Journal of Crop Science 4:378-383.
9. Bent, E.G., Tuzun, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology 47(9): 793-800.
10. Brempong, S.A. and Aferi, N.K. 2014. Isolation of phosphate solubilizing bacteria from tropical. Global Advanced Research Journal of Agricultural Science 3: 8- 15.
11. Bruno, T.J. and Svoronos, P.T. 2010. Preparation of Special Analytical Reagents. P.1-4 (section 8). In: Hynes, W.M. (ed.) CRC Handbook of Chemistry and Physics. 91st ed. CRC Taylor Francis, Boca Raton, FL (Available at: https://sites.chem.colostate. edu/diverdi/all_courses/CRC%20reference%20data/special%20analytical%20reagents.pdf)
12. Cassan, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C. and Luna, V. 2009. *Azospirillumbrasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays L.*) and soybean (Glycine max L.). European Journal of Soil Biology 45: 28- 35.
13. Castric, P.A. 1977. Glycine Metabolism by *Pseudomonas aeruginosa*: Hydrogen Cyanide Biosynthesis. Journal of Bacteriology 130: 826-831.
14. Chakraborty, A., Mala, R.H., Rajgopal, R., Jain, M., Yadav, R., Siddalingeshwara, K.G. and ramod, T.P. 2014. Isolation and characterization of potential plant growth promoting rhizobacteria from non-rhizospheric soil. International Journal Current Microbiology and Applied Sciences 3: 432-438.
15. De Guzman, M.N., Vargas, V.A., Anna, H. and Svoboda, M. 2008. Lipolytic enzyme production by halophilic/halotolerant microorganisms isolated from laguna verde, Bolivia. Revista Boliviana De Química 25: 14- 23.

www.SID.ir

Archive of SID

16. Deshwal, V. K. 2012. *Pseudo*monas *aeruginosa* as biological control agent against Plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences 2: 14- 17.
17. Dommelen, A.V., Keijers, V., Vanderleyden, J. and De Zamaroczy, M. 1998. Ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. Journal of Bacteriology 180: 2652- 2659.
18. Farokh, R.Z., Sachdev, D., Kazemi-Pour, N., Engineer, A., Pardesi, K.R., Zinjarde, S., Dhakephalkar, P.K. and Chopade, B.A. 2011. Characterization of plant-growth-promoting traits of *Acinetobacter* species isolated from rhizosphere of *Pennisetum glaucum.* Journal of Microbiology and Biotechnology 21: 556- 566.
19. Garsia-Fraile, P., Menendez, E., and Rivas, R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. Bioengineering 2: 183- 205.
20. Geetha, K., Rajithasri, A.B. and Bhadraiah, B. 2014. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria from rhizosphere soils of green gram, biochemical characterization and screening for antifungal activity against pathogenic fungi. International Journal of Pharmaceutical Science Invention 3:47-54
21. Ghodsalavi, B., Ahmadzadeh, M., Soleimani, M., Brokanloui, P. and Taghizad, R. 2013. Isolation and characterization of *Rhizobacteria* and their effects on root extracts of *Valeriana officinalis.* Australian Journal of Crop Sciences 7: 338- 344.
22. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109- 117.
23. Goswami, D., Thakker, J. and Dhandhukia, P. 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting *rhizobacteria* (PGPR): A review. Cogent Food and Agriculture 2(1): 1127500. [online] available at http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2015.1127500
24. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Williams and Wilkins. Maryland
25. Indira Devi, S., Talukdar, N.C., Chandradev Sharma, K., Jeyaram and Rohinikumar, M. 2011. Screening of rhizobacteria for their plant growth promotion ability and antagonism against damping off and root rot diseases of broad bean (*Vicia faba L.*). Indian Journal of Microbioloy 51: 14- 21
26. Islam, SH., Akanda, A., Prova, A., Islam, M.D. and Hossain, M.D. 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. Frontiers in Microbiology 6: 1360. *doi: 10.3389/fmicb.2015.01360*
27. Jošic', D., C'iric', A., Sokovic', M., Stanojkovic'-Sebic', A., Pivic', R., Lepšanovic', Z. and Glamoclija, J. 2015. Antifungal activities of indigenous plant growth promoting *Pseudomonas* spp. from alfalfa and clover rhizosphere. Frontiers in Life Science 8: 131-138
28. Karpagam, T. and Nagalakshmi, P.K. 2014. Isolation and characterization of phosphate solubilizing microbes from agricultural soil. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 601- 614.
29. Kloepper, J.W. and Schroth. M.N. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. pp. 879–882.
30. Krishna, P.M., Sandhya, S. and Banji, D. 2012. A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus Sophora, Fabaceae. Brazilian Journal of Pharmacognosy 22: 1145- 1154.
31. Majumdar, S. and Chakraborty, U. 2017. Optimization of protease production from plant growth promoting *Bacillus amyloliquefaciens* showing antagonistic activity against phytopathogens. International Journal of Pharma and Bio Sciences 8: 635- 642.

www.SID.ir

Archive of SID

32. Malleswari1, D. and Bagyanarayana, G. 2013. Plant growth-promoting activities and molecular characterization of rhizobacterial strains isolated from medicinal and aromatic plants. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences 6:30-37
33. Metwali, E., Abdelmoneim, T., Bakheit, M. and Kadasa, N. 2015. Alleviation of salinity stress in faba bean (*Vicia faba L.*) plants by inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Plant Omics Journal 8: 449- 460.
34. Nautiyal, C. Sh., Bhadauria, Sh., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verm, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. FEMS Microbiology Letters 182: 291- 296.
35. Patel, P., Shah, R. and Modi, K. 2017. Isolation and characterization of plant growth promoting potential of *Acinetobacter* sp. rsc7 isolated from *Saccharum officinarum* cultivar co 671. Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences 5: 483- 493.
36. Patten, CH.L. and Glick. B.R. 2002 Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology 68(8): 3795–3801
37. Sarode. P., Makarand, R., Bhushan, CH. and Sudhir, CH. 2009. Siderophoregenic *Acinetobacter calcoaceticus* isolated from wheat rhizosphere with strong PGPR activity. Malaysian Journal of Microbiology 5: 6- 12.
38. Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA.
39. Sharma, R., Chisti, Y. and Chand Banerjee, U. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipases. Biotechnology Advances 19: 627- 662.
40. Silva, K., Perin, L., Gomes, M.D.L., Baraúna, A.C., Pereira, G.M.D., Mosqueira, C.A., Costa, I.B.D., O'hara, G. and Zilli, J.E. 2016. Diversity and capacity to promote maize growth of bacteria isolated from the Amazon region. Acta Amazonica 46: 111- 118.
41. Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Review 31: 425- 448.
42. Vidyasagar, M., Prakash, S., Mahajan, V., Shouche, Y.S. and Sreeramulu, K. 2009. Purification and characterization of an extreme Halothermophilic protease from a Halophilic bacterium *Chromohalobacter* sp. Brazilian Journal of Microbiology 40: 12- 19.
43. Xu, SH.J., Hong, S.J., Choi, W. and Kim, B.S. 2014. Antifungal activity of *Paenibacillus kribbensis* strain t-9 isolated from soils against several plant pathogenic fungi. The Plant Pathology Journal 30: 102- 108
44. Zhao, L.F., Xu, Y.J., Ma, Z.Q., Deng, Z.S., Shan, C.J and Wei, G.H. 2013. Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. Brazilian Journal of Microbiology 44; 623-631.
45. Zhao, L.F., Xu, Y.J., Sun, R., Deng, Z.S. and Wei, G. H. 2011. Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Bacillus cereus* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. Brazilian Journal of Microbiology 42; 567-575.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria from rhizosphere of *Sophora alopecuroides*

P. Eftekhari zadeh and F. Yousefi Kopaei[1]
Graduated MSc student, Faculty of Agriculture, Shahrekord University;
E-mail: parisa.eftekharizadeh@yahoo.com
Associate professor, Dept. Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrekord University;
E-mail: yousefi@sku.ac.ir
Received: February, 2019 & Accepted: November, 2019

Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) are a group of bacteria that enhance plant growth through direct and indirect effects. Isolation of PGPRs from *Sophora alopecuroides* rhizosphere and assessment of their plant growth promoting traits was the main aim of this study. Fifty two bacterial isolates were isolated from *Sophora alopecuroides* rhizosphere and their phenotypic and morphological characteristics were studied. Phosphate solubilization and production of ammonia, indole acetic acid, protease, lipase and HCN were evaluated *in vitro*. Phosphate solubilizing ability was assayed using PVK and NBRIP media. The results showed that the number of isolates with phosphate solubilization ability was 44 and 18 in those two media, respectively. The range of indole acetic acid production in isolates was 0.12 to 37 μg ml^{-1}. The percentage of isolates which were capable to produce ammonia, protease, lipase and HCN were 83%, 87%, 87% and 65%, respectively. According to the results, three isolates (named as 20, 37 and 48) which showed positive reaction in phosphate solubilization, production of ammonia and indole acetic acid production tests, were introduced as the strains having capacity for using as biofertilizers. Two isolates (named as 13 and 43) with strong positive reaction in the tests of protease, lipase and HCN production; were regarded as potential candidates for using as biocontrol agents. The partial sequence of 16S rRNA gene of selected isolates was determined and the derived sequences were compared against the GenBank database using NCBI, BLASTN. Based on morphological and biochemical characters and also 16S rDNA sequence, some of isolates were belonged to genera of *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Arthrobacter*. The result of this study indicated that the proportion of PGPRs in rhizosphere of *Sophora alopecuroides* is high.

Keywords: Biofertilizer, HCN production, Insoluble phosphate solubilization, Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

[1] Corresponding author: Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Rahbar Blvd. Shahrekord, IRAN

www.SID.ir