Archive of SID

نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد چهارم، شماره دوم، ۱۳۹۳
http://ejsms.gau.ac.ir

بررسی خصوصیات محرک رشد گیاهی برخی باکتری‌های ریزوبیومی جداسازی شده از خاک‌های ایران

داود سقفی[۱]، *حسینعلی علیخانی[۲] و بابک متشرع‌زاده[۳]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران، [۲]استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران، [۳]استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۳۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۶

چکیده

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) به گروه مختلفی از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که با یک یا چند مکانیسم، عملکرد گیاهان را افزایش می‌دهند. در این پژوهش، برخی صفات محرک رشد گیاه مثل انحلال فسفات‌های کم‌محلول معدنی، توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز و هورمون اکسین، در ۶۰ باکتری ریزوبیومی (متعلق به گونه‌های *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *فازئولی*، *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه* و *سینوریزوبیوم ملیلوتی*) انتخاب شده از بانک ژن گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران، مورد ارزیابی قرار گرفت. طبق نتایج به‌دست آمده، تمامی جدایه‌ها توان تولید اکسین را با میانگین ۲/۷۶ میلی‌گرم بر لیتر داشتند و مقدار تولید آن از ۱۰/۸۶-۰/۴۵ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود. همچنین تعداد ۲۵ جدایه (۴۱/۶ درصد) توان تولید ACC- دآمیناز را نشان دادند. نتایج ارزیابی توان حل فسفات‌های کم‌محلول معدنی در محیط جامد اسپربر (روش نیمه‌کمی) نشان داد که ۷۳ درصد جدایه‌ها توانایی انحلال فسفات را دارند و متوسط قطر هاله به قطر کلونی در روز ۱۲ انکوباسیون بین مقادیر ۱/۰۵-۲/۰۷ و مقدار فسفر انحلال‌یافته توسط جدایه‌ها در محیط مایع اسپربر پس از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون بین مقادیر ۱۵۸/۶-۳/۲ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود. به‌علاوه، همبستگی منفی معنی‌داری ($r= -0/906^{**}$) بین فسفر حل‌شده و pH محیط رشد وجود داشت. در این پژوهش جدایه‌های متعلق به گونه *سینوریزوبیوم ملیلوتی* در تمامی صفات نسبت به سایر جدایه‌ها توانمند ارزیابی شدند. بنابراین، انتخاب و تهیه زادمایه جدایه‌های توانمند متعلق به این گونه و بررسی اثرات آن‌ها برای ارتقای کیفیت محصولات کشاورزی مختلف، می‌تواند به‌عنوان یک روش زیستی ساده و سازگار با محیط زیست مدنظر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باکتری‌های ریزوبیومی، حل‌کنندگی فسفات، ACC- دآمیناز

* مسئول مکاتبه: halikhan@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ریزوسفر محدوده‌ای از خاک اطراف ریشه گیاه است که تحت‌تأثیر فعالیت‌های ریشه قرار دارد. در این منطقه روابط متقابل پیچیده‌ای بین ریشه و میکروارگانیسم‌های ریزوسفری پدید می‌آید (پینتون و همکاران، ٢٠٠١؛ ورنر، ٢٠٠٤). برهم‌کنش‌های میکروب- گیاه در خاک پیچیده بوده و از طرق مختلف سلامت گیاه و تولید محصولات را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند. باکتری‌ها فراوان‌ترین ریزموجودات ریزوسفری هستند. حدود ٥-٢ درصد باکتری‌های ریزوسفری که اثرات مفید بر رشد گیاه دارند، باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[1] نامیده می‌شوند (کلوپر و اسکراچ، ١٩٩٨). باکتری‌های ریزوبیومی در زمره باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه قرار دارند و می‌توانند فعالیت‌های محرک رشدی نشان دهند (داکورا، ٢٠٠٣؛ مایاک و همکاران، ٢٠٠٤؛ علیخانی و همکاران، ٢٠٠٦). مکانیسم‌های احتمالی که این باکتری‌ها از طریق آن رشد و عملکرد گیاهان را افزایش می‌دهند، عبارت از: توانایی تولید آنزیم ACC- دآمیناز[2]، که سطح اتیلن تنشی را در ریشه و ساقه کاهش می‌دهد (پنروز و گلیک، ٢٠٠١)، توانایی تولید هورمون‌هایی مانند اکسین (IAA)[3]، جیبرلین و سیتوکنین (پتن و گلیک، ٢٠٠٢)، مقابله با عوامل بیمارگر گیاهی از طریق تولید سیدروفورها[4] و هیدروژن سیانید[5] (پال و همکاران، ٢٠٠١) و انحلال فسفات‌های نامحلول آلی و معدنی (دی و همکاران، ٢٠٠٤) می‌باشد.

IAA (ایندول استیک اسید) متداول‌ترین هورمون اکسینی در گیاهان می‌باشد که تقسیم سلولی و طویل شدن ریشه را تحریک می‌کند. باکتری‌های ریزوبیومی IAA را از پیش ماده ال- تریپتوفان تولید می‌کنند که یکی از محتمل‌ترین مکانیسم‌های مؤثر بر رشد گیاه است (زهیر و همکاران، ٢٠٠٤). شواهدی وجود دارد که جدایه‌های ریزوبیومی از طریق توسعه سیستم ریشه‌ای، رشد و عملکرد گیاه برنج را افزایش داده‌اند (بیسواس و همکاران، ٢٠٠٠). طبق گزارش یاسمین و همکاران (٢٠٠٧) اثرات محرک رشدی زاد مایه ریزوباکتری‌های مولد IAA، به‌طور عمده به‌دلیل تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی ساختار ریشه و افزایش جذب عناصر غذایی در گیاهان تلقیح شده بوده است.

1- Plant Growth Promoting Rhizobacteria
2- 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylic Acid-Deaminase
3- Indole Acetic Acid
4- Siderophores
5- Cyanide Hydrogen

www.SID.ir

Archive of SID

اتیلن در تنظیم بسیاری از فرآیندهای رشد و توسعه گیاه نقش دارد (ما و همکاران، ۲۰۰۲)، ولی در غلظت‌های بالا به‌صورت اتیلن تنشی منجر به کاهش رشد ریشه و ساقه، محدودیت در جذب آب و عناصر غذایی می‌شود، که در نهایت کاهش محصول را به‌دنبال دارد (لی و همکاران، ۲۰۰۵). تحت تنش‌های محیطی مختلف، گیاهان با تولید ماده ACC که پیش‌ماده تولید اتیلن است، به تنش‌ها پاسخ می‌دهند (گلیک و همکاران، ۲۰۰۷). باکتری‌های محرک رشد گیاه با توانایی تجزیه ACC توسط آنزیم ACC- دآمیناز در ریزوسفر، مانع تجمع اتیلن شده و موجب برقراری سیستم ریشه‌ای سالم و قوی برای مقابله با تنش‌های محیطی می‌شوند (مایاک و همکاران، ۲۰۰٤). اولین گزارش در مورد توان تولید ACC- دآمیناز در ریزوبیوم‌ها مربوط به ما و همکاران (۲۰۰۳) می‌باشد، آن‌ها ۱۳ جدایه ریزوبیومی را برای بررسی فعالیت ACC- دآمیناز مورد آزمون قرار دادند، که از بین آن‌ها ۵ جدایه دارای توان تولید این آنزیم بودند.

فسفر در فرایند تولید و انتقال انرژی در گیاهان نقش دارد، در خاک‌های آهکی با pH بالا، درصد زیاد کربنات کلسیم، کمی مواد آلی و خشکی خاک باعث شده است که فسفر قابل‌جذب کم‌تر از مقدار لازم برای تأمین رشد بهینه محصولات کشاورزی باشد. در این خاک‌ها استفاده از کودهای شیمیایی شامل فسفر به‌دلیل واکنش‌پذیری بیش‌تر با ذرات خاک و در نتیجه تثبیت سریع‌تر آن، چندان مؤثر و کارآمد نیست و به‌کارگیری ریزموجودات حل‌کننده فسفات، می‌تواند یکی از راه‌های مؤثر برای افزایش قابلیت جذب فسفر باشد (اتویی و اولسن، ۱۹٦٦). باکتری‌های حل‌کننده فسفات موجود در خاک به‌ویژه باکتری‌های ریزوبیومی (گلدستین، ۱۹۸٦)، ضمن این‌که مصرف کودهای فسفره را کاهش می‌دهند، مکانیسم اصلی این باکتری‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی، تولید اسیدهای آلی می‌باشد که از طریق کاهش pH و یا با کمپلکس کردن کاتیون‌های پیوند شده با فسفر، سبب آزاد شدن فسفر و در نهایت منجر به افزایش زیست‌فراهمی آن برای گیاه می‌شوند (سیلسپور و همکاران، ۲۰۰۲؛ واسیلو و همکاران، ۲۰۰٦).

امروزه در کشورهای در حال توسعه، از زادمایه باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه استفاده می‌شود (زهندر و همکاران، ۲۰۰۱). هدف اصلی از توسعه فناوری زیستی در خصوص باکتری‌های محرک رشد گیاه، افزایش جمعیت باکتری‌های مؤثر در خاک است که می‌تواند به توسعه کشاورزی پایدار کمک کند (آدسموی و کلوپر، ۲۰۰۹). با این‌حال باکتری‌های محرک رشد جداسازی شده از مکان‌های مختلف به‌دلیل نبود سازگاری مناسب با شرایط خاکی و اقلیمی مختلف، کارایی یکسانی

www.SID.ir

Archive of SID

ندارند (ویکرام و همکاران، ٢٠٠٧). در نتیجه شناسایی و به‌کارگیری باکتری‌های بومی محرک رشد گیاه می‌تواند سبب افزایش تولیدات کشاورزی گردد. بنابراین هدف از این پژوهش نیز شناسایی و گزینش جدایه‌های توانمند از نظر صفات محرک رشدی در بین ریزوبیوم‌های بومی، برای تهیه زادمایه میکروبی مؤثر و سازگار با شرایط خاک‌های ایران برای پیشبرد اهداف کشاورزی پایدار (ارتقای کیفیت محصولات کشاورزی) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد استفاده و آماده‌سازی زادمایه: در این پژوهش تعداد ٦٠ باکتری ریزوبیومی (متعلق به گونه‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* (Sm)[1] و *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *فازئولی* (Rlp)[2]، *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه* (Rlv)[3]) جدا شده از خاک‌های زیرکشت لگوم‌ها در منطقه اطراف کرج، که در بانک ژن گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند، انتخاب گردید. برای انجام هر یک آزمون، زادمایه کشت تازه هر جدایه باکتری به روش زیر تهیه گردید: ابتدا درون ارلن‌های شیشه‌ای ١٠٠ میلی‌لیتری مقدار ١٥ میلی‌لیتر محیط کشت YMB[4] ریخته شد و ارلن‌ها در دمای ١٢١ درجه سانتی‌گراد و فشار ١/٣٤ اتمسفر درون اتوکلاو به‌مدت ١٥ دقیقه استریل شدند. پس از سرد شدن ارلن‌ها، محیط کشت درون هر ظرف توسط یک لوپ از نمونه باکتری مایه‌زنی گردید و کشت‌ها به‌مدت ٧٢–٤٨ ساعت (بسته به سرعت رشد باکتری) در دمای حدود ٢٨ درجه سانتی‌گراد بر روی به‌هم‌زن دورانی با سرعت چرخش ١٢٠ دور در دقیقه هوادهی و خوابانده شدند. پس از رشد کافی باکتری درون محیط کشت، ابتدا دانسیته نوری (OD)[5] سوسپانسیون‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل؛ Unico^{TM} 1100,USA) در طول موج ٥٧٠ نانومتر قرائت و آن‌گاه با استفاده از منحنی رشد (OD-CFU) و براساس فاکتور رقت[6] و از طریق افزودن مقادیر لازم آب مقطر استریل، جمعیت باکتری در تمامی سوسپانسیون‌ها در حد ٤×١٠^{٩} cfu.ml$^{-١}$ تنظیم گردید، تا تعداد یکسان سلول ریزوبیومی زنده برای انجام هر یک از آزمون‌های موردنظر فراهم گردد.

1- *Sinorhizobium Meliloti*
2- *Rhizobium Leguminosarum* Biovar *Phaseoli*
3- *Rhizobium Leguminosarum* Biovar *Viciae*
4- Yeast Extract Mannitol Broth
5- Optical Density
6- Dilution Factor

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون کمی توان تولید IAA: توان تولید IAA جدایه‌های انتخاب شده، با استفاده از محیط DF[1] (شامل ٤ گرم در لیتر KH_2PO_4، ٦ گرم در لیتر Na_2HPO_4، ۰/۲ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۲ گرم در لیتر گلوکز، ۲ گرم در لیتر گلوکونیک اسید، ۲ گرم در لیتر سیتریک اسید و همچنین عناصر میکرو شامل: ۱ میلی‌گرم در لیتر $FeSO_4.7H_2O$، ۱۰ میکروگرم در لیتر H_3BO_3، ۱۰ میکروگرم در لیتر $MnSO_4.7H_2O$، ۱۲٤/٦ میکروگرم در لیتر $ZnSO_4.7H_2O$، ۸/۲۲ میکروگرم در لیتر $CuSO_4.7H_2O$، ۱۰ میکروگرم در لیتر MoO_3 و pH=۷/۲) در ۳ تکرار بررسی شد. برای این منظور ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۳۰ میلی‌لیتر محیط DF شامل ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ال- تریپتوفان منتقل گردید و بعد از ۷۲ ساعت، سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه) و یک میلی‌لیتر از محلول صاف رویی با ٤ میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$- ۰/۵ مولار) مخلوط شد، این مخلوط به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید و مقدار تولید IAA توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد تهیه شده در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از IAA محاسبه شد (پتن و گلیک، ۲۰۰۲).

آزمون نیمه‌کمی توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز: این آزمون برای جدایه‌های ریزوبیومی براساس روش پیشنهادی پنروز و گلیک (۲۰۰۱) انجام شد. برای این منظور از ۳ سری ظروف پتری ۹ سانتی‌متری شامل محیط کشت پایه RMM[2] (شامل ۳ قسمت A: ۱/۰۲۵ گرم K_2HPO_4، ۰/۷۲۵ گرم K_2HPO_4، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و pH برابر ۷، قسمت B: ۰/۰۷۵ گرم NaCl، ۰/۰۰۵ گرم $CaCl_2$، ۰/۲۵ گرم $MnSO_4.7H_2O$، ۵ گرم مانیتول و ۵ میلی‌لیتر محلول غذایی هوگلند، قسمت C: پانتوتنیک اسید، بیوتین و تیامین، هر کدام به مقدار ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) استفاده گردید: ۱- ظروف پتری حاوی محیط کشت پایه که ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ACC (۰/۳ مولار) به‌عنوان منبع نیتروژنی اختصاصی به سطح هر کدام اضافه شد، ۲- ظروف پتری شامل محیط کشت به‌علاوه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول NH_4Cl (۰/۳ مولار) به‌عنوان منبع نیتروژنی قابل‌جذب، این سری از ظروف پتری به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد و ۳- ظروف پتری شامل محیط کشت RMM که

1- DF Salt Minimal Medium
2- Rhizobial Minimal Medium

www.SID.ir

Archive of SID

هیچ‌گونه منبع نیتروژنی (NH_4Cl یا ACC) به سطح آن‌ها اضافه نشد، این سری از محیط‌ها در واقع شاهد منفی به‌شمار می‌آیند. در قسمت پشت هر ظرف پتری، ٩ نقطه با فواصل یکسان از هم، نشانه‌گذاری شدند و در هر نقطه مقدار ٧ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه ریزوبیومی توسط دستگاه سمپلر (Sampller)، در ٣ تکرار مایه‌زنی گردید. محیط‌های مایه‌زنی شده به‌مدت ٤ روز در دمای ٢٨ سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند، میزان رشد جدایه‌ها پس از ٤ روز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور اندازه کلنی باکتری‌های ریزوبیومی رشدیافته بر روی محیط RMM + ACC در مقایسه با محیط‌های شاهد مثبت (RMM + NH_4Cl) و شاهد منفی (RMM)، درجه‌بندی شدند (جدول ١).

جدول ١- درجه‌بندی توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز (علیخانی و همکاران، ٢٠٠٣).

درجه توان تولید ACC دآمیناز	میزان رشد باکتری بر روی ACC	اندازه کلنی رشدیافته روی ACC
٠	بدون رشد	همانند اندازه کلنی در شاهد منفی
+١	رشد کم	یک‌سوم اندازه کلنی در شاهد مثبت
+٢	رشد متوسط	دو سوم اندازه کلنی در شاهد مثبت
+٣	رشد زیاد	همانند اندازه کلنی در شاهد مثبت
+٤	رشد بسیار زیاد	بیش از اندازه کلنی در شاهد مثبت

آزمون نیمه‌کمی توان انحلال فسفات‌های کم‌محلول معدنی: برای انجام این آزمون از محیط کشت اسپربر[1] (١٠ گرم در لیتر گلوکز، ٠/٥ گرم در لیتر عصاره مخمر، ٠/١ گرم در لیتر $CaCl_2$، ٠/٢٥ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ٢/٥ گرم در لیتر $Ca_3(PO_4)_2$، ١٥ گرم در لیتر آگار) (اسپربر، ١٩٥٨) استفاده شد، که در این محیط تری‌کلسیم فسفات به‌عنوان یکی از اجزای محیط کشت و همچنین تنها منبع فسفر می‌باشد. برای هر جدایه باکتری یک ظرف پتری در نظر گرفته و سطح هر پتری به ٣ قسمت مساوی تقسیم شد، مرکز هر قسمت با مقدار یکسان از سوسپانسیون باکتری ریزوبیومی تلقیح گردید، ظروف پتری تلقیح شده درون انکوباتور با دمای ٢٨ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تمامی پلیت‌ها در ٣ نوبت ٤، ٨ و ١٢ روز پس از تلقیح از انکوباتور خارج شده و قطر کلنی رشدیافته (CD) و نیز قطر هاله شفاف به‌دست آمده از انحلال فسفات (HD) که در اطراف هر کلنی تشکیل شده بود به دقت

1- Sperber

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌گیری شدند، در نهایت متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی (HD/CD) در روز دوازدهم برای هر جدایه محاسبه گردید.

آزمون کمی توان انحلال فسفات‌های کم‌محلول معدنی: در این مرحله برای بررسی دقیق‌تر مقدار فسفر انحلال‌یافته، جدایه‌هایی که نسبت HD/CD آن‌ها بالاتر از ۱/٤ بود انتخاب شدند و مقدار یکسان از سوسپانسیون هر جدایه رشدیافته در محیط YMB، با ۳ تکرار در محیط کشت مایع اسپربر کشت شد. ارلن‌های شامل محیط مایع مایه‌زنی شده و نمونه شاهد در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۲۰ ساعت قرار گرفتند (ریس و همکاران، ۲۰۰۱). از سوسپانسیون‌های حاصل، مقدار ۱۲ میلی‌لیتر برداشته و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در این مرحله سلول‌ها و ذرات باکتری و فسفات نامحلول از سوسپانسیون جمع‌آوری و مقدار فسفر محلول در مایع صاف رویی به روش وانادات- مولیبدات اندازه‌گیری شد (کوتنی، ۱۹۸۰).

داده‌ها با نرم‌افزار SAS V6.12 تجزیه شد و مقایسه میانگین‌ها نیز با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد توسط نرم‌افزار MSTAT-C محاسبه گردید.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر تمامی صفات محرک رشدی بررسی شده، اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۱ درصد وجود دارد (جدول ۲).

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس صفات محرک رشد جدایه‌های ریزوبیومی.

منبع تغییرات	IAA (میلی‌گرم بر لیتر)		P حل‌شده در محیط مایع (میلی‌گرم بر لیتر)		P(HD/CD) در محیط جامد	
	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات
جدایه	۵۹	۲۲/۹۹٤**	۳۲	٦۹۱۷/۱۲**	۵۹	۰/۳۰۵**
خطا	۱۲۰	۰/۰۰۲	٦٦	۱/٦٥٤	۱۲۰	۰/۰۱۷

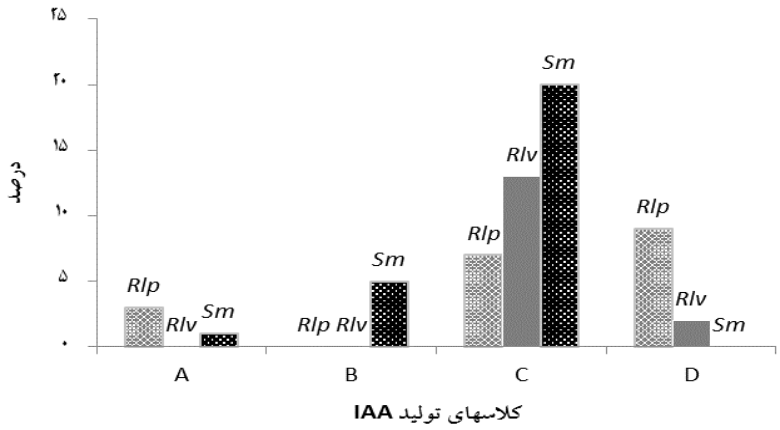
HD/CD: نسبت قطر هاله به قطر کلونی و ** معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

توان تولید IAA در محیط DF: براساس نتایج به‌دست آمده، تمامی جدایه‌ها قادر به تولید IAA بودند. مقدار تولید در بین جدایه‌های بررسی شده از ١٠/٨٦-٠/٤٥ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود و متوسط آن، ٢/٧٦ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد. جدایه‌های متعلق به گونه *سینوریزوبیوم ملیلوتی* با میانگین تولید IAA ٣/٤٨ میلی‌گرم بر لیتر، بالاتر از متوسط مقدار تولید بودند و جدایه‌های متعلق به گونه‌های *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *فازئولی* و *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه* به‌ترتیب با میانگین تولید ٢/٥٧ و ١/٦٥ میلی‌گرم بر لیتر پایین‌تر از حد متوسط قرار گرفتند، با این‌حال جدایه‌هایی که حداکثر و حداقل تولید IAA در آن‌ها مشاهده گردید هر دو متعلق به گونه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *فازئولی* بود (جدول ٣).

به‌علاوه جدایه‌ها براساس میزان تولید IAA در ٤ کلاس A، B، C و D دسته‌بندی شدند (A: IAA > ١٠ میلی‌گرم بر لیتر، B: ١٠> IAA > ٥ میلی‌گرم بر لیتر، C: ٥> IAA> ١ میلی‌گرم بر لیتر و D: IAA < ١ میلی‌گرم بر لیتر). کلاس A دارای حداقل فراوانی (٦/٦ درصد) و کلاس‌های B و D به‌ترتیب دارای ٥ جدایه (٨/٣ درصد) و ١١ جدایه (١٨/٣ درصد) بودند و بیش‌ترین فراوانی جدایه‌ها (٦٦/٦ درصد) در کلاس C مشاهده گردید (شکل ١).



شکل ١- فراوانی جدایه‌های ریزوبیومی مولد IAA.

www.SID.ir

Archive of SID

بیش از ۸۰ درصد باکتری‌های ریزوسفری توان تولید IAA را از پیش‌ماده ال- تریپتوفان موجود در ترشحات ریشه‌ای یا از پروتئین‌های آزاد شده از سلول‌های مرده باکتریایی دارند (پتن و گلیک، ۱۹۹۶). آنجوم و همکاران (۲۰۱۱) گزارش نمودند تمامی جدایه‌های ریزوبیومی جداسازی شده از گره‌های ریشه لوبیا قرمز در حضور ال- تریپتوفان توانایی تولید IAA را داشتند. همچنین سریدوی و مالایاح (۲۰۰۷) نشان دادند که تمام ۲۶ جدایه ریزوبیومی جداسازی شده از گیاه سسبانیا، در محیط مایع شامل ۱ درصد تریپتون، ترکیبات ایندولی تولید کردند و مقدار تولید بین ۷/۹-۱/۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد، این پژوهشگران بیان نمودند که تولید بیش‌تر IAA در یک جدایه نسبت به جدایه دیگر، احتمالاً به‌دلیل استفاده بهتر از ترکیبات محیط توسط آن جدایه می‌باشد. علیخانی و همکاران (۲۰۰۳) نیز در پژوهشی گزارش کردند از مجموع ۲۹۷ جدایه ریزوبیومی بررسی شده، تعداد ۲۲۰ جدایه توانایی تولید IAA را از خود نشان دادند. همچنین نتایج پژوهش ایشان نشان داد بیش‌ترین مقدار IAA تولید شده مربوط به گونه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *فازئولی* می‌باشد، گونه‌های متعلق به *سینوریزوبیوم ملیلوتی* و *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه* در رده‌های بعدی قرار دارند. طی پژوهشی اعتصامی و همکاران (۲۰۰۹) توانایی تولید اکسین را در ۱۰۰ جدایه ریزوبیومی بررسی کردند و نتایج ایشان نشان داد که جدایه‌های متعلق به گونه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *فازئولی* بالاترین توان تولید اکسین را داشتند. نتایج این پژوهش نیز با نتایج این پژوهشگران هم‌خوانی دارد.

توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز: نتایج به‌دست آمده از آزمون نیمه‌کمی توان تولید ACC- دآمیناز جدایه‌های ریزوبیومی نشان داد که برخی از باکتری‌های ریزوبیومی بومی خاک‌های ایران توان تولید این آنزیم را دارند و این نتایج، با یافته‌های به‌دست آمده از پژوهش‌های ما و همکاران (۲۰۰۳) هم‌خوانی دارد. نکته قابل‌توجه دیگر این است که توان تولید ACC- دآمیناز در بین جدایه‌های ریزوبیومی یکسان نیست و رشد جدایه‌ها روی محیط کشت شامل ACC متفاوت است، که احتمالاً به‌دلیل پتانسیل متفاوت فعالیت آنزیم ACC- دآمیناز در جدایه‌ها می‌باشد (شهزاد و همکاران، ۲۰۱۰). از این جهت جدایه‌ها براساس قطر کلنی تشکیل شده بر روی محیط RMM+ACC، در ۳ گروه ضعیف (قطر کلنی $\frac{۱}{۳}$ شاهد مثبت)، متوسط (قطر کلنی $\frac{۲}{۳}$ شاهد مثبت)، قوی (همانند یا بیش از اندازه شاهد مثبت (شامل ۰/۳ مولار NH_4Cl)) گروه‌بندی شدند. جدایه‌های ریزوبیومی مولد ACC- دآمیناز (جدول ۳) و فراوانی آن‌ها در جدول ٤ آورده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٣- مقایسه میانگین توان تولید IAA و آنزیم ACC- دآمیناز جدایه‌ها.

ACC- دآمیناز	IAA (میلی‌گرم برلیتر)	جدایه	ACC- دآمیناز	IAA (میلی‌گرم برلیتر)	جدایه
+٤	١/٥٣^{q}	٦٥Sm	+٤	١٠/٨٦^{a}	٢٨٧Rlp
٠	١/٥٣^{q}	٢٧٩Rlp	+٤	١٠/٣٥^{b}	١٣٥Sm
٠	١/٥٣^{q}	٣٢٢Rlv	+٤	١٠/٢^{c}	٢٨١Rlp
٠	١/٥٣^{q}	٣٤٧Rlv	+٤	١٠/٢^{c}	٣٠٧Rlp
٠	١/٥٣^{q}	٣١٢Rlv	+٢	٩/٢٧^{d}	٣٣Sm
٠	١/٥٣^{q}	٢٥٩Rlp	+١	٨/١٩^{e}	٩٤Sm
+٣	١/٢٧^{r}	١٤٠Sm	+٢	٧/١٤^{f}	١٠٢Sm
٠	١/٢٦^{r}	٢٥٨Rlp	+١	٦/٣٤^{g}	٥٩Sm
+٤	١/٢٦^{r}	١٠٣Sm	+١	٥/٠٣^{h}	٣٢Sm
+٢	١/٢٦^{r}	٣٥Sm	٠	٤/٧٣^{i}	٢٨Sm
+٢	١/٢٦^{r}	٣١Sm	٠	٤/٧٣^{i}	٤٥Sm
٠	١/٢٦^{r}	٣١٤Rlv	+٤	٤/٤٧^{j}	٣٤٥Rlv
٠	١/٢٦^{r}	٣١٨Rlv	+٢	٣/٦٧^{k}	٣٤٣Rlv
٠	١/٢٦^{r}	٣٣٣Rlv	+١	٣/٦٧^{k}	١٣٤Sm
٠	١/٢٦^{r}	٣٢٣Rlv	٠	٣/٦٧^{k}	٣٤Sm
٠	١/٢٦^{r}	٣٣١Rlv	٠	٢/٨٦^{l}	٢٦Sm
٠	١/٢٦^{r}	٣٣٥Rlv	+١	٢/٦^{m}	٤٨Sm
٠	١/٢٦^{r}	٢٦٥Rlp	+١	٢/٦^{m}	١١٠Sm
٠	١/٠١^{s}	٣٣٢Rlv	٠	٢/٦^{m}	١٧Sm
٠	٠/٩٩^{s}	٢٥٦Rlp	٠	٢/٦^{m}	٣٠٢Rlp
٠	٠/٧٣^{t}	٣٤٤Rlv	+٤	٢/٣٣^{n}	٤٩Sm
٠	٠/٧٣^{t}	٢٧١Rlp	٠	٢/٣٣^{n}	٢٨٥Rlp
٠	٠/٧٣^{t}	٢٦١Rlp	+١	٢/٠٩^{o}	١١١Sm
٠	٠/٧٣^{t}	٢٦٨Rlp	+١	١/٨^{p}	٢٩Sm
٠	٠/٥٣^{u}	٣٣٤Rlv	٠	١/٨^{p}	٣٢٨Rlv
٠	٠/٤٦^{u}	٢٦٧Rlp	٠	١/٨^{p}	٢٧٦Rlp
٠	٠/٤٦^{u}	٢٧٠Rlp	٠	١/٥٤^{q}	١١٢Sm
٠	٠/٤٦^{u}	٢٧٤Rlp	+٢	١/٥٣^{q}	١١٣Sm
٠	٠/٤٦^{u}	٢٦٦Rlp	+٤	١/٥٣^{q}	٦٣Sm
٠	٠/٤٥^{u}	٢٨٢Rlp	+١	١/٥٣^{q}	١٢١Sm

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ٥ درصد بدون تفاوت معنی‌دار هستند.

Sm: *سینوریزوبیوم ملیلوتی*، Rlp: *ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار فازئولی* و Rlv: *ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار ویسیه*.

www.SID.ir

Archive of SID

در بین ٦٠ جدایه ریزوبیومی تعداد ٢٥ جدایه (٤١/٦ درصد) توان تولید ACC- دآمیناز را نشان دادند. طبق نتایج از ١٩ جدایه متعلق به گونه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *فازئولی*، در مجموع ٣ جدایه دارای توان تولید ACC- دآمیناز بودند که هر ٣ جدایه در گروه قوی قرار گرفتند و از بین ١٥ جدایه متعلق به *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیووار *ویسیه*، ٢ جدایه دارای توان تولید ACC- دآمیناز بود که یک جدایه در گروه قوی و یک جدایه در گروه متوسط قرار گرفت. از ٢٦ جدایه متعلق به گونه *سینوریزوبیوم ملیلوتی* در مجموع ٢٠ جدایه دارای توان تولید ACC- دآمیناز ارزیابی شد که ٦ جدایه در گروه قوی و ٥ جدایه در گروه متوسط و ٩ جدایه در گروه ضعیف واقع شدند. خسروی و همکاران (٢٠٠٧) در بررسی توان تولید ACC- دآمیناز ٣٣٠ جدایه ریزوبیومی گزارش نمودند که ٢٨/٢ درصد جدایه‌ها دارای توان تولید این آنزیم می‌باشند و در بین جدایه‌ها بیش‌ترین درصد توان تولید ACC- دآمیناز (٤٦/٥ درصد) متعلق به جدایه‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* بود. رمضانیان و همکاران (٢٠٠٧) نیز در بررسی توان تولید ACC- دآمیناز ١٠٠ جدایه ریزوبیومی به این نتیجه رسیدند که جدایه‌های ریزوبیومی از نظر توان تولید این آنزیم در سطوح مختلف قرار دارند و جدایه‌های متعلق به *سینوریزوبیوم ملیلوتی* بیش‌ترین توانایی تولید را از خود نشان دادند. علیخانی و همکاران (٢٠٠٣) گزارش کردند که ٦٧ درصد جدایه‌های ریزوبیومی بومی مولد ACC- دآمیناز بوده و در این میان بیش‌ترین فراوانی مربوط به گونه *سینوریزوبیوم ملیلوتی* می‌باشد.

براساس نتایج جدول ٣، رابطه هم‌سویی بین توان تولید اکسین و ACC- دآمیناز جدایه‌ها مشاهده شد. به‌طوری‌که ٤٨ درصد جدایه‌های مولد ACC- دآمیناز، بالاتر از حد میانگین تولید اکسین (٢/٧٦ میلی‌گرم بر لیتر) قرار گرفتند، همچنین از ٩ جدایه توانمند در تولید ACC- دآمیناز (اندازه کلنی رشدیافته روی ACC بیش از اندازه کلنی در شاهد مثبت)، ٤ جدایه از نظر توان تولید اکسین نیز در رده‌های بالاتری واقع شدند، که احتمالاً می‌تواند به‌دلیل مشترک بودن ژن‌های کدکننده این صفات در جدایه‌ها باشد.

جدول ٤- فراوانی و گروه‌بندی جدایه‌های ریزوبیومی از نظر توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز.

گروه‌های ریزوبیومی			فراوانی جدایه‌های مولد ACC- دآمیناز در سطوح مختلف				
نام گروه (جنس، گونه، بیوار)		تعداد جدایه	قوی	متوسط	ضعیف	جمع	درصد
R.leguminosarum	bv. *phaseoli*	١٩	٣	٠	٠	٣	١٥/٧
	bv. *viciae*	١٥	١	١	٠	٢	١٣/٣
Sinorhizobium meliloti		٢٦	٦	٥	٩	٢٠	٧٦/٩
جمع کل		٦٠	١٠	٦	٩	٢٥	٤١/٦

www.SID.ir

Archive of SID

توان انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی: نتایج به‌دست آمده از آزمون نیمه‌کمی توان انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی نشان داد که تعداد ٤٤ جدایه (٧٣ درصد) توان حل فسفات را دارند و جدایه‌های متعلق به گونه *سینوریزوبیوم ملیلوتی* دارای حداکثر (١٠٠ درصد) فراوانی در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی بودند، در مرتبه بعد جدایه‌های متعلق به گونه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیوار *ویسیه* (٦٠ درصد) قرار داشتند و حداقل فراوانی انحلال فسفات (٤٧ درصد) مربوط به گونه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیوار *فازئولی* بود. همچنین حداقل و حداکثر نسبت HD/CD به‌ترتیب مربوط به جدایه‌هایی از *ریزوبیوم لگومینوزاروم* بیوار *فازئولی* و *سینوریزوبیوم ملیلوتی* به‌دست آمد. به‌علاوه جدایه‌های مورد آزمون در محیط مایع توانایی انحلال فسفات را داشتند و مقدار فسفر انحلال‌یافته بین ٣/٢ (جدایه ٢٨٧Rlp) تا ١٥٨/٦ (جدایه ١١١Sm) میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود. ٥٧/٥٧ درصد جدایه‌ها بالاتر از حد میانگین (٩٢/٤٥ میلی‌گرم بر لیتر) قرار داشتند، که از این میان ٨٤ درصد متعلق به *سینوریزوبیوم ملیلوتی* بود (جدول ٥). آنتون و همکاران (١٩٩٨) در بررسی توان انحلال فسفات نامحلول جدایه‌های ریزوبیومی گزارش کردند که ٨٤-٦٧ درصد از جدایه‌های ریزوبیومی دارای توان انحلال فسفات می‌باشند.

مقایسه نتایج روش نیمه‌کمی و کمی انحلال فسفات نامحلول معدنی نشان داد که بین این دو روش همبستگی معنی‌داری وجود ندارد ($r=٠/٢٢٩^{ns}$). استوال و بیده (١٩٧٢) گزارش کردند روش نیمه‌کمی، یک روش عمومی برای غربال‌گری اولیه ریزموجودات حل‌کننده فسفات است و در بیش‌تر موارد بین نتایج به‌دست آمده از روش کمی و نیمه‌کمی انحلال فسفات هم‌خوانی زیادی وجود ندارد. نتایج نشان داد با افزایش میزان انحلال فسفات، pH محیط کاهش می‌یابد (شکل ٢)، به‌طوری‌که میزان pH در محیط کنترل ٦/٨ و در محیط‌های تلقیح شده از ٦/٢٣-٤/٢ متغیر بود (جدول ٥). پرز و همکاران (٢٠٠٧) گزارش کردند با افزایش جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات، مقدار pH ٤-٣/٢ واحد کاهش می‌یابد که می‌توان گفت انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی نتیجه‌ای از اثر ترکیبی کاهش pH و تولید اسیدهای آلی به‌ویژه گلوکونیک اسید می‌باشد (فانکم و همکاران، ٢٠٠٦؛ کریشناونی، ٢٠١٠). بررسی همبستگی بین میزان فسفر انحلال‌یافته و pH محیط نشان داد همبستگی منفی و معنی‌داری بین این دو شاخص وجود دارد ($r= -٠/٩٠٦^{**}$)، رشید و همکاران (٢٠٠٤) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند ($P=٠/٠١$، $r= -٠/٤$).

www.SID.ir

Archive of SID

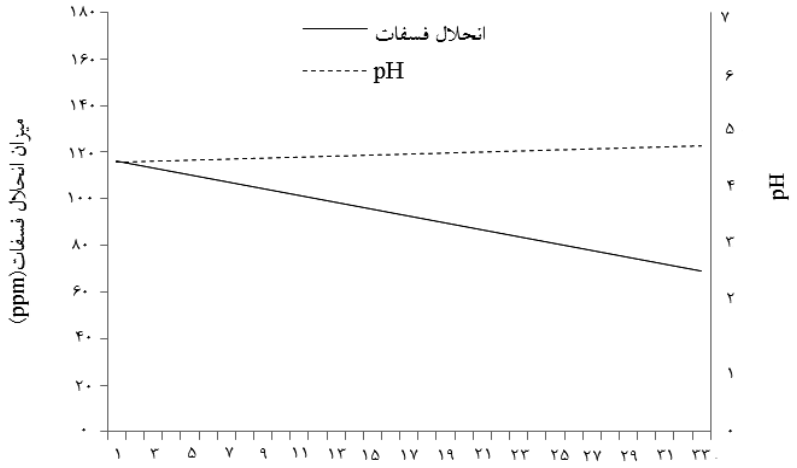
جدول ۵- مقایسه میانگین میزان انحلال فسفات (کیفی و کمی) و تغییرات **pH**.

جدایه	P(HD/CD)	P(mg/L)	pH	جدایه	P(HD/CD)	P(mg/L)	pH
۲۸۷Rlp	۱/٤$^{h-j}$	۳/۲^{w}	٦/۲۳	٦٥Sm	۱/٥۳$^{f-h}$	۱۱۰/۱^{j}	٤/۹٤
۱۳٥Sm	۱/٥٦$^{e-g}$	۱۳٦^{e}	٤/۸۳	۲۷۹Rlp	۱^{k}	–	–
۲۸۱Rlp	۱/٤۳$^{g-i}$	۱۲۷/٤^{g}	٤/۷	۳۲۲Rlv	۱^{k}	–	–
۳۰۷Rlp	۱/۰٥^{jk}	–	–	۳٤۷Rlv	۱^{k}	–	–
۳۳Sm	۱/٦۸$^{d-g}$	۷۲^{q}	٥	۳۱۲Rlv	۱^{k}	–	–
۹٤Sm	۱/۹۳$^{b-d}$	٥۰/٥^{r}	٥/۲	۲٥۹Rlp	۱/۱۷^{jk}	–	–
۱۰۲Sm	۱/۹۳$^{b-d}$	۸۰/٤^{p}	٥	۱٤۰Sm	۱/٦$^{e-g}$	۱۰۳/٤^{k}	٤/۸۹
٥۹Sm	۱/۸۱$^{c-f}$	۹۱/۸^{n}	٤/۹۸	۲٥۸Rlp	۱^{k}	–	–
۳۲Sm	۱/٥۸$^{e-g}$	۹٤/٦^{m}	٤/۹	۱۰۳Sm	۱/۷٥$^{b-f}$	۹۸/۷^{l}	٤/۹۸
۲۸Sm	۱/۸$^{c-f}$	۱۳۷/٦^{e}	٤/۷۲	۳٥Sm	۱/٦٦$^{d-g}$	۱٤۹^{c}	٤/۷۱
٤٥Sm	۱/٦۱$^{e-g}$	۱۳/۷^{v}	٥/۷	۳۱Sm	۱/٦۸$^{d-g}$	۱۳٥/٥^{e}	٤/۷
۳٤٥Rlv	۱/۳۸$^{h-j}$	–	–	۳۱٤Rlv	۱/۱٥^{jk}	–	–
۳٤۳Rlv	۱/٤$^{h-j}$	۱۳۰/٦^{f}	٤/۲	۳۱۸Rlv	۱/۲٥$^{i-k}$	–	
۱۳٤Sm	۱/٥۸$^{e-g}$	۱۱۹/٥^{h}	٤/۸۳	۳۳۳Rlv	۱/۳$^{h-k}$	–	–
۳٤Sm	۱/٦$^{e-g}$	۸٦^{o}	٤/۹۸	۳۲۳Rlv	۱/٤٤^{hi}	۲٥/۱^{s}	٥/٥۳
۲٦Sm	۱/٦٦$^{d-g}$	۱۳٦/٥^{e}	٤/۷۷	۳۳۱Rlv	۱/٤۸^{hi}	۱٦/٦^{u}	٥/٥۳
٤۸Sm	۱/۸$^{c-f}$	۱۳/۷۲^{v}	٥/۷	۳۳٥Rlv	۱^{k}	–	–
۱۱۰Sm	۱/۸٥$^{c-e}$	۲۰/۲٥^{t}	٥/۳۹	۲٦٥Rlp	۱/٤۲^{hi}	۱٦/٦^{u}	٥/٤۷
۱۷Sm	۲/۰۷^{a}	۱۱۳/۷^{i}	٤/۸٥	۳۳۲Rlv	۱^{k}	–	–
۳۰۲Rlp	۱^{k}	–	–	۲٥٦Rlp	۱^{k}	–	–
٤۹Sm	۱/۸٦$^{c-e}$	۱٤٦/۳^{d}	٤/٦۹	۳٤٤Rlv	۱/۲۲$^{i-k}$	–	–
۲۸٥Rlp	۱/۱۲^{jk}	–	–	۲۷۱Rlp	۱/۱^{jk}	–	–
۱۱۱Sm	۲^{ab}	۱٥۸/٦^{a}	٤/۷٥	۲٦۱Rlp	۱^{k}	–	–
۲۹Sm	۱/۸٥$^{c-e}$	۱٥٥/٦^{b}	٤/٦٦	۲٦۸Rlp	۱^{k}	–	–
۳۲۸Rlv	۱/۱٤^{jk}	–	–	۳۳٤Rlv	۱^{k}	–	–
۲۷٦Rlp	۲/۰٥^{a}	۹٥/٥^{m}	٤/۸۸	۲٦۷Rlp	۱^{k}	–	–
۱۱۲Sm	۱/۷۳$^{c-f}$	۱٤٦/٥^{d}	٤/٦۹	۲۷۰Rlp	۱/۲٤$^{i-k}$	–	–
۱۱۳Sm	۱/۷۳$^{c-f}$	۱۰۳/٤^{k}	٤/۹۱	۲۷٤Rlp	۱^{k}	–	–
٦۳Sm	۱/۷٥$^{b-f}$	۸۰/٦^{p}	٤/۹۷	۲٦٦Rlp	۱^{k}	–	–
۱۲۱Sm	۱/٦۸$^{d-g}$	۸۱/۸^{p}	٤/۹٥	۲۸۲Rlp	۱^{k}	–	–

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد بدون تفاوت معنی‌دار هستند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٢- رابطه بین تغییرات pH و انحلال فسفات.

همبستگی بین صفات محرک رشدی: بین صفات محرک رشدی بررسی شده در این پژوهش همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری‌که بین توان تولید IAA با انحلال فسفات در محیط جامد (نسبت قطر هاله به قطر کلونی) و تولید آنزیم ACC- دآمیناز به‌ترتیب در سطح ٥ و ١ درصد، رابطه معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ٦). وجود همبستگی مثبت بین متابولیت‌های باکتریایی، احتمالاً به‌خاطر وجود ژن‌های مشترک کنترل‌کننده این صفات در باکتری‌ها می‌باشد، که شناسایی چنین ژن‌هایی می‌تواند در تهیه زادمایه‌های مؤثر، مفید واقع شود (خان و همکاران، ٢٠٠٩).

جدول ٦- ضریب همبستگی بین صفات محرک رشدی جدایه‌ها.

	IAA	ACC- دآمیناز	P (HD/CD)
IAA	-	-	-
ACC	+٠/٥٤٥**	-	-
P(HD/CD)	+٠/٢٩٣*	+٠/٣١٤*	-

* معنی‌دار در سطح احتمال ٥ درصد و ** معنی‌دار در سطح احتمال ١ درصد.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین نتایج به‌دست آمده نشان داد جدایه‌های حل‌کننده فسفات، دارای سایر صفات محرک رشدی نیز می‌باشند، براساس یافته‌های علمی، باکتری‌های محرک رشد احتمالاً با بیش از یک مکانیسم عمل می‌کنند (دفریتاس و همکاران، ۲۰۰۷) و عقیده بر این است که ریزموجودات حل‌کننده فسفات، به‌طور هم‌زمان دارای پتانسیل کنترل پاتوژن‌های گیاهی و همچنین افزایش رشد گیاه از طریق تولید سیدروفور، آنزیم‌های هیدرولیتیک و IAA هستند (واسیلو و همکاران، ۲۰۰۶). گولاتی و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش نمودند جدایه BIHB 723 متعلق به *اسینتوباکتر* حل‌کننده فسفات، قادر به تولید سایر متابولیت‌های محرک رشدی مانند IAA، ACC- دآمیناز، سیدروفور و آمونیاک می‌باشد.

نتیجه‌گیری

طبق نتایج آزمون‌های درون‌شیشه‌ای به‌دست آمده از این پژوهش می‌توان ادعا نمود باکتری‌های ریزوبیومی به‌عنوان باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه مطرح بوده و در بین جدایه‌های ریزوبیومی بررسی شده، صفات محرک رشد گیاهی مانند توان تولید IAA، آنزیم ACC- دآمیناز و حل‌کنندگی فسفات‌های کم‌محلول به‌ترتیب زیر می‌باشد:

سینوریزوبیوم ملیلوتی > *ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار فازئولی* > *ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار ویسیه*.

همچنین وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین توان تولید IAA با تولید آنزیم ACC- دآمیناز و انحلال فسفات‌های کم‌محلول بیان‌کننده این مطلب می‌باشد که غربال‌گری درون‌شیشه‌ای براساس تولید IAA، برای انتخاب سوپراسترین‌ها می‌تواند مفید واقع شود. با این‌حال، در بعضی مواقع بین نتایج آزمون‌های درون‌شیشه‌ای و گلخانه‌ای هم‌خوانی مشاهده نمی‌شود که احتمالاً رقابت ضعیف باکتری‌ها در ریزوسفر و نداشتن تلفیقی از صفات محرک رشدی، دلیلی بر نبود بروز اثرات مفید این باکتری‌ها در گیاهان می‌باشد. بنابراین استفاده از زادمایه با جمعیت بالاتر باکتری‌های ریزوبیومی، به‌خصوص گونه‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* بومی در شرایط خاک‌های ایران پیشنهاد می‌گردد و امید است که با ارایه این راه‌کار در آینده گامی مؤثر برای ارتقای کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی و همچنین سلامت محیط زیست برداشته شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1.Adesemoye, A.O., and Kloepper, J.W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Appl. Microbiol. Biotech. 85: 1-12.

2.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)

3.Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N., and Antoun, H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. Plant and Soil. 287: 35-41.

4.Anjum, M., Zahir, Z., Arshad, M., and Ashraf, M. 2011. Isolation and screening of rhizobia for auxin biosynthesis and growth promotion of mung bean (*Vigna radiata* L.) seedlings under axenic conditions. Soil Environ. 30: 1. 18-26.

5.Antoun, H., Beauchamp, C., Goussard, N., Chabot, R., and Lalande, R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant and Soil. 204: 57-67.

6.Attoe, O.J., and Olsen, R.A. 1966. Factors affecting the rate of oxidation of elemental sulfur and that added in rock phosphate sulfur fusion. Soil Sci. 101: 317-324.

7.Biswas, J.C., Ladha, J.K., and Dazzo, F.B. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. Soil Sci. Soc. Amer. J. 64: 1644-1650.

8.Cotteni, A. 1980. Methods of plant analysis. In: Soil and Plant Testing FAO Soils Bulletin. 38: 2. 64-100.

9.Dakora, F.D. 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. New Phytol. 158: 39-49.

10.De Freitas, J.R., Banerjee, M.R., and Germida, J.J. 2007. Phosphate solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola. Boil. Fertile. Soil. 24: 358-364.

11.Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M., and Chauhan, S.M. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting Rhizobacteria. Microbiol. Res. 159: 371-394.

12.Etesami, H., Alikhani, H.A., and Ali Akbari, A. 2009. Evaluation of Plant Growth Hormones Production (IAA) Ability by Iranian Soils Rhizobial Strains and Effects of Superior Strains Application on Wheat Growth Indexes. World Appl. Sci. J. 6: 11. 1576-1584.

13.Fankem, H., Nwaga, D., Deubel, A., Dieng, L., Merbach, W., and Etoa, F.X. 2006. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon. Afric. J. Biotech. 5: 2450-2460.

www.SID.ir

Archive of SID

14. 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.
15. Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. Am. J. Altern. Agric. 1: 51-57.
16. Gulati, A., Rahi, P., and Vyas, P. 2009. Plant Growth-Promoting and Rhizosphere-Competent *Acinetobacter* rhizosphaerae Strain BIHB 723 from the Cold Deserts of the Himalayas. Curr. Microbiol. 58: 371-377.
17. Khan, M., Zaidi, A., Wani, P.A., and Oves, M. 2009. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. Environ. Chem. Lett. 7: 1-19.
18. Khosravi, H., Alikhani, H., and Yakhchali, B. 2007. Evaluation the ACC deaminase in some native Rhizobia of Iran. 10th soil science concrete in Iran. Tehran University, Karaj, Pp: 115-116.
19. Kloepper, J.W., and Schroth, M.N. 1998. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes in: Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria. Vol 2. Station de Pathologie Végétable et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France, Pp: 879-882.
20. Krishnaveni, M.S. 2010. Studies on Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB) in Rhizosphere and Non-Rhizosphere Soils in Different Varieties of Foxtail Millet (*Setaria italic* L.). Int. J. Agric. Food Sci. Tech. 1: 1. 23-39.
21. Li, Q., Saleh-Lakha, S., and Glick, B.R. 2005. The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. Can. J. Microbiol. 51: 511-514.
22. Ma, W., Penrose, D.M., and Glick, B.R. 2002. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. Can. J. Microbiol. 48: 947-957.
23. Ma, W., Sebestianova, S.B., Sebestian, J., and Burd, G.I. 2003. Prevaleance of ACC- deaminase in *Rhizobium spp*. Antonie van Leeuwenhoek. 83: 285-291.
24. Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiol. Biochem. 42: 565-572.
25. Ostwal, K.P., and Bhide, V.P. 1972. Solubilization of tricalcicum phosphate by soil *Pseudomonas*. Indian. J. Exp. Biol. 10: 153-154.
26. Pal, K.K., Tilak, K.V.B.R., Saxena, A.K., Dey, R., and Singh, C.S. 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol. Res. 156: 209-223.
27. Patten, C., and Glick, B. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3- acetic acid. Can. J. Microbiol. 42: 207-220.

www.SID.ir

Archive of SID

28. 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.
29. Penrose, D.M., and Glick, B.R. 2001. Levels of ACC and related compounds in exudates and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth promoting bacteria. Can. J. Microbiol. 47: 368-372.
30. Perez, E., Miguel, S., Marıa, M.B., and Yarzabal, L.A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. Soil Biol. Biochem. 39: 2905-2914.
31. Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P. 2001. The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms, P 1-17. In: The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface.
32. Ramazaneean, A., Alikhani, H., Saleh-Rastin, N., and Lakzian, A. 2007. Evaluation the ACC deaminase production in some native Rhizobia of Iranian soils. J. Sci. Agric. 21: 2. 47-53.
33. Rashid, M.S., Khalil, N., Ayub, S., Alam, S., and Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pak. J. Biol. Sci. 7: 187-196.
34. Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., and Antoun, H. 2001. Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV-induced mutants of *Penicillium regulosum*. Soil Biol. Biochem. 33: 1741-1747.
35. Seilsepour, M., Baniani, E., and Kianirad, M. 2002. Effect of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSM) in reducing the rate of phosphate fertilizers application to cotton crop. Proceedings of the 15th International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization Salamanca University, 16-19 July. Salamanca, Spain.
36. Shahzad, S.M., Khalid, A., and Arshad, M. 2010. Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. Soil Environ. 29: 1. 38-46.
37. Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatit solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aust. J. Agric. Res. 9: 778.
38. Srideve, M., and Mallaiah, K.V. 2007. Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. Iran. J. Biotechnol. 5: 3. 178-182.
39. Vassilev, N., Vassileva, M., and Nikolaeva, I. 2006. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Appl. Microbiol. Biotech. 71: 137-144.

www.SID.ir

Archive of SID

40. Vikram, A., Alagawadi, A.R., Hamzehzarghani, H., and Krishnaraj, P.U. 2007. Factors Related to the Occurrence of Phosphate Solubilizing Bacteria and Their Isolation in Vertisols. Int. J. Agric. Res. 2: 7. 571-580.
41. Werner, D. 2004. Signalling in the rhizobia-legumes symbiosis, P 99-119. In: Plant surface microbiology.
42. Yasmin, F., Othman, R., and Mohad, S.S. 2007. Effect of GPGR inoculation on growth and yield of Sweep potato. J. Biol. Sci. 2: 421-424.
43. Zahir, A.A., Arshad, M., and Frankenberger, W.T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Adv. Agron. 81: 97-168.
44. Zehnder, G.W., Murphy, J.F., Sikora, E.J., and Kloepper, J.W. 2001. Application of rhizobacteria for induced resistance. Eur. J. Plant Pathol. 107: 39-50.

www.SID.ir

Archive of SID

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 4(2), 2014
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Evaluation of plant growth promoting characteristics of some Rhizobia isolated from soils of Iran

D. Saghafi[1], *H.A. Alikhani[2] and B. Motesharezadeh[3]
[1]M.Sc. Student, Dept. of Sciences and Soil Engineering, University of Tehran,
[2]Professor, Dept. of Sciences and Soil Engineering, University of Tehran,
[3]Assistant Prof., Dept. of Sciences and Soil Engineering, University of Tehran
Received: 02/18/2013; Accepted: 11/17/2013

Abstract

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) is referred to a heterogeneous group of beneficial rhizosphere bacteria that could enhance plant yield through one or more mechanisms. In this study, some of Plant Growth Promoting Characteristics such as solubilizing of insoluble inorganic phosphate, ability to production of ACC-deaminase enzyme and auxin were evaluated in 60 Rhizobia (belonged to the species *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* and *Sinorhizobium meliloti*) selected from Gene Bank, Department of Soil Science, Tehran University. Results showed that all isolates have the ability to produce auxin, ranging from 0.45 to 10.86 mg/l averaged by 2.76. Also, 25 isolates (41.6%) showed the ability to produce ACC-transaminase. The results of evaluation of solubilizing of insoluble inorganic phosphate in sperber solid media revealed 73% of strains was able to phosphate solubilizing and the ratio of halo diameter to colony diameter was ranging from 1.05 to 2.07 in 12 day after incubation. Also, in sperber liquid media the amounts were between 3.2-158.6 mg/l after 120h of incubation. There was a significant negative correlation ($r= -0.906^{**}$) between solubilized Phosphorus and the final pH of the growth medium. In this study, isolates belonged to the species *Sinorhizobium meliloti* in all characteristics were powerful than the other isolates. So, it is suggested to select and prepare the inoculum superior isolates belonging to this species and to evaluate their effects for the promotion of quality yield of different agricultural crops, as a biologic alternative and environmental friendly.

Keywords: ACC-deaminase, Auxin, Phosphate solubilizing, Rhizobia

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

www.SID.ir