

## Investigating the Genetic Diversity of Wheat Growth Promoting Rhizosphere and Endophytic Bacteria

Hossein Ali Alikhani\*

Soli Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran, halikhan@ut.ac.ir

Somayeh Emami

Department of soil science, College of Agriculture and Natural Resource, University of Tehran, Iran, emamisomaye@ut.ac.ir

### Abstract

**Introduction:** The soil microbial community affects its fertility through the decomposition, mineralization, storage, and release of nutrients. Given the release of about 20-30% of photosynthetic materials in the rhizosphere, this environment has provided favorable conditions for the presence of microbial populations.

**Materials and methods:** The aim of this study was to investigate the potential of rhizosphere and endophytic bacterial isolates isolated from the roots of wheat plant in terms of plant growth promoting (PGP) traits to identify their 16S rRNA sequences. To this end, the isolated bacteria were first screened for the production of indole-3-acetic acid (IAA) in the presence of tryptophan in the culture medium, and then they were tested for their ability to dissolve inorganic and organic phosphates. In the next step, other growth promoting factors including siderophore production and ACC-deaminase were investigated.

**Results:** Among the isolates obtained from rhizosphere and intra-root of wheats, 15 rhizosphere and 7 endophyte isolates were selected based on their ability to induce growth promoting properties. A total of 7 isolates belonged to the *Bacillus*, 4 isolates to *Pseudomonas*, 2 isolates to *Staphylococcus*, 2 isolates to *Paenibacillus*, and the rest belonged to the genera *Sphingobacterium*, *Lysinibacillus*, *Advenella*, *Enterobacter*, *Variovorax*, and *Plantibacter*.

**Discussion and conclusion:** According to the obtained results, the dominant genera among the rhizosphere and endophyte isolates were *Pseudomonas* and *Bacillus*. Increased yield through increased nutrient bioavailability is the result of siderophore production, dissolution of insoluble inorganic and mineral phosphates, the production of growth factors and plant growth hormones, especially indole acetic acid, which can increase crop growth indices and yield. It also has to protect the environment and the plant.

**Key words:** Rhizospheric and Endophyte Bacteria, Wheat, Biofertilizer, Plant Growth Promoting Traits.

---

\* Corresponding author

Received: November 14, 2019/ Accepted: January 2, 2020

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله: پژوهشی)

سال نهم، شماره ۳۳، بهار ۱۳۹۹، صفحه ۲۵-۴۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۸/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۲۵

Doi: [10.22108/BJM.2020.120071.1236](https://doi.org/10.22108/BJM.2020.120071.1236)

## بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم

حسینعلی علیخانی\*: استادیار بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران، halikhan@ut.ac.ir  
سمیه امامی: دانش‌آموخته دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران، emamismaye@ut.ac.ir

### چکیده

**مقدمه:** جامعه میکروبی خاک بر حاصلخیزی آن از طریق تجزیه، معدنی کردن، ذخیره‌سازی و رهاسازی عناصر غذایی تأثیر می‌گذارد. با توجه به آزادسازی حدود ۲۰ تا ۳۰ درصد مواد فتوسنتزی در فراریشه (ریزوسفر) گیاه، این محیط شرایط مساعدی را برای حضور جمعیت میکروبی فراهم می‌کند.

**مواد و روش‌ها:** هدف پژوهش حاضر، بررسی پتانسیل جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست جداسازی شده از گیاه گندم به منظور بررسی ویژگی‌های محرک رشد و شناسایی توالی *16S rRNA* آنهاست؛ به این منظور، ابتدا باکتری‌ها از نظر تولید هورمون اکسین در محیط کشت حاوی ال-تریپتوفان غربال‌گری شدند و سپس توانایی آنها در انحلال فسفات‌های معدنی و آلی نامحلول ارزیابی شد. در ادامه پژوهش، سایر مؤلفه‌های محرک رشد گیاه از جمله توان تولید سیدروفور و آنزیم ACC-دآمیناز بررسی شدند.

**نتایج:** از میان جدایه‌های به دست آمده از فراریشه و درون‌ریشه، تعداد ۱۵ جدایه فراریشه‌ای و تعداد ۷ جدایه درون‌رست بر اساس توانایی آنها در ایجاد ویژگی‌های محرک رشدی انتخاب شدند. در مجموع، ۷ جدایه به *Bacillus*، ۴ جدایه به *Pseudomonas*، ۲ جدایه به *Staphylococcus*، ۲ جدایه به *Paenibacillus* و سایر جدایه‌ها به جنس‌های *Sphingobacterium*، *Lysinibacillus*، *Advenella*، *Enterobacter*، *Variovorax* و *Planibacter* تعلق داشتند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج، جنس‌های غالب در میان جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم از نوع *Bacillus* و *Pseudomonas* بودند. افزایش عملکرد از طریق افزایش زیست‌فراهمی عناصر غذایی در نتیجه تولید سیدروفور، انحلال فسفات‌های نامحلول آلی و معدنی، تولید عوامل رشد و تولید هورمون‌های محرک رشد گیاهان به ویژه ایندول-۳-استیک اسید است که موجب افزایش شاخص‌های رشد و عملکرد محصول می‌شود و حفظ سلامت محیط‌زیست و گیاه را در پی دارد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست، گندم، کود زیستی، مؤلفه‌های محرک رشد گیاه

\* نویسنده مسئول مکاتبات

## مقدمه

فراریشه<sup>۱</sup> محل زندگی طیف متنوعی از ریزسازواره‌ها و به‌ویژه باکتری‌هاست که ممکن است برای رشد گیاه مفید، مضر یا بی‌تأثیر باشند. باکتری‌های مفید این منطقه به ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه<sup>۲</sup> موسومند که توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند؛ این باکتری‌ها با استفاده از یک یا چند سازوکار خاص سبب بهبود رشد گیاه می‌شوند. جوامع میکروبی این منطقه تفاوت بسیار زیادی از نظر کمی و کیفی با جوامع میکروبی توده خاک دارند. این باکتری‌ها در طیف وسیعی از گیاهان زراعی به‌منظور افزایش رشد از طریق افزایش دانه در گیاه، وزن کل اندام‌های گیاهی، عملکرد و کنترل بیماری‌ها استفاده می‌شوند. استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد در کشاورزی در حال افزایش است و روش مناسبی را برای جایگزینی یا مکمل کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها در راستای جلوگیری از آلودگی‌های زیست‌محیطی ارائه می‌کند (۱).

سازوکارهایی که باکتری‌های محرک رشد از طریق آنها بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارند، به آثار مستقیم و غیرمستقیم تقسیم می‌شوند (۲): اثر غیرمستقیم بیشتر از طریق تولید متابولیت‌های میکروبی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها، سیدروفورها، آنزیم‌ها، سیانیدیدروژن<sup>۳</sup> و ... است که اثر منفی بر عوامل بیماری‌زا دارند و با ممانعت از رشد ریزسازواره‌های بیماری‌زا سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند؛ اما اثر مستقیم آنها از راه تولید هورمون‌های گیاهی، تسهیل جذب عناصر غذایی، تثبیت نیتروژن مولکولی، کاهش پتانسیل غشای ریشه‌ها، سنتز برخی آنزیم‌ها از جمله ACC-دآمیناز<sup>۴</sup> که آثار سوء اتیلن تنشی در گیاه را تعدیل می‌کنند و همچنین، انحلال

فسفات معدنی و آلی به‌شکل قابل‌استفاده برای گیاهان است (۳).

گزارش‌های متفاوتی به توانایی گونه‌های مختلف باکتری در ایجاد ویژگی‌های محرک رشد اشاره کرده‌اند و در بین باکتری‌های دارای این قابلیت، جنس‌های *Rhizobium*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Burkholderia*، *Pantoea*، *Agrobacterium* و *Achromobacter* مشهور شده می‌شوند (۳ و ۴). رابطه گیاهان و باکتری‌های محرک رشد، رابطه‌ای هم‌افزایی یا تشدیدشونده در طبیعت شناخته می‌شود؛ زیرا از یک سو، باکتری شکل قابل‌جذب عناصر را برای گیاه فراهم می‌کند و از سوی دیگر، گیاه ترکیبات کربنه لازم برای رشد باکتری را از طریق ترشحات ریشه خود آزاد می‌کند. از آنجا که ریشه عناصر غذایی ضروری گیاه را از خاک جذب می‌کند، توسعه سیستم ریشه پیش‌نیاز افزایش رشد و نمو گیاه به شمار می‌آید؛ تعداد زیادی از باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق تولید هورمون‌های گیاهی سبب افزایش رشد ریشه گیاه می‌شوند (۵). اگر تحریک حداکثری رشد ریشه گیاه از طریق باکتری‌های محرک رشد گیاه در مزارع انجام شود، باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند روش‌های سودمندی برای افزایش جذب عناصر غذایی باشند (۶)؛ از این رو، باکتری‌های مولد اکسین‌های ایندولی از طریق افزایش رشد طولی ریشه‌ها و گسترش سیستم ریشه‌ای گیاه گندم می‌توانند سطح تماس ریشه گیاه با ماتریکس خاک و درنهایت، سطح جذب عناصر غذایی را به گونه‌ای افزایش دهند که بتوان از آنها در افزایش بهره‌وری کودهای شیمیایی (در خاک‌های نسبتاً حاصلخیز) یا حداقل مکمل کودهای شیمیایی (در خاک‌های فقیر) استفاده کرد.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست ریشه

**گیاه گندم:** به منظور جداسازی باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم در پژوهش حاضر، نمونه برداری از خاک فراریشه گندم مزرعه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در محمدمشهر کرج انجام شد. تعداد ۸ نمونه از گیاهان سالم گندم در مرحله رشد رویشی (مرحله گرده‌افشانی) به طور تصادفی از موقعیت‌های مختلف مزرعه جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه انتقال یافتند تا برای جداسازی خالص سازی باکتری‌ها استفاده شوند. به منظور جداسازی باکتری‌های درون‌رست ریشه، ابتدا ریشه‌ها کاملاً با آب معمولی شستشو شدند و سپس عمل شستشو چندین بار با آب مقطر تکرار شد تا تمام ذرات خاک باقیمانده از سطح ریشه‌ها حذف شوند؛ در نهایت، ریشه‌ها روی دستمال کاغذی استریل گذاشته شدند تا رطوبت اضافی آنها حذف شود و در ادامه، ریشه‌ها با تیغ به قطعه‌های ۲ تا ۳ سانتی‌متری استریل بریده شدند. ریشه‌ها با الکل و هیپوکلریت سدیم ضد عفونی سطحی شدند و سپس به منظور حذف هیپوکلریت سدیم، ریشه‌ها ده بار با آب مقطر استریل شستشو شدند؛ در تمام مراحل، شرایط استریل حفظ شد. به منظور اطمینان یافتن از درستی عملیات ضد عفونی سطحی ریشه‌ها، قطعه‌هایی از ریشه استریل شده روی سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار گذاشته شدند و حدود دو قطره از آب شستشوی نهایی نیز روی این ظرف‌های پتری پخش شد و ظرف‌ها به مدت ۵ روز درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گذاشته شدند. قطعه‌های ریشه به مدت ۱۰ دقیقه با هاون استریل در محلول سرم فیزیولوژی (سدیم کلرید ۰/۸۵ درصد) خرد و له شدند و سپس تمام محتویات خرد شده به ارلن حاوی

علاوه بر باکتری‌های فراریشه‌ای محرک رشد گیاه، باکتری‌هایی از این نوع وجود دارند که به طور اختصاصی به بخش درونی گیاه از جمله بذر، ریشه، میوه و ساقه نفوذ می‌کنند و در این مکان‌ها مستقر می‌شوند؛ این ریزسازواره‌ها به طور معمول آنزیم‌های حل‌کننده دیواره سلولی برای نفوذ در این اندام‌ها را دارند (۷). جمعیت باکتری‌های درون‌رست<sup>۵</sup> ریشه بیشتر از جمعیت آنها در سایر اندام‌های گیاه (ساقه، برگ و ...) است و به طور میانگین، جمعیت این باکتری‌ها برای ریشه گیاهان مختلف حدود ۱۰<sup>۵</sup> واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در گرم خاک برآورد شده است (۸).

فراریشه گیاه منبع اولیه باکتری‌های درون‌رست است؛ به عبارتی، بیشتر باکتری‌های درون‌رست از فراریشه منشأ می‌گیرند و بنابراین، تسلسلی از ریزسازواره‌های همراه با ریشه گیاه از فراریشه به محیط اطراف ریشه (ریزوپلن) و از محیط اطراف ریشه به اپیدرم و پوست وجود دارد؛ این پیوستگی از آندودرم به آوندهای چوبی ریشه و از آوندهای چوبی ریشه به آوندهای چوبی ساقه نیز وجود دارد (۷) و بنابراین، ترکیب جمعیتی درون‌رست‌ها به ترکیب جمعیتی باکتری‌های مستقر در فراریشه گیاه بستگی دارد. معمولاً جمعیت بیشتری از باکتری‌ها در فراریشه نسبت به درون‌رست‌ها وجود دارد و این باکتری‌های درون‌رستی موجب افزایش مقاومت سیستمیک در برابر بیماری‌های گیاهی یا افزایش رشد گیاه می‌شوند. اگرچه ویژگی‌های محرک رشدی بین باکتری‌های فراریشه و درون‌رست ممکن است مشابه باشند، بیشتر پژوهش‌ها در زمینه باکتری‌های فراریشه نسبت به درون‌رست انجام شده‌اند (۹). با نگاه به توانایی باکتری‌های درون‌رست در بهبود و افزایش رشد گیاه و نیز نبود آگاهی‌های کافی از فراوانی این باکتری‌ها در گیاه گندم، انجام پژوهش در این زمینه ضروری به نظر می‌رسد.

سرعت چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. پس از گذشت این مدت، سوسپانسیون‌های یادشده سانتریفیوژ شدند و سپس محلول رویی به نسبت ۱:۱ با معرف سالکوفسکی مخلوط و محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار تولید اکسین هر جدایه از مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه‌شده از غلظت‌های صفر تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

در مرحله بعد، محیط کشت اسپربر<sup>۷</sup> (۱۹۵۸) شامل ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۳۲ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۱۴ گرم در لیتر کلرید کلسیم، ۲/۵ گرم در لیتر تری کلسیم فسفات، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و اسیدیته ۷/۲ برای بررسی توان جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رستی در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول استفاده شد (۱۲). ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط نوترینت‌براث کشت شدند. به منظور تشخیص نیمه کمی توان حل فسفات، ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری به روش قطره گذاری<sup>۸</sup> روی ظرف‌های پتری حاوی محیط جامد اسپربر کشت شد و ظرف‌های پتری تلقیح‌شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ایجاد هاله شفاف پیرامون کلنی باکتری نشانه حل فسفات در نظر گرفته شد. قطر کلنی رشد یافته و قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات در اطراف هر کلنی به دقت اندازه‌گیری شد. (۱۲). توان انحلال فسفات‌های نامحلول آلی با استفاده از محیط کشت اصلاح‌شده اسپربر تعیین شد که در آن به جای ترکیب شیمیایی تری کلسیم فسفات از منبعی آلی به نام اینوزیتول‌هگزا فسفات استفاده شد. به منظور انجام آزمون کمی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول از محیط کشت

۹۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل منتقل و به مدت ۴۵ دقیقه روی شیکر گذاشته شد. پس از تهیه رقت‌های ده‌دهی از نمونه، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های  $10^{-2}$  تا  $10^{-7}$  روی پلیت‌های حاوی محیط کشت پخش شد. به منظور جداسازی باکتری‌های فراریشه‌ای، ۱۰ گرم خاک فراریشه‌ای به ارلن‌های حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر گذاشته شد. تهیه سری‌های رقت برای خاک فراریشه مشابه با سری‌های رقت ریشه‌ها انجام شد (۱۰). پلیت‌های تلقیح‌شده به مدت ۳ تا ۵ روز به طور واژگون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور گرماگذاری شدند؛ سپس کلنی‌های ظاهر شده روی ظرف‌های پتری جداسازی و مراحل خالص‌سازی این جدایه‌ها پس از کشت دوباره روی همان محیط از طریق باز کشت انجام شدند.

#### غربال‌گری جدایه‌ها از نظر فعالیت‌های محرک رشد

**گیاه:** جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رستی جداسازی‌شده از گیاه گندم به منظور تعیین ویژگی‌های محرک رشد گیاه ارزیابی شدند. اندازه‌گیری کمی تولید ایندول استیک اسید (اکسین) به روش بریک<sup>۹</sup> و همکاران (۱۹۹۱) در محیط کشت مایع رنگی در نتیجه استفاده از محلول سالکوفسکی و با خواندن عدد دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (۱۱). به منظور انجام این آزمون، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع نوترینت‌براث حاوی ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان درون هر ارلن ریخته شد و پس از استریل کردن آن، محتوای هر ارلن با یکی از جدایه‌های مدنظر تلقیح شد. ارلن‌های یادشده با ورقه آلومینیومی پوشانده شدند و به مدت ۷۲ ساعت برای باکتری‌های تندرشد و تا ۱۲۰ ساعت (برای انواع کندرشد) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با

به‌طور مجزا اتوکلاو و تا دمای حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد می‌شود. تمام محلول‌های لازم برای ساخت این معرف رنگی باید تازه تهیه شوند.

۲- محلول بافر: به‌منظور تهیه این محلول، ۳۰/۲۴ گرم از بافر<sup>۱۱</sup> Pipes در ۷۵۰ میلی‌لیتر از محلول حاوی ۰/۳ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۰/۵ گرم  $\text{NaCl}$  و ۱ گرم  $\text{NH}_4\text{Cl}$  حل می‌شود. اسیدیته محیط با محلول  $\text{KOH}$  ۵۰ درصد روی ۶/۸ تنظیم و حجم بافر با اضافه کردن آب به ۸۰۰ میلی‌لیتر رسانده می‌شود. پس از اضافه کردن ۱۵ گرم آگار به این محیط بافر و استریل کردن آن در اتوکلاو، دمای آن به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسانده می‌شود.

۳- محلول غذایی: این محلول حاوی ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانتیول، ۴۹۳ میلی‌گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۱ میلی‌گرم  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۴ میلی‌گرم  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ، ۰/۰۴ میلی‌گرم  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ، ۱/۲ میلی‌گرم  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و ۱ میلی‌گرم  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  در ۷۰ میلی‌لیتر آب است که پس از اتوکلاو به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسانده می‌شود.

۴- محلول کازامینو اسید: ۳۰ میلی‌لیتر از محلول کازامینو اسید (۱۰ درصد) به روش صاف کردن روی صافی غشایی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر استریل می‌شود. پس از آماده‌شدن چهار محلول یادشده، محلول‌های غذایی ۳ و ۴ به محلول بافر شماره ۲ اضافه می‌شوند و ضمن هم‌زدن آرام و مداوم مخلوط آنها و بدون ایجاد حباب، محلول معرف رنگی به آهستگی به آنها اضافه می‌شود. مخلوط چهار محلول پس از یکنواخت شدن و بر حسب شیوه کشت در ظرف‌های استریل توزیع می‌شود.

پلیت‌های حاوی محیط CAS- آگار پس از انجماد به چهار بخش مساوی تقسیم شدند. مقدار ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هریک از جدایه‌های مطالعه‌شده با

اسپربر مایع استفاده شد. پس از یکسان کردن جمعیت باکتری‌ها در محیط مایع نوترینت‌براث، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع منتقل شد و سپس نمونه‌های مایع به مدت ۱۲۰ ساعت روی شیکر انکوباتور (۱۲۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند؛ در مرحله بعد، اسیدیته نمونه‌ها تعیین و بی‌درنگ سوسپانسیون باکتری‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات- وانادات مخلوط شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه، میزان جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خواننده و مقدار فسفر آزادشده (محلول) از هر جدایه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده از غلظت‌های مختلف  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  محاسبه شد (۱۲).

توان تولید سیدروفور روی محیط کشت پایه‌ای به نام کروم آزول-اس<sup>۹</sup> (CAS) بررسی شد (۱۳). محیط کشت پایه کروم آزول-اس که به‌طور جامد درون ظرف‌های پتری استفاده می‌شود، از این پس با نام محیط CAS- آگار نشان داده می‌شود. به‌منظور تهیه محیط یادشده، چهار محلول زیر به‌طور مجزا تهیه، استریل و سپس باهم مخلوط شدند.

۱- محلول معرف رنگی: به‌منظور تهیه این محلول، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول حاوی آهن (۱ میلی‌مول  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  در ۱۰ میلی‌مول  $\text{HCl}$ ) با ۵۰ میلی‌لیتر از محلول CAS (۱/۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب) به آرامی مخلوط می‌شود. این مخلوط که به رنگ ارغوانی تیره است، به آهستگی و در حال هم‌زدن مداوم به ۴۰ میلی‌لیتر از محلول HDTMA<sup>۱۰</sup> (۱/۲۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب) اضافه می‌شود. محلول حاصل با رنگ آبی تیره و پایدار

استریل کردن آن درون اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ بار، محیط کشت ضد عفونی شده درون ظرف‌های پتری ۸ سانتی‌متری توزیع و به چهار بخش مساوی تقسیم شد. سه سری پلیت دارای محیط کشت DF برای انجام این آزمایش استفاده شد:

۱- ظرف‌های پتری دارای محیط کشت DF و ACC؛  
به این ترتیب که در آخرین مرحله انجام کار و دقیقاً پیش از مایه‌زنی، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ACC (۰/۳ مولار) به عنوان تنها منبع نیتروژنی به سطح هر ظرف پتری حاوی محیط کشت DF اضافه شد.

۲- شاهد مثبت: ظرف‌های پتری دارای محیط کشت DF و سولفات آمونیوم  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ؛

در این مرحله نیز مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۳ مولار سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژنی پایه به سطح هر ظرف پتری حاوی محیط کشت DF اضافه شد.

۳- شاهد منفی: ظرف‌های پتری دارای محیط کشت DF بدون هر گونه منبع نیتروژنی (بدون ACC و  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

پشت هر ظرف پتری، چهار نقطه با فواصل یکسان از هم نشانه‌گذاری شدند و در هر نقطه، مقدار ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌ها با دستگاه میکروسپلر در سه تکرار مایه‌کوبی شد. محیط‌های مایه‌کوبی شده به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار داده شدند و پس از ۵ روز، میزان رشد جدایه‌ها ارزیابی شد.

**شناسایی مولکولی جدایه‌ها:** DNA باکتری با استفاده از کیت شرکت کیاژن استخراج و  $\text{PCR}^{16}$  به منظور تکثیر توالی ژن رمزکننده *16S rRNA* انجام شد. آغاز گرهای 27F و 1520R برای دستیابی به ناحیه بارکد ژن رمزکننده *16S rRNA* باکتری‌های مطالعه‌شده استفاده شدند (جدول

جمعیت تنظیم‌شده  $(10^8 \times 5)$  واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در میلی‌لیتر) به روش قطره‌گذاری در وسط هر بخش تلقیح شد؛ هم‌زمان با تلقیح این جدایه‌ها، تلقیح از جدایه‌های شناخته‌شده تولیدکننده سیدروفور برای شاهد مثبت در همان محیط کشت انجام شد. پلیت‌های تلقیح‌شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور با توجه به تغییر رنگ محیط CAS- آگار از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی‌رنگ تشکیل‌شده اطراف کلنی باکتری‌ها در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ارزیابی شد؛ همچنین قطر کلنی باکتری و نسبت قطر هاله به کلنی تعیین شد.

توانایی تولید آنزیم ACC- دامیناز<sup>۱۲</sup> به‌طور کیفی و به روش پنروز<sup>۱۳</sup> و گلیک<sup>۱۴</sup> (۲۰۰۳) تعیین شد (۱۴). با توجه به اینکه قابلیت ماندگاری ACC در دمای محیط بسیار کم است، پیش از آغاز آزمایش، محلول ACC با غلظت ۰/۳ مولار تهیه و از صافی ۰/۲۵ میکرومتر استریل عبور داده شد؛ سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول استریل‌شده ACC درون لوله‌های اپندورف (۰/۵ میلی‌لیتری استریل) توزیع شد و بی‌درنگ درون فریزر (در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. پس از افزودن آگار به محیط کشت DF<sup>۱۵</sup> (شامل ۴ گرم درلیتر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۶ گرم درلیتر  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۰/۲ گرم درلیتر  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۲ گرم درلیتر گلوکز، ۲ گرم درلیتر گلوکونیک‌اسید، ۲ گرم درلیتر سیتریک‌اسید و عناصر ریزمغذی شامل ۱ میلی‌گرم درلیتر  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۰ میکروگرم درلیتر  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ، ۱۰ میکروگرم درلیتر  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۱۲۴/۶ میکروگرم درلیتر  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۷۸/۲ میکروگرم درلیتر  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  و ۱۰ میکروگرم درلیتر  $\text{MoO}_3$  و اسیدیتة نهایی (۷/۲ و

استفاده از BigDye terminator دستگاہ Sequencer استفاده شد (۱۵). توالی‌های به‌دست‌آمده پس از مشاهده با نرم‌افزار Chromas 2.1 اصلاح و تأیید شدند. این توالی‌ها با نرم‌افزار ClustalW هم‌ردیف‌سازی و با نرم‌افزار Bioedit 7.0.9 به فرمت‌های قابل استفاده تبدیل شدند (۱۶). توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR با توالی نوکلئوتیدهای موجود در GenBank مقایسه و درخت فیلوژنیک به روش Neighbor Joining با نرم‌افزار Mega 5 رسم شد. توالی‌های نوکلئوتیدهای موجود در GenBank که شباهت زیادی با توالی نوکلئوتیدهای جدایه‌های مطالعه‌شده داشتند، گزارش شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده در مطالعه حاضر به پایگاه داده‌های GenBank ارسال و با شماره دسترسی‌های مختلف ثبت شد.

۱). به‌منظور تکثیر این جایگاه‌ها طی واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر از ترکیبات مندرج در جدول ۲ بر اساس اصول و قوانین استاندارد PCR بدون وجود آلودگی بین‌نمونه‌ای استفاده شد؛ در این راستا، ابتدا به‌منظور یکسان‌سازی شرایط تکثیر برای تمام نمونه‌ها، مخلوط اصلی حاوی تمام ترکیبات به‌جز DNA نمونه‌ها ساخته شد و در نهایت، مقدار حداقل ۱۰۰ نانوگرم DNA در واکنش استفاده شد. برنامه دمایی به‌کاررفته برای PCR هر کدام از سه جایگاه در جدول ۳ آورده شده است. محصول PCR برای بررسی الگوی بانندی و ارزیابی نتایج روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد؛ به این منظور و برای تعیین توالی قطعه‌های تکثیرشده، محصول PCR درون چاهک‌های ژل آگارز ۱ درصد قرار داده شد و پس از استخراج باند مدنظر از ژل به روش سامبورک<sup>۱۷</sup> و همکاران (۲۰۰۱)، به‌منظور تعیین توالی دوطرفه با

جدول ۱- اطلاعات جایگاه و آغازگرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر

نام جایگاه	محصول PCR (جفت باز)	نام آغازگر	توالی آغازگر (3'-5')
16S rRNA	1400	27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
		1520R	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA

جدول ۲- غلظت مواد شیمیایی به‌کاررفته در PCR

غلظت نهایی	مقدار هر واکنش	غلظت اولیه	مواد شیمیایی
1X	5 μl	10X	10X PCR buffer
2mM	4 μl	25 mM	MgCl <sub>2</sub>
100 μM	4 μl	1.25 mM	dNTP mix
0.5 μM	2.5 μl	10 μM	Forward Primer
0.5 μM	2.5 μl	10 μM	Reverse Primer
0.02 units/μl	1 μl	1 unit/μl	Taq DNAPolymerase
0.6 - 1.2 ng/μl	1 μl	30 - 60 ng/μl	Template DNA
-----	30 μl	-----	Sterile ddH <sub>2</sub> O

جدول ۳- برنامه دمایی تکثیر جایگاه 16S rRNA در جدایه‌های مطالعه‌شده

توضیحات	برنامه دمایی PCR	جایگاه
باند ۱۴۰۰ جفت بازی تکثیر می‌شود.	95°C for 5 min 35 cycles: 95°C for 40s 60°C for 40s 72°C for 2 min 72°C for 5 min	16S rRNA



## نتایج

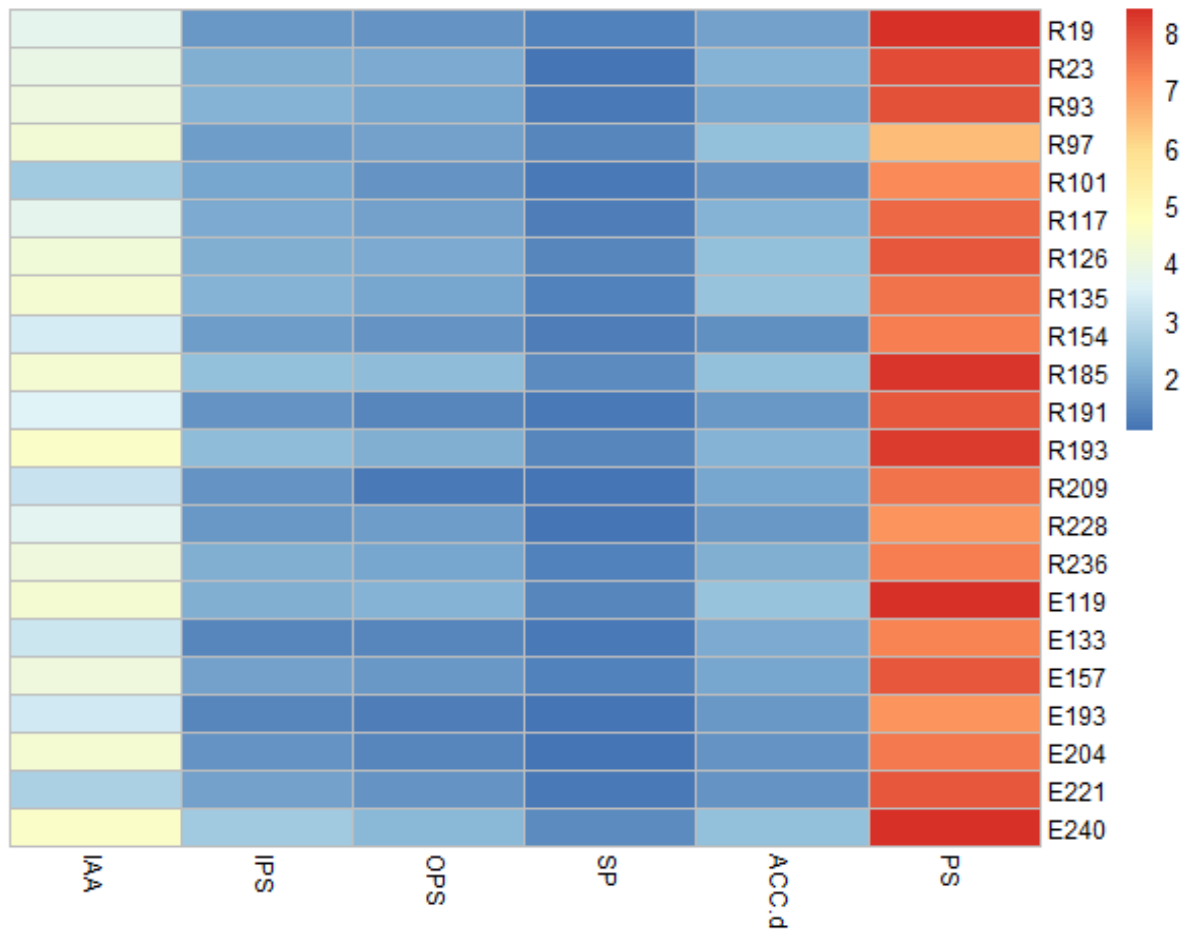
از میان جدایه‌های به دست آمده از فراریشه و درون‌رست ریشه، تعداد ۱۵ جدایه فراریشه‌ای و تعداد ۷ جدایه درون‌رست بر اساس توانایی آنها در ایجاد ویژگی‌های محرک رشدی انتخاب شدند. نتایج ارزیابی توانایی باکتری‌های برگزیده از نظر داشتن ویژگی محرک رشد گیاه در جدول ۴ و شکل ۱ نشان داده شده‌اند. تمام سویه‌های منتخب ویژگی‌های

محرک رشد گیاه را داشتند، اگرچه میزان توانایی آنها باهم متفاوت بود. باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست از نظر مقدار تولید هورمون اکسین با یکدیگر تفاوت داشتند و این سویه‌ها توانستند هورمون اکسین را در محدوده ۴/۹ تا ۲۲/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تولید کنند؛ بیشترین مقدار تولید این هورمون در سویه فراریشه‌ای R193 (۲۲/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تعیین شد.

جدول ۴- ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های برتر فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم

اسیدیته محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات	میزان انحلال فسفات نامحلول معدنی (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	تولید ACC- دآمیناز (قطر کلنی، میلی‌متر)	تولید سیدروفور (قطر هاله به کلنی)	حلالیت فسفات آلی نامحلول (قطر هاله به قطر کلنی)	حلالیت فسفات معدنی نامحلول (قطر هاله به قطر کلنی)	اکسین (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	جدایه
۶/۶±۰/۲	۱۶±۱	-	-	-	-	-	شاهد
۴/۳±۰/۱ <sup>g</sup>	۳۲۶±۶ <sup>a</sup>	۲/۵±۰/۴ <sup>de</sup>	۱/۵±۰/۲ <sup>b-d</sup>	۲/۰±۰/۱ <sup>j</sup>	۲/۳±۰/۲ <sup>j-i</sup>	۱۲/۰±۰/۳ <sup>g</sup>	R19
۵/۲±۰/۱ <sup>c</sup>	۲۵۲±۴ <sup>d</sup>	۳/۴±۰/۲ <sup>b</sup>	۱/۲±۰/۱ <sup>cd</sup>	۳/۰±۰/۰ <sup>cd</sup>	۳/۲±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱۳/۶±۰/۵ <sup>f</sup>	R23
۵/۳±۰/۱ <sup>c</sup>	۲۴۳±۳ <sup>c</sup>	۲/۸±۰/۲ <sup>cd</sup>	۱/۳±۰/۱ <sup>cd</sup>	۲/۷±۰/۱ <sup>d-f</sup>	۳/۳±۰/۱ <sup>c</sup>	۱۵/۵±۰/۴ <sup>e</sup>	R93
۶/۵±۰/۱ <sup>a</sup>	۸۴±۵ <sup>l</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۶±۰/۱ <sup>a-c</sup>	۲/۶±۰/۱ <sup>e-g</sup>	۲/۴±۰/۱ <sup>h</sup>	۱۸/۳±۰/۳ <sup>bc</sup>	R97
۶/۱±۰/۱ <sup>bc</sup>	۱۴۵±۱ <sup>j</sup>	۱/۲±۰/۱ <sup>e</sup>	۱/۳±۰/۱ <sup>cd</sup>	۲/۱±۰/۱ <sup>ij</sup>	۲/۷±۰/۱ <sup>ef</sup>	۴/۹±۰/۵ <sup>k</sup>	R101
۵/۸±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱۸۹±۵ <sup>e</sup>	۳/۳±۰/۲ <sup>b</sup>	۱/۴±۰/۱ <sup>cd</sup>	۲/۵±۰/۱ <sup>h</sup>	۲/۹±۰/۰ <sup>de</sup>	۱۲/۱±۰/۵ <sup>g</sup>	R117
۵/۴±۰/۱ <sup>e</sup>	۲۲۶±۵ <sup>f</sup>	۴/۱±۰/۲ <sup>a</sup>	۱/۶±۰/۱ <sup>a-c</sup>	۲/۹±۰/۱ <sup>d</sup>	۳/۲±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱۷/۲±۰/۳ <sup>cd</sup>	R126
۵/۸±۰/۱ <sup>c</sup>	۱۷۶±۲ <sup>h</sup>	۴/۳±۰/۱ <sup>a</sup>	۱/۵±۰/۱ <sup>b-d</sup>	۲/۷±۰/۱ <sup>d-f</sup>	۳/۳±۰/۱ <sup>c</sup>	۱۹/۳±۰/۳ <sup>b</sup>	R135
۵/۹±۰/۱ <sup>bc</sup>	۱۵۷±۲ <sup>i</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۴±۰/۰ <sup>cd</sup>	۲/۰±۰/۰ <sup>j</sup>	۲/۴±۰/۱ <sup>h</sup>	۹/۳±۰/۱ <sup>i</sup>	R154
۴/۵±۰/۱ <sup>g</sup>	۲۹۹±۲ <sup>b</sup>	۴±۰/۳ <sup>a</sup>	۱/۸±۰/۱ <sup>a</sup>	۳/۸±۰/۱ <sup>a</sup>	۴/۰±۰/۲ <sup>b</sup>	۱۹/۲±۰/۱ <sup>b</sup>	R185
۵/۴±۰/۱ <sup>e</sup>	۲۲۴±۲ <sup>f</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۳±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱/۶±۰/۲ <sup>kl</sup>	۲/۱±۰/۱ <sup>h</sup>	۱۰/۵±۰/۴ <sup>h</sup>	R191
۵/۷±۰/۱ <sup>f</sup>	۲۹۰±۵ <sup>c</sup>	۳/۴±۰/۳ <sup>b</sup>	۱/۶±۰/۱ <sup>a-c</sup>	۳/۲±۰/۲ <sup>bc</sup>	۳/۹±۰/۱ <sup>b</sup>	۲۲/۶±۰/۹ <sup>a</sup>	R193
۵/۷±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱۷۴±۵ <sup>h</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۲±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱/۳±۰/۱ <sup>l</sup>	۲/۰±۰/۱ <sup>ig</sup>	۷/۸±۰/۳ <sup>j</sup>	R209
۶/۲±۰/۱ <sup>b</sup>	۱۲۸±۴ <sup>k</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۲±۰/۱ <sup>cd</sup>	۲/۴±۰/۱ <sup>hi</sup>	۲/۳±۰/۰ <sup>g-i</sup>	۱۱/۶±۰/۴ <sup>hg</sup>	R228
۶±۰/۲ <sup>bc</sup>	۱۵۷±۳ <sup>i</sup>	۳/۲±۰/۲ <sup>bc</sup>	۱/۵±۰/۱ <sup>b-d</sup>	۲/۸±۰/۱ <sup>de</sup>	۳/۱±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱۶/۰±۰/۷ <sup>ed</sup>	R236
۴/۳±۰/۱ <sup>g</sup>	۳۲۳±۴ <sup>a</sup>	۴/۳±۰/۱ <sup>a</sup>	۱/۷±۰/۱ <sup>a-c</sup>	۳/۳±۰/۱ <sup>b</sup>	۳/۱±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱۹/۲±۰/۶ <sup>b</sup>	E119
۶±۰/۱ <sup>bc</sup>	۱۴۸±۲ <sup>j</sup>	۲/۹±۰/۲ <sup>b-d</sup>	۱/۳±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱/۶±۰/۱ <sup>kl</sup>	۱/۷±۰/۱ <sup>kj</sup>	۸/۲±۰/۳ <sup>ij</sup>	E133
۵/۵±۰/۲ <sup>de</sup>	۲۲۳±۴ <sup>f</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۵±۰/۱ <sup>b-d</sup>	۲/۲±۰/۱ <sup>ij</sup>	۲/۶±۰/۱ <sup>e-g</sup>	۱۶/۳±۰/۲ <sup>ed</sup>	E157
۶/۲±۰/۱ <sup>b</sup>	۱۳۲±۴ <sup>k</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۲±۰/۱ <sup>cd</sup>	۱/۴±۰/۱ <sup>l</sup>	۱/۶±۰/۱ <sup>k</sup>	۸/۹±۰/۵ <sup>ji</sup>	E193
۵/۸±۰/۱ <sup>c</sup>	۱۶۳±۳ <sup>i</sup>	۰/۰ <sup>f</sup>	۱/۱±۰/۱ <sup>d</sup>	۱/۷±۰/۱ <sup>k</sup>	۲/۱±۰/۱ <sup>ji</sup>	۱۹/۱±۰/۲ <sup>b</sup>	E204
۵/۵±۰/۱ <sup>de</sup>	۲۲۱±۲ <sup>f</sup>	۲/۱±۰/۱ <sup>e</sup>	۱/۳±۰/۱ <sup>cd</sup>	۲/۱±۰/۱ <sup>ij</sup>	۲/۵±۰/۱ <sup>fg</sup>	۵/۶±۰/۲ <sup>k</sup>	E221
۴/۲±۰/۱ <sup>g</sup>	۳۳۰±۳ <sup>a</sup>	۴/۲±۰/۲ <sup>a</sup>	۱/۸±۰/۱ <sup>a</sup>	۳/۷±۰/۱ <sup>a</sup>	۵/۰±۰/۲ <sup>a</sup>	۲۲/۰±۰/۳ <sup>a</sup>	E240

\* ستون‌های دارای یک حرف مشابه اختلاف معناداری در سطح ۵ درصد ندارند.



شکل ۱- نقشه حرارتی (Heat Map) ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های برتر فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم؛ IAA: تولید اکسین، IPS: حلالیت فسفات معدنی، OPS: حلالیت فسفات آلی، SP: تولید سیدروفور، ACC. d: تولید آنزیم ACC-دآمیناز، PS: انحلال کمی فسفات معدنی

را به ترتیب به ۳۳۰، ۳۲۳ و ۳۲۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر رساندند؛ همچنین رشد جدایه‌ها سبب کاهش معنادار اسیدیته محیط مایع اسپربر شد. اسیدیته نهایی محیط در پایان آزمایش از ۷/۲ به ۴/۲، ۴/۳ و ۴/۳ به ترتیب برای E240، E119 و R19 کاهش یافت. همان‌طور که در جدول ۴ دیده می‌شود، رابطه معکوسی بین مقدار فسفر آزادشده و اسیدیته محیط کشت وجود دارد؛ این مطلب نشان می‌دهد کاهش اسیدیته می‌تواند سازوکار این جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی باشد.

باکتری‌های E240 و R185 برترین سویه‌ها از نظر شاخص انحلال فسفر (قطر هاله به قطر کلنی) در ارزیابی کیفی توان حل‌کنندگی فسفات آلی و معدنی بودند و سویه R193 در رتبه بعدی قرار داشت (جدول ۴). نتایج توان کمی انحلال فسفات نامحلول کاملاً مشابه با اندازه‌گیری کیفی روی محیط کشت جامد اسپربر نبود (شکل ۱)؛ باوجود این، سویه‌ها روند کلی مشابه و توانایی زیادی در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی داشتند. پس از ۷ روز گرماگذاری، سویه‌های E240، E119 و R193 میزان حلالیت تری کلسیم فسفات

نمودار مربوطه (به روش Neighbour-joining) با استفاده از توالی‌های این جدایه‌ها و توالی‌های نماینده از پایگاه‌های اطلاعاتی رسم شد (شکل‌های ۲ و ۳). توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده در مطالعه حاضر به پایگاه اطلاعاتی بانک ژن فرستاده و با شماره دسترسی یاد شده در جدول‌های ۵ و ۶ برای جدایه‌های فراریشه و درون‌رست ثبت شد.

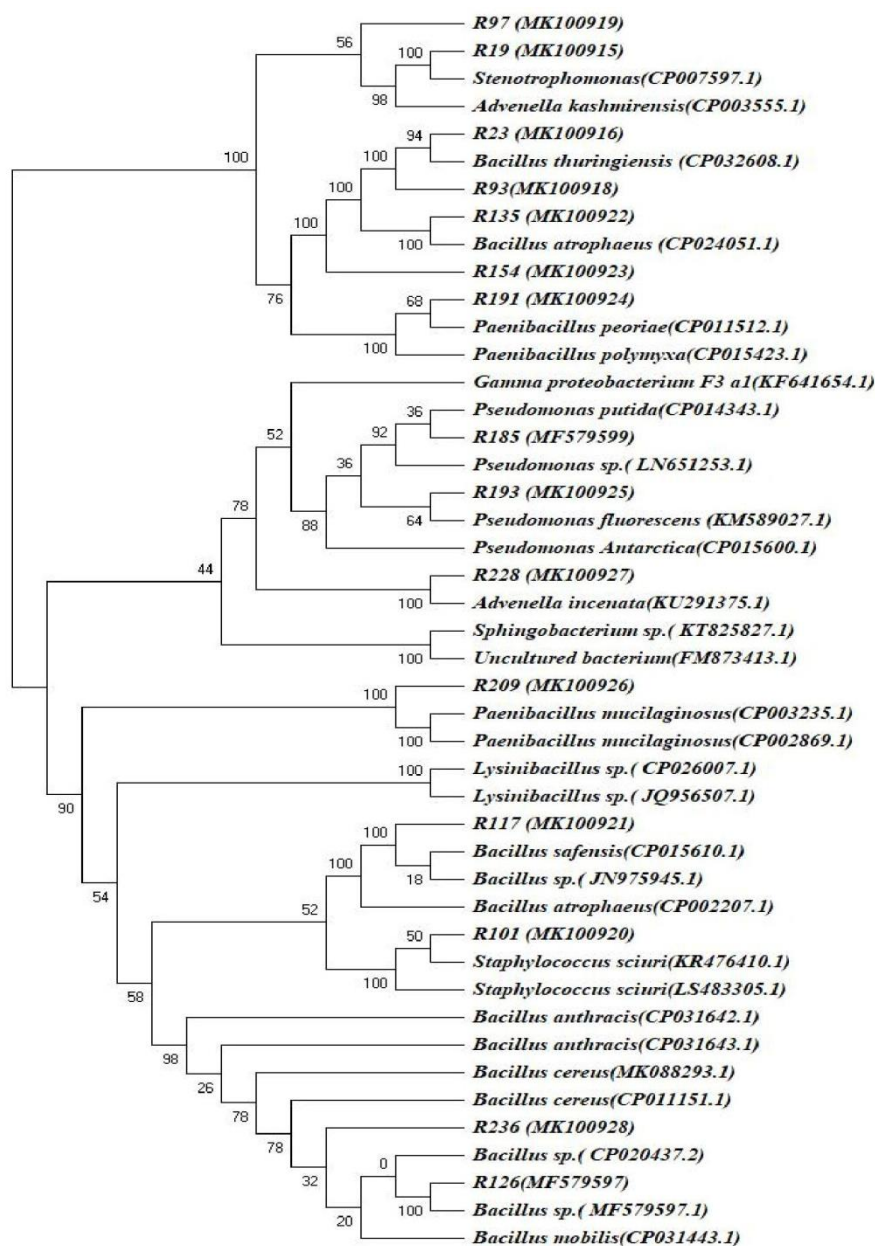
درخت فیلوژنتیک بر اساس توالی‌های *16S rRNA* نشان داد جدایه‌های فراریشه‌ای R117، R93، R23، R126، R135، R191، R209، R236 و E133 ارتباط نزدیکی با سویه‌های *Bacillus* به دست آمده بر اساس بانک اطلاعاتی NCBI دارند و جدایه‌های R185، R193، E119 و E240 نیز ارتباط نزدیک تری با جنس *Pseudomonas* دارند. به نظر می‌رسد جنس‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* از غالب‌ترین جدایه‌ها در میان جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم در مزرعه پژوهشی باشند.

تمام جدایه‌هایی که هاله نارنجی اطراف کلنی را روی محیط CAS نشان دادند، از نظر توان تولید سیدروفور برگزیده شدند. متوسط میزان تولید سیدروفور (نسبت قطر هاله به قطر کلنی) ۱/۴۲ و دامنه آن از ۱/۱ تا ۱/۸ متغیر بود. نتایج نشان دادند جدایه‌های منتخب توان تولید مقدار مناسبی از ACC-دآمیناز و استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن را دارند. ریزسازواره‌های خاک با تولید آنزیم ACC-دآمیناز سبب تخریب ACC به آمونیاک و آلفا کتوتیرات می‌شوند و از این طریق، سطح اتیلن در گیاهان را کم و از آثار منفی اتیلن بر رشد گیاه هنگام تنش جلوگیری می‌کنند.

به منظور شناسایی اولیه این جدایه‌ها، صفت‌های ریخت‌شناختی پس از رنگ آمیزی گرم، شکل و آرایش آنها با میکروسکوپ نوری مطالعه و در ادامه، پایگاه‌های اطلاعاتی در بانک ژن برای توالی‌های مشابه توالی ژن *16S rRNA* این جدایه‌ها بررسی شدند.

جدول ۵- توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده و شماره دسترسی مربوط به جدایه‌های فراریشه‌ای

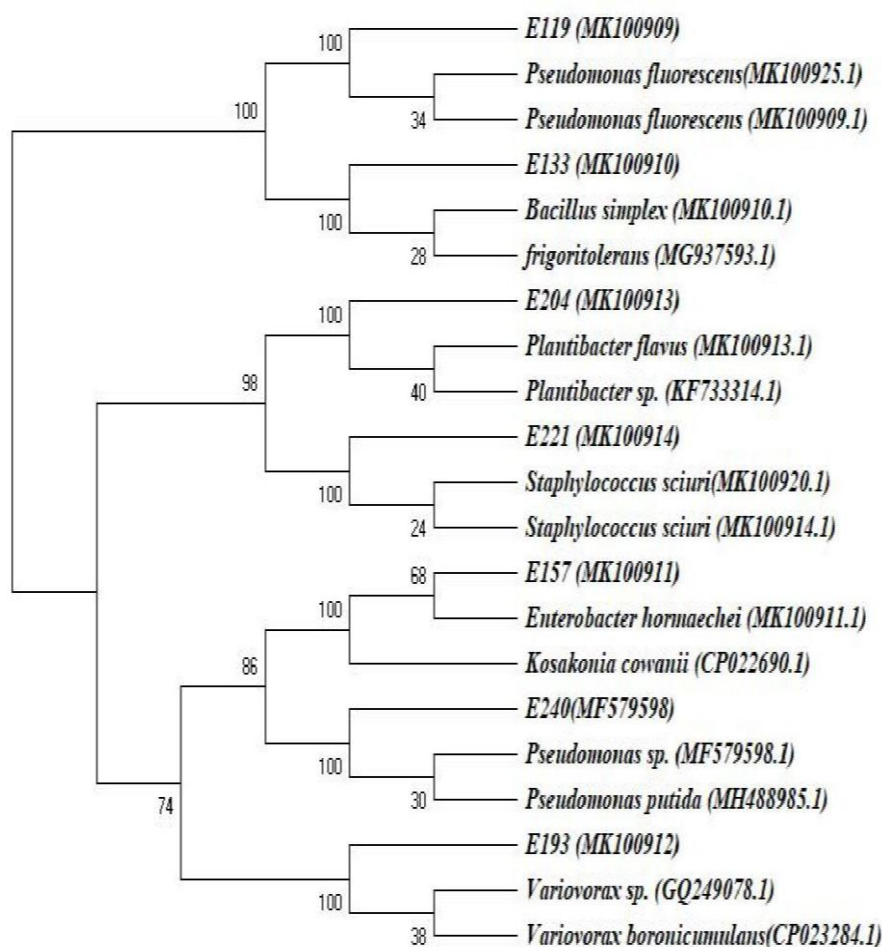
جدایه	شماره شناسایی	شناسایی ژن <i>16S rRNA</i>
R19	MK100915	<i>Gammaproteobacteria bacterium</i>
R23	MK100916	<i>Bacillus thuringiensis</i>
R93	MK100918	<i>Bacillus cereus</i>
R97	MK100919	<i>Sphingobacterium faecium</i>
R101	MK100920	<i>Staphylococcus sciuri</i>
R117	MK100921	<i>Bacillus safensis</i>
R126	MF579597	<i>Bacillus sp.</i>
R135	MK100922	<i>Bacillus atrophaeus</i>
R154	MK100923	<i>Lysinibacillus macroides</i>
R185	MF579599	<i>Pseudomonas sp.</i>
R191	MK100924	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
R193	MK100925	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
R209	MK100926	<i>Paenibacillus ehimensis</i>
R228	MK100927	<i>Advenella incenata</i>
R236	MK100928	<i>Bacillus toyonensis</i>



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های فراریشه‌ای بر اساس روش Neighbor Joining منتج از تحلیل توالی‌های ژن *16S rRNA*. عدد نشان‌دهنده شده در گره‌ها نشان‌دهنده bootstrap ۱۰۰۰ است.

جدول ۶- توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده و شماره دسترسی مربوط به جدایه‌های درون‌رست

جدایه	شماره شناسایی	شناسایی ژن <i>16S rRNA</i>
E119	MK100909	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
E133	MK100910	<i>Bacillus simplex</i>
E157	MK100911	<i>Enterobacter hormaechei</i>
E193	MK100912	<i>Variovorax boronicumulans</i>
E204	MK100913	<i>Plantibacter flavus</i>
E221	MK100914	<i>Staphylococcus sciuri</i>
E240	MF579598	<i>Pseudomonas sp.</i>



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های درون‌رست بر اساس روش Neighbor Joining منتج از تحلیل توالی‌های ژن *16S rRNA*. عدد نشان‌داده شده در گره‌ها نشان‌دهنده bootstrap ۱۰۰۰ است.

## بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های محرک رشد گیاه از مهم‌ترین ریزوباکتری‌های مفید خاک‌زی‌اند و با داشتن ویژگی‌های محرک رشدی متعدد که راهبرد مهمی برای رسیدن به کشاورزی پایدار است، رشد و عملکرد گیاهان را افزایش می‌دهند. در مطالعه حاضر، تعداد ۱۵ جدایه فراریشه‌ای و ۷ جدایه درون‌رست به ترتیب از فراریشه و ریشه گیاه گندم جداسازی شدند. غربال‌گری این جدایه‌ها از نظر ویژگی‌های محرک رشدی مانند توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز، ایندول-۳-استیک اسید، سیدروفور، انحلال فسفات‌های نامحلول

معدنی و آلی انجام شد. تمام جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست ویژگی‌های محرک رشد گیاه را داشتند، اگرچه میزان توانایی آنها باهم متفاوت بود. در پژوهش سوربواستا<sup>۱۸</sup> و همکاران (۲۰۱۴) روی ۲۵ جدایه *P. fluorescens* مشخص شد متوسط میزان تولید اکسین برابر با ۲/۴۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر است و تمام جدایه‌ها قابلیت تولید اکسین را دارند و دامنه آن از ۱/۳ تا ۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر است (۱۷). نتایج خاکی‌پور<sup>۱۹</sup> و همکاران (۲۰۰۸) نشان دادند مقدار اکسین تولیدی در *P. fluorescens* از صفر تا ۳۱/۶ و در *P. putida* از صفر تا ۲۴/۰۸ میلی‌گرم در لیتر متغیر است (۱۸).

قطر هاله به قطر کلنی در سویه‌ها بین ۰/۳۷ تا ۲/۷۳ متغیر است (۲۳). اتیلن یکی از هورمون‌های گیاهی است که فرایند گره‌زایی را در لگوم‌ها تنظیم می‌کند و در بسیاری از فرایندهای چرخه زندگی گیاه دخیل است؛ این هورمون از گره‌سازی لگوم‌ها و طویل شدن ریشه جلوگیری می‌کند و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی ساخته می‌شود. ماده ACC پیش‌ماده ساخت اتیلن در گیاهان است که در واکنشی که آنزیم ACC-اکسیداز کاتالیز می‌کند به اتیلن و دی‌اکسید کربن تبدیل می‌شود (۲۴)؛ بنابراین، مطالعه‌های بسیاری انجام شده‌اند تا باکتری‌های مولد آنزیم ACC-دآمیناز را جداسازی کنند (۲۵).

نتایج نشان دادند جنس‌های غالب در میان جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم از نوع *Pseudomonas* و *Bacillus* هستند. در مجموع، ۷ جدایه به جنس *Bacillus*، ۴ جدایه به *Pseudomonas*، ۲ جدایه به *Staphylococcus*، ۲ جدایه به *Paenibacillus* و سایر جدایه‌های بی‌جنس‌های *Gammaproteobacteria*، *Sphingobacterium*، *Enterobacter*، *Advenella*، *Lysinibacillus* و *Variovorax* و *Plantibacter* تعلق داشتند. پندی<sup>۲۷</sup> و همکاران (۲۰۱۷) تعداد ۸ جدایه باکتریایی با قابلیت حل کردن فسفر از محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات نامحلول جداسازی کردند و تشکیل هاله روشن اطراف کلنی باکتری نشانه حلالیت فسفات در نظر گرفته شد. از ۸ جدایه باکتریایی، ۳ جدایه با شاخص حلالیت فسفات زیاد از ۴/۸۸±۰/۶۹ تا ۴/۴۸±۰/۳، کاهش اسیدیته از ۳/۰۸±۰/۰۸ تا ۳/۸۲±۰/۱۲ و حلالیت فسفات زیاد در محیط مایع از ۳۰۵/۴۹±۱۰ تا ۲۷۷/۷۲±۱/۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شدند. بر اساس

ساتیاپراکش<sup>۲۰</sup> و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند با افزایش جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفات، مقدار اسیدیته محیط کشت ۲/۳ تا ۴ واحد کاهش نشان می‌دهد. احتمالاً کاهش اسیدیته از تولید اسیدهای آلی طی دوره رشد باکتری‌ها ناشی می‌شود و این اسیدها با کلاته کردن کاتیون‌های پیوندشده با فسفات از طریق گروه‌های هیدروکسیلی و کربوکسیلی و همچنین اسیدی کردن خاک (کاهش اسیدیته) سبب انحلال مقدار درخور توجهی فسفر می‌شوند (۱۹). باتول<sup>۲۱</sup> و اقبال<sup>۲۲</sup> (۲۰۱۸) تعداد ۳۰ جدایه با قابلیت حل‌کنندگی فسفات نامحلول و سایر ویژگی‌های محرک رشدی (تولید هورمون و تثبیت نیتروژن) را از فراریشه گیاهان مختلف جداسازی کردند. شاخص کیفی حلالیت فسفر از ۴ تا ۷ در محیط جامد و میزان حلالیت فسفر در محیط مایع (به‌طور کمتی) از ۳۰ تا ۲۴۶ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. شرایط بهینه برای حلالیت فسفات نامحلول شامل دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، اسیدیته ۷، استفاده از گلوکز و آمونیوم‌نترات به ترتیب به‌عنوان منبع کربن و نیتروژن بود (۲۰). پاندى<sup>۲۳</sup> و پوتندا<sup>۲۴</sup> (۲۰۱۸) تعداد ۱۰ جدایه از فراریشه سیب‌زمینی جداسازی کردند و از میان این جدایه‌ها، *Enterobacter cancerogenus* D-m-2 با توانایی بیشتر (۸/۳۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر) در انحلال فسفات نامحلول شناسایی شد (۲۱). چن<sup>۲۵</sup> و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند سیدروفوری که *P. putida* تولید می‌کند، حلالیت آهن، مس، منگنز و روی را افزایش می‌دهد (۲۲). نتایج عباس‌زاده<sup>۲۶</sup> و همکاران (۲۰۱۰) در زمینه ارزیابی توان تولید سیدروفور نشان می‌دهد تمام سویه‌های *Pseudomonas* می‌توانند هاله نارنجی‌رنگ را که دلیلی بر تولید سیدروفور است، روی محیط کشت CAS-آگار ایجاد کنند و متوسط نسبت

- (4) Sharma SB., Sayyed RZ., Trivedi MH., Gobi TA. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *Springer Plus* 2013; 2(1): 587.
- (5) Gopalakrishnan S., Sathya A., Vijayabharathi R., Varshney RK., Gowda CL., Krishnamurthy L. Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. *3 Biotech* 2015; 5(4): 355-377.
- (6) Glick BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* 2012; 1-15.
- (7) Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., del Carmen Orozco-Mosqueda M., Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research* 2016; 183: 92-99.
- (8) Wani ZA., Ashraf N., Mohiuddin T., Riyaz-Ul-Hassan S. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2015; 99(7): 2955-2965.
- (9) Emami S., Alikhani HA., Pourbabaee AA., Etesami H., Motashare Zadeh B., Sarmadian F. Improved growth and nutrient acquisition of wheat genotypes in phosphorus deficient soils by plant growth-promoting rhizospheric and endophytic bacteria. *Soil Science and Plant Nutrition* 2018; 64(6): 719-727.
- (10) Johnson LF., Curl EA. *Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens*. Minneapolis, MN: Burgess Publishing Company; 1972.
- (11) Bric JM., Bostock RM., Silverstone SE. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57(2): 535-538.
- (12) Sperber JI. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 1958; 9(6): 778-781.

تجزیه و تحلیل ژن *16S rRNA*، ۲ جدایه به جنس *Alcaligenes* تعلق داشتند و ۱ جدایه به *B. cepacia* نزدیک بود (۲۶). گولاتی<sup>۲۸</sup> و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند جدایه BIHB 723 متعلق به *Acinetobacter* حل‌کننده فسفات می‌تواند سایر متابولیت‌های محرک رشدی نظیر ACC-دآمیناز، اکسین و سیدروفور را تولید کند (۲۷). رودریگز<sup>۲۹</sup> و فراگا<sup>۳۰</sup> (۱۹۹۹) گزارش کردند بیشترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول شامل جنس‌های *Serratia*، *Enterobacter*، *Flavobacterium* و *Acinetobacter*، *Alcaligenes* هستند (۲۸). بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت فراریشه و ریشه گیاه گندم حاوی باکتری‌های مفید با پتانسیل زیاد برای بهبود رشد گیاه هستند که با جداسازی، انتخاب و کاربرد انواع برتر می‌توان موجب بهبود شاخص‌های رشد گیاه شد.

## References

- (1) Ashrafuzzaman M., Faridakhtar HM., Raziismail M., Anamulhoque M., Zahurulislam S., Shahidullah M., Sariah M. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology* 2009; 8: 1247-1252.
- (2) Zaidi A., Khan M., Ahemad M., Oves M. Plant growth promotion by phosphate solubilizing bacteria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2009; 56(3): 263-284.
- (3) Mhatre PH., Karthik C., Kadirvelu K., Divya K., Venkatasalam E., Srinivasan S., Shanmuganathan R. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A potential alternative tool for Nematodes bio-control. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2018; 17: 119-128.

- (13) Schwyn B., Neilands J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry* 1987; 160(1): 47-56.
- (14) Penrose DM., Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum* 2003; 118(1): 10-15.
- (15) Sambrook J., Russell DW., Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). *Immunol* 2001; 49: 895-909.
- (16) Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41: 95-98.
- (17) Srivastava N., Bhandari B., Bhatt A. PGPR isolated from rhizospheric soil of *Zanthoxylum armatum* DC in Garhwal Himalaya. *International Journal of Herbal Medicine* 2014; 2(1): 100-108.
- (18) Khakipour N., Khavazi K., Mojallali H., Pazira E., Asadirahmani H. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences* 2008; 4(6): 687-692.
- (19) Satyaprakash M., Nikitha T., Reddi E., Sadhana B., Vani SS. Phosphorous and phosphate solubilizing bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2017; 6(4): 2133-2144.
- (20) Batool S., Iqbal A. Phosphate solubilizing rhizobacteria as alternative of chemical fertilizer for growth and yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences* 2019; 26(7):1400-1410.
- (21) Pandey D., Putatunda C. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of potato plant. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2018; 7(01): 967-975.
- (22) Chen Y., Jurkevitch E., Bar-Ness E., Hadar Y. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. *Soil Science Society of America Journal* 1994; 58(2): 390-396.
- (23) Abbas-Zadeh P., Saleh-Rastin N., Asadi-Rahmani H., Khavazi K., Soltani A., Shoary-Nejati AR., Miransari M. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiologiae Plantarum* 2010; 32(2): 281-288.
- (24) Lin Z., Zhong S., Grierson D. Recent advances in ethylene research. *Journal of Experimental Botany* 2009; 60(12): 3311-3336.
- (25) Duan J., Müller KM., Charles TC., Vesely S., Glick BR. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microbial Ecology* 2009; 57(3): 423-436.
- (26) Pande A., Pandey P., Mehra S., Singh M., Kaushik S. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 2017; 15(2): 379-391.
- (27) Gulati A., Sharma N., Vyas P., Sood S., Rahi P., Pathania V., Prasad R. Organic acid production and plant growth promotion as a function of phosphate solubilization by *Acinetobacter rhizosphaerae* strain BIHB 723 isolated from the cold deserts of the trans-Himalayas. *Archives of Microbiology* 2010; 192(11): 975-983.
- (28) Rodríguez H., Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 1999; 17: 319-339.

---

<sup>1</sup> Rhizosphere

<sup>2</sup> Plant Growth Promoting Rhizobacteria

<sup>3</sup> Hydrogen cyanide

<sup>4</sup> 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)

<sup>5</sup> Endophyte

<sup>6</sup> Bric

<sup>7</sup> Sperber

<sup>8</sup> Drop plate

<sup>9</sup> Chrome- Azurol S (CAS)



- 10- Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)
- 11- 1,4- piperazinediethanesulfonic acid (pipes)
- 12- Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase
- 13- Penrose
- 14- Glick
- 15- Dworkin Foster
- 16- Polymerase chain reaction
- 17- Sambrook
- 18- Srivastava
- 19- Khakipour
- 20- Satyaprakash
- 21- Batool
- 22- Iqbal
- 23- Pandey
- 24- Putatunda
- 25- Chen
- 26- Abbas-Zadeh
- 27- Pande
- 28- Gulati
- 29- Rodríguez
- 30- Fraga