مجله تحقیقات آب و خاک ایران (۴۰) ۲، ۱۳۸۸ (۱۹۰-۱۷۷)

جداسازی، غربالگری،شناسایی نسبی و تعیین تحمل به تنش شوری و خشکی جدایه های برترباکتری های ریزوسفری محرک رشد (PGPR) درختان پسته

مهدی سرچشمه‌پور[۱]، غلامرضا ثواقبی*[۲]، ناهید صالح راستین[۲]، حسینعلی علیخانی[۲] و احمد پوربابایی[۳]

[۱]دانشجوی سابق دکتری، [۲]دانشیار، [۳]استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

چکیده

به منظور جداسازی و غربالگری باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه پسته، تعداد ۳۰ نمونه خاک به طور مرکب از ناحیه ریزوسفر درختان پسته استان کرمان تهیه و۳۰۰ جدایه از این نمونه خاکها انتخاب و جداسازی گردید. جدایه ها از نظر میزان تحمل به شوری در سطوح ۱۰۰، ۲۰۰ ، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی مولار مخلوطی از کلریدهای سدیم،کلسیم و منیزیم (EC معادل سطوح فوق به ترتیب ۱۲/۳۵، ۲۴، ۴۶/۲ و۶۴/۳ dS/m می باشد) با SARبرابر ۱۳ مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد ۱۰۴ جدایه از سطوح مختلف شوری به نحوی انتخاب شد که سرعت رشد آنها متوسط به بالا و از نظر خصوصیات ظاهری کلنی نیز اختلاف و تنوع کافی را داشته باشند. جدایه ها از نظر ویژگی های مهم محرک رشدی گیاه شامل توان حل کنندگی فسفات های نامحلول معدنی و آلی و توان تولید سیدروفور، IAA و Acc - دآمیناز مورد ارزیابی قرار گرفتند. جدایه های برتر که حداقل دارای یکی از صفات فوق در حد قابل قبول بودند از نظر میزان تحمل به خشکی با استفاده از PEG-6000مورد ارزیابی قرار گرفتند. بیش از ۸۰ درصد جدایه ها توانستند در سطح شوری ۶۰۰میلی مولار رشد کنند و ۲۵ درصد جدایه ها در گروه بسیار متحمل قرار گرفتند. از ۱۰۴ جدایه مورد ارزیابی برای صفات محرک رشدی ، ۸۰ درصد حداقل دارای یکی از صفات PGPRs بودند. ۴۶ درصد از جدایه ها مولد سیدروفور، ۴۷ درصد مولد IAA، ۳۳ درصد دارای توان حل کنندگی فسفات های نامحلول و ۲۲ درصد قادر به تولید آنزیم ACC – دآمیناز بودند که از بین آنها ۱۱ جدایه به عنوان جدایه های نهایی برتر انتخاب گردیدند. استفاده از محیطNB حاوی سطوح ۲۰۲/۱۳ ، ۲۹۵/۷۵ ، ۴۲۸/۳۸ و ۵۴۸/۸۰ گرم پلی اتیلن گلیکول به ازاء هر کیلوگرم محیط NB مایع که به ترتیب معادل پتانسیل های آبی ۵- ، ۱۰- ، ۲۰- و ۳۰-بار می باشند باعث کاهش معنی دار میزان رشد جدایه های انتخابی گردید، اما از ۱۱ جدایه فقط یک جدایه در ۲۰- بار و سه جدایه در ۳۰- بار قادر به رشد نبودند. جدایه های برتر انتخابی از نظر خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد مطالعه و شناسایی اولیه قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی:پسته، باکتریهای ریزوسفری محرک رشد، سیدروفور، IAA ، ACC – دآمیناز، تنش شوری و خشکی

مقدمه

پسته با سطح زیر کشت حدود ۴۳۰ هزار هکتار از جمله مهمترین محصولات کشاورزی است که حدود ۸۰ درصد سطح زیر کشت و تولید آن مربوط به استان کرمان می باشد(Anonymous, 2005). شرایط دشوار حاکم بر باغهای پسته، مانند آب و هوای گرم و خشک، خاکهای آهکی با pH بالا، ماده آلی کم، شوری آب آبیاری و خاک و دور طولانی آبیاری، تغذیه این درختان را با مشکل مواجه ساخته و باغداران علیرغم مصرف مقادیر قابل توجهی از کودهای شیمیایی طی سالیان متمادی نتوانسته اند بهره کافی ببرند. اثرات سوء ناشی از مصرف غیر اصولی کودهای شیمیایی، پایین بودن بازدهی این کودها و توانایی بالای این گیاه در سازگاری با شرایط سخت محیطی، ضرورت توجه به روابط بیولوژیک این گیاه با محیط رشد را دو چندان می کند.

ریشه های گیاه با تولید و ترشح دامنه وسیعی از ترکیبات متنوع،نقش ویژه ای به عنوان تنظیم کننده فعالیت های میکربی در ریزوسفر بر عهده دارند. ترشحات ریشه ای به عنوان پیامهایی هستند که روابط مثبت و منفی بین ریشه و میکروارگانیزمها را منعکس می نمایند (Brown et al., 1994; Walker et al. 2003). در هر گرم از خاک میلیونها میکروارگانیزم شامل انواع باکتری ها، قارچها و پروتوزوئرها وجود دارند. در میان این میکروارگانیزمها، باکتریها فراوانترین و متنوع ترین آنها می باشند (Rai, 2006). تعداد این باکتریها در محدوده ریزوسفر گیاهان خیلی بیشتر از توده خاک غیر ریزوسفری است. گروههای مهمی از باکتریهای مستقر در ریزوسفر با ریشه گیاهان همکاری نزدیکتری داشته و از طریق مکانیسم هایی مانند افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی (Biofertilizers) ، مواد زیستی محرک رشد (Biostimulants)، حفاظت کننده های

* پست الکترونیک مکاتبه کننده savagheb@ut.ac.ir

زیستی (Bioprotectans) و زیست پالایی (Bioremediation) به طور مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند. به این گروه از باکتریها اصطلاحا باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه یا (Plant Growth Promoting PGPR Rhizobacteria) می‌گویند (Vessay, 2003; Compant et al., 2005; Tenuta, 2005; Rai, 2006). باکتریهای مختلفی در فهرست انواع باکتریهای محرک رشد گیاه قرار گرفته اند که متداول ترین انواع شناسایی شده مربوط به جنس های *Bacillus, Pseudomonas, Rhizobium, Azospirillum, Azotobacter, Burkholderia, Alcaligens, Acinetobacter, Serratia, Flavobacterium.* و *Entrobacter* می‌باشند (Glick, 1995; Rodriguez and fraga, 1999; Tilak et al., 2005).

باکتریهای محرک رشد از ریزوسفر گیاهان مختلفی جدا شده و پس از خالص سازی و شناسایی به صورت مایه تلقیح و به عنوان کودهای زیستی مورد استفاده قرار گرفته اند. توانایی این گروه از باکتریها در افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی، توسعه سیستم ریشه ای گیاه و کنترل عوامل بیماریزا باعث استفاده روزافزون از آنها شده و انتظار می رود که در آینده بتوانند جایگزین بخشی از کودهای شیمیایی باشند (Compant et al., 2005; Tenuta, 2005).

میکروارگانیزمهای حل کننده فسفات یا PSMs (Phosphate Solubilizing Microorganisms) همواره در خاک حضور دارند و می‌توانند در تامین فسفر مورد نیاز گیاه نقش مهمی را به طور پایدار ایفا کنند. این میکروارگانیزمها شامل قارچها و باکتری های زیادی هستند که می توانند در محیط های حاوی تری کلسیم فسفات، فسفات های آهن و آلومینیم، هیدروکسی آپاتیت، پودر استخوان، سنگ فسفات و ترکیبات نامحلول مشابه به عنوان تنها منبع تامین فسفر، رشدکرده و مقدار زیادی از فسفر آنها را حل کرده و آزاد کنند. انواعی از PSMs ، علاوه بر تامین فسفر مورد نیاز گیاه می‌توانند از طریق افزایش کارآیی تثبیت نیتروژن، تاثیر بر قابلیت جذب سایر عناصر و تولید مواد محرک رشد باعث بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه شوند (Gyaneshwar et al., 2002; Tilak et al., 2005; Fernandz et al., 2007). حل شدن ترکیبات پیچیده فسفات های کلسیم توسط این باکتری ها به دلیل توان آنها در کاهشpH از طریق ترشح اسیدهای آلی (استات، لاکتات، اکسالات، تارتارات، سوکسینات، سیترات، گلوکونات، کتوگلوکونات، گلیکولات و..) و یا ترشحH^+ می‌باشد. از نظر تئوری تاکنون بسیاری از نقاط دنیا به حداکثر پتانسیل مصرف کودهای فسفاته رسیده اند و برآوردهای تئوریک حاکی از این است که فسفر تجمع یافته در اراضی کشاورزی می تواند به مدت ۱۰۰ سال برای تولید یک محصول خوب در سراسر دنیا کافی باشد. منابع کودهای فسفاته در دنیا محدود و تولید آنها پرهزینه است(Gyaneshwar et al., 2002). مایه تلقیح های PSMs شامل گونه هایی از جنس های *Aspergillus, Pseudomonas* , *Arthrobacter* و *Bacillus* توانسته اند معادل ۳۰ تا ۳۵ کیلوگرم P2O5 در هر هکتار خاک تولید کنند (Tilak et al., 2005).

سیدروفورها ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم و لیگاندهایی با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند شدن باFe^{3+} هستند و به طور مستقیم از طریق افزایش قابلیت استفاده آهن و یا غیر مستقیم از طریق محروم کردن بیمارگرهای گیاهی از آهن در رشد گیاه موثر می باشند. سیدروفورها در ریزوسفر با آهن موجود در ذرات خاک که به فرم غیر قابل جذب وجود دارد پیوند شده، و آن را به صورت کمپلکس در می آورند. کمپلکس سیدروفور- آهن سه ظرفیتی می تواند از طریق یک سیستم انتقال ویژه از عرض غشاء پلاسمایی سلول ریشه جذب شود. علاوه بر تعدادی از گیاهان خانواده گرامینه، طیف گسترده ای از میکروارگانیزمها نیز قادر به ترشح این مواد هستند. سویه های تولید کننده سیدروفور به میزان بیشتری با گیاهان همکاری دارند و در شرایط کمبود آهن میزان تولید سیدروفور توسط این گروه افزایش می یابد (Marschner et al., 1997; Bellis and Ercolani, 2001; Reihani Tabar et al., 2002; Tilak et al., 2005). باکتریهای PGPR با تولید هورمونهای گیاهی مانند اکسین، سیتوکینین، جیبرلیک اسید و تولیدACC- دآمیناز باعث افزایش سطوح ریشه ای از طریق افزایش وزن توده ریشه ها، افزایش رشد طولی و انشعابات فرعی، تولید ریشه های نازکتر و افزایش تولید تارهای کشنده شده و در نتیجه باعث افزایش جذب آب و مواد غذایی می شوند (German et al., 2000: Amooaghaie et al., 2002; Egamber amd Hoflich, 2003; Tenuta, 2005; Rai, 2006). این باکتریها همچنین از طریق افزایش سطوح ریشه ای(به واسطه هورمونهای تولیدی) و تولید سیگنالهای مولکولی مربوطه باعث بهبود روابط همزیستی گیاه با قارچها و سایر باکتریها می شوند. به این گروه از باکتریها Helper bacteria نیز می گویند (Rai, 2006). برخی از باکتریهای ریزوسفری بازدارنده رشد (Deleterious Rhizobacteria = DRB) با ترشح بیش از حد IAA می توانند باعث توقف رشد گیاه شوند اما جدایه های مربوط بهPGPR که مقدار کمتری IAA ترشح می کنند بر رشد گیاهان اثر مثبت دارند(Barazani and Friedman, 1999) .

از دیگر مکانیسم های PGPRs برای تحریک رشد گیاه ، کاهش سطح اتیلن می باشد. اتیلن تقریبا توسط تمام گیاهان

تولید می شود و حضور آن در مقادیر کم محرک و درمقادیر زیاد از حد باز دارنده رشد گیاه است(Glick et al. 2007). ACC (۱- آمینو سیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید) پیش ماده تولید اتیلن است و در نتیجه فعالیت آنزیمACC- اکسیداز به اتیلن تبدیل می شود. سویه های دارای آنزیم ACC- دآمیناز قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن هستند و می توانند از طریق کاهش غلظت اتیلن، اثرات منفی آنرا بر رشد ریشه کنترل کنند . این گونه باکتریها با کاهش سطح اتیلن، گیاهان را از اثرات مخرب ناشی از تجمع این ماده در شرایط تنش مانند خشکی ، شوری، غرقاب، بیماری و فلزات سمی محافظت می کنند(Hontzeas et al., 2004; Glick et al., 2007). باکتریهای محرک رشد می توانند از طریق توسعه سیستم ریشه ای گیاه، بهبود ساختمان فیزیکی خاک و افزایش ظرفیت نگهداری آب ، کاهش جذب سدیم و افزایش بیان ژنهای مسئول ایجاد مقاومت در مقابل تنش های شوری و خشکی باعث افزایش تحمل گیاه به تنش های محیطی شوند (Rogers and Burns, 1994; Timmusk and Wagner, 1999; Ashraf et al., 2004; Bacilli et al., 2004; Lucy et al. 2004). از برخی خاکهای قلیایی، سویه های باکتریایی از ریزوسفر گیاه نخود جدا شده اند که توانسته اند در حضور۱۰ درصد نمک، pH برابر ۱۲ و درجه حرارت۴۵ درجه سانتیگراد در انحلال فسفات های نامحلول موثر باشند(Tilak et al., 2005). سویه هایی از باکتریهای *Bacillus subtilis* و *B. circulans* مقاوم به حرارت نیز توانسته اند مقادیر قابل توجهی از تری کلسیم فسفات را در درجه حرارت ۴۵ درجه سانتیگراد حل کنند(Gaind and Agur, 1991).

در هندوستان از میان باکتریهای PGPRs متعدد جدا شده از ریزوسفر ذرت، سویه هایی از*Bacillus cereus* و *B. circulans* به عنوان سویه های برتر توانسته اند در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و در حضور ۷ درصد کلرید سدیم، در محدوده ۹/۹- pH=۵/۷ به خوبی رشد کنند. این باکتریها روی حامل مناسب در حرارت ۳۰ درجه با جمعیت $۱۰^{۸}$ به ازاء هرگرم از مایه تلقیح به مدت بیش از یکسال باقی ماندند (Tilack and reddy, 2006). برخی از باکتریهای محرک رشد گیاه میزان بیان ژنهای مسئول مقاومت در مقابل تنش خشکی را تا ۵۰ برابر افزایش داده و مسیر های دفاعی گیاه را در مقابل تنش های زنده و غیر زنده فعال می کنند(Timmusk and Wagner, 1999).

علیرغم سطح زیر کشت و ارزش اقتصادی قابل توجه گیاه پسته، تا کنون مطالعه خاصی در مورد باکتریهای ریزوسفری دارای صفات محرک رشدی این گیاه انجام نشده است. جداسازی، شناسایی، بررسی برخی صفات محرک رشدی و تعیین میزان تحمل این باکتریها به تنش های خشکی و شوری در شرایط آزمایشگاهی از جمله اهداف این تحقیق می باشد. انتظار می رود با جداسازی سویه هایی از باکتریهای PGPR از ریزوسفر درختان پسته ، حداقل برخی از آنها بتوانند با تحریک رشد ریشه، افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی، افزایش تحمل به شوری و خشکی باعث بهبود رشد این گیاه شوند.

مواد و روش‌ها

نمونه گیری

نمونه برداری خاک از ۴ شهرستان عمده پسته کاری استان کرمان شامل رفسنجان، سیرجان، کرمان و زرند انجام گرفت. به منظور افزایش تعداد و تنوع ژنتیکی جدایه ها، در هر شهرستان از ۱۰ - ۵ باغ (مجموعا ۳۰ نمونه) با شرایط متفاوت از نظر شوری و حاصلخیزی خاک، دور آبیاری و رقم پسته، نمونه برداری گردید. در هر باغ یک نمونه مرکب (از۲۰-۱۰ درخت بر حسب سطح زیر کشت باغ) شامل قطعاتی از ریشه و خاک چسبیده به آن تهیه و به کیسه های مخصوص منتقل و همزمان نمونه خاک مرکب نیز از اعماق ۴۰-۰ و۸۰-۴۰ سانتیمتر به منظور بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک تهیه شد. نمونه ها به آزمایشگاه منتقل و جداسازی جدایه ها و اندازه گیریهای لازم (بافت، کربن آلی،EC، pH ،عناصرغذایی و آهک) انجام شدند.

جداسازی باکتریهای ریزوسفری

در این مرحله از هر یک از نمونه های ریزوسفری رقت های مختلف$۱۰^{-۱}$ تا$۱۰^{-۹}$ تهیه و سپس یک میلی لیتر از رقت های $۱۰^{-۴}$تا $۱۰^{-۹}$در ۳ تکرار روی محیط آگار مغذی (Nutrient Agar = NA) تلقیح شدند. از هر خاک ۱۰ جدایه که از نظر شکل، رنگ، حاشیه کلنی و سرعت رشد تفاوت بیشتری با بقیه داشتند، انتخاب شدند. بدین ترتیب تعداد ۳۰۰ جدایه از ۳۰ نمونه خاک بدست آمد که هر یک پس از کشت مجدد روی همان محیط، خالص شده و در دو تکرار در لوله های آزمایش درپیچ دار حاوی محیط کشت شیبدار در دمای ۴-۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

غربالگری

غربالگری (Screening) جدایه ها در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول ۳۰۰ جدایه انتخابی از نظر میزان تحمل به شوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مرحله دوم ۱۰۴ جدایه غیر حساس از سطوح مختلف شوری انتخاب و از نظر صفات محرک رشدی گیاه مورد بررسی قرار گرفتند. این ۱۰۴ جدایه نیز به نحوی انتخاب شدند که در بین خود از نظر شکل ظاهری ، رنگ و حاشیه کلنی تفاوت بیشتری با بقیه داشتند.

آزمون میزان تحمل به شوری

به منظور بررسی میزان تحمل جدایه ها به شوری از محیط کشت NA با غلظت های متفاوت نمک (۱۰۰ ،۲۰۰ ، ۴۰۰ و۶۰۰ میلی مولار) شامل مخلوطی از کلریدهای سدیم،کلسیم و منیزیم با SAR برابر ۱۳ استفاده شد. شوری محلول های فوق به ترتیب ۱۲/۳۵، ۲۴، ۴۶/۲ و dS/m ۶۴/۳ می باشد و میزان کلرید سدیم از ۷۰/۵ درصد در سطح ۱۰۰ میلی مولار تا ۴۱ درصد در سطح ۶۰۰ میلی مولار متغیر، و میزان باقیمانده نمک از مخلوط کلریدهای کلسیم و منیزیم به نحوی انتخاب شد که غلظت منیزیم در همه سطوح تقریبا نصف کلسیم بود. بدین منظور ابتدا محیط های کشت حاوی نمک در شرایط سترون در ظروف پتری توزیع و سپس هر ظرف پتری به ۹ قسمت مساوی تقسیم و کشت تازه هر جدایه با روش قطره‌گذاری به آنها تلقیح شد. کشت جدایه ها به نحوی بود که درون هر ظرف پتری۹ جدایه مختلف قرار گرفت و برای هر جدایه ۳ تکرار در ۳ ظرف پتری، در نظر گرفته شد. ظروف پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری و تغییرات قطر، حالت و ظاهر کلنی ها پس از ۲۴ و همچنین به منظور مطالعه دقیقتر رفتار و عکس العمل باکتری پس از ۱۲۰ ساعت مورد بررسی و مقایسه قرارگرفت. سرعت نسبی رشد با مشاهده کیفی کلنی جدایه ها و مقایسه میزان افزایش قطر کلنی هر جدایه در سطوح مختلف شوری و همچنین مقایسه با دیگر جدایه ها به ترتیب با درجات و اعداد بسیار ضعیف (۱) ، ضعیف (۲) ، نسبتا ضعیف (۳)، نسبتا متوسط (۴)، متوسط (۵)، نسبتا شدید (۶)، شدید (۷) و بسیار شدید (۸) ثبت شد.

اندازه گیری توان حل کنندگی فسفات معدنی در محیط مایع

برای اندازه گیری توانایی جدایه ها در حل فسفات های معدنی نامحلول، از روش کشت آنها در محیط مایع(Sperber, 1958)SP که حاوی ۲/۵ گرم در لیترنمک فسفات نامحلول تری کلسیم فسفات $Ca_3(PO_4)_2$ و pH برابر ۷/۲ بود، استفاده شد. در این روش۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون تازه هرجدایه به ۳۰میلی لیتر محیط مایع اضافه و ظروف کشت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد بر روی شیکر دورانی با ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بعد از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون، ابتدا pH سوسپانسیون هر یک از محیط های کشت شده اندازه گیری و سپس سوسپانسیون با ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. یک میلی لیتر از محلول رویی با ۳ میلی لیتر آب مقطر و یک میلی لیتر معرف مولیبدات- وانادات مخلوط و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد. محلول شاهد تلقیح نشده نیز به همین روش تهیه و مقدار جذب نور آن قرائت گردید. میزان فسفر آزاد شده توسط هر جدایه بر اساس میزان جذب نور مربوط به آن با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از جذب نور در غلظت های۰، ۵ ،۱۰، ۱۵ و۲۰ میلی‌گرم در لیتر فسفر حاصل از KH_2PO_4، محاسبه گردید(Sperber, 1958; Jeon et al., 2003).

اندازه گیری توان حل کنندگی فسفاتهای آلی

محیط کشت مورد استفاده در این آزمون ISP (Inositol hexaphosphate-sperber) است که محیط تغییر یافتهSp می باشد. در این محیط به جای تری کلسیم فسفات از اینوزیتول هگزافسفات استفاده شد. این آزمون ابتدا بر روی محیط کشت جامد انجام و سپس جدایه های دارای توانایی انحلال فسفات آلی، بر روی محیط مایع نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند (Sperber, 1958).

محیط جامد: ابتدا محیط کشت اسپربر حاوی ۲/۵ گرم درلیتر فیتات کلسیم تهیه و در شرایط سترون در ظروف پتری توزیع گردید. هر ظرف پتری به ۶ قسمت مساوی تقسیم و پس از علامت گذاری، کشت سوسپانسیون تازه جدایه ها با روش قطره گذاری بر روی آنها انجام شد. کشت جدایه ها به نحوی بود که درون هر ظرف پتری ۶ جدایه مختلف قرار گرفت و برای هر جدایه نیز ۳ تکرار در سه ظرف در نظر گرفته شد. ظروف پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری و قطر کلنی رشد یافته یا (Colony Diameter = CD)و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات (Halo Diameter = HD) که در اطراف هر کلنی تشکیل شده بود در فواصل زمانی ۱ ، ۲، ۴ ،۸ و ۱۰ روز اندازه گیری و سپس نسبت قطر هاله به قطرکلنی برای هر جدایه محاسبه شد.

محیط مایع: جدایه هایی که نسبت قطر هاله به قطر کلنی آنها بیش از ۱/۵ بود به روش کشت بر روی محیط مایع نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مرحله نیز محیط کشت اصلاح شده اسپربر حاوی ۲/۵ گرم در لیتر فیتات کلسیم مورد استفاده قرار گرفت . مراحل اندازه گیری فسفر آزاد شده در محیط های تلقیح شده با جدایه ها و محیط شاهد تلقیح نشده و نیز تهیه منحنی استاندارد، مشابه روش معدنی انجام شد.

اندازه گیری توان تولید سیدروفور

تشخیص نیمه کمی توان تولید سیدروفور توسط جدایه ها با استفاده از محیط Cas-Agar ، به روش Alexander and Zuberer (۱۹۹۱)، انجام شد. جدایه هایی که قادر به تولید سیدروفور باشند بر اساس هاله نارنجی رنگی که در پیرامون کلنی آنها ایجاد می شود تشخیص داده می شوند. کشت

جدایه‌ها به نحوی بود که درون هر ظرف پتری ۴ جدایه مختلف به روش قطره گذاری کشت شد و برای هر جدایه ۳ تکرار در سه ظرف پتری در نظر گرفته شد. ظروف پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری، و اندازه قطر کلنی باکتری و قطر هاله نارنجی تشکیل شده در اطراف آن، در فواصل زمانی ۱ ، ۲، ۴ ،۸ و ۱۰ روز اندازه گیری شد. نسبت قطر هاله به قطرکلنی برای هر جدایه محاسبه و به عنوان معیار ارزیابی تولید سیدروفور در نظر گرفته شد. اندازه گیری قطر هاله و کلنی در فواصل زمانی مختلف به منظور مطالعه دقیق تر رفتار و عکس العمل باکتری ها نسبت به زمان در محیط CAS-Agar صورت گرفت.

اندازه گیری توان تولید IAA

بررسی توان تولید اکسین جدایه ها با استفاده از محیط کشت(DF Salts minimal medium)DFبه دو روش کشت روی محیط جامد و مایع انجام شد.

کشت در محیط DF جامد: به منظور بررسی نیمه کمی توان سویه ها در تولید IAA از روش .Brick et al (۱۹۹۱)، استفاده شد. ابتدا محیط کشت DF حاوی ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر ال- تریپتوفان تهیه و در شرایط سترون درون ظروف پتری ۱۰ سانتیمتری توزیع گردید. هر ظرف پتری به ۱۶ قسمت مساوی تقسیم و پس از علامت گذاری، با سوسپانسون تازه جدایه ها به روش قطره گذاری تلقیح شد. در هر ظرف پتری تعداد ۱۶ جدایه متفاوت کشت شد و برای هر جدایه ۳ تکرار (در ۳ پلیت جداگانه) در نظر گرفته شد. سپس یک برگ غشاء نیتروسلولزی بر روی محیط کشت مایه زنی شده قرار داده شد. ظروف پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۴-۲ روز که اندازه کلنی تمامی باکتریها حداقل به ۲ میلیمتر رسید ، نگهداری شدند. برای سنجش تولید IAA، ابتدا درون یک ظرف پتری تمیز یک کاغذ صافی واتمن گذاشته شد و سپس با ۲/۵ میلی لیتر محلول سالکوفسکی (مخلوط ۹۸/۵ میلی لیتر از اسید پرکلریک ۷۱٪ با ۴ میلی لیتر محلول ۰/۵ مولار کلرور آهن III و ۹۷/۵ میلی لیتر آب مقطر) اشباع گردید. سپس برگ غشاء نیتروسلولزی حاوی جدایه ها بر روی کاغذ صافی اشباع شده قرار داده شد و پس از حدود ۳۰ دقیقه، قطر کلنی مربوط به هر جدایه و همچنین اندازه و شدت رنگ هاله اطراف آن تعیین گردید(Brick et al., 1991).

روش کشت در محیط DF مایع: جدایه هایی که اندازه کلنی و یا هاله آنها در محیط جامد حداقل ۲ میلیمتر و رنگ آنها پس از افزودن محلول سالکوفسکی آلبالویی بود انتخاب و با استفاده از روش .Bent et al (۲۰۰۱)، به طور کمی ارزیابی شدند. در این روش مقدار۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه هر جدایه به ۳۰ میلی لیتر محیط DF حاوی ۵۰ میکرو گرم در میلی لیتر ال- تریپتوفان اضافه و برای هر جدایه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. محیط های تلقیح شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد بر روی شیکر دورانی با ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند و سپس سوسپانسیون هر جدایه به مدت ۲۰ دقیقه با ۸۰۰۰ - دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. یک میلی لیتر از محلول رویی با ۴ میلی لیتر معرف سالکوفسکی مخلوط و پس از ۲۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، میزان جذب نور در ۵۳۵nm توسط اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان تولید اکسین جدایه ها در مقایسه با منحنی استاندارد حاصل از مقدار جذب نور توسط غلظت های ۰، ۵، ۱۰ ، ۱۵ و۲۰ میکروگرم در میلی لیتر ایندول استیک اسید محاسبه گردید (Bent et al., 2001; Patten and Glick, 2002).

اندازه گیری میزان فعالیتACC- دآمیناز

ارزیابی توان جدایه ها در تولید آنزیم ACC - دآمیناز بر اساس روش اصلاح شده Glick (۱۹۹۵)، در دومحیط کشت DF جامد و مایع انجام شد. ابتدا نمونه ها در محیط جامد مورد ارزیابی اولیه قرار گرفتند و سپس جدایه هایی که در محیطDF حاوی ACC رشد خوبی داشتند، از نظر رشد روی محیط DF مایع حاوی ACC نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند

محیط جامد: ابتدا ۳ سری از پلیت های ۱۰ سانتیمتری، هر یک به ۱۶ قسمت مساوی تقسیم و سپس در شرایط استریل محیطDF استریل شده در آنها توزیع شد. سری اول حاوی محیط DF (شاهد منفی)، سری دوم محیط DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم(شاهد مثبت) و سری سوم محیط DF حاوی ۱۵۰ میکرولیتر از محلولACC ۰/۳ مولار که در سطح پلیت پخش شد. پلیت ها همزمان با ۱۶ جدایه متفاوت به روش قطره‌گذاری تلقیح و در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد درون انکوباتور نگهداری شدند. اندازه کلنی ها در فواصل زمانی ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۲ روز ثبت و بر اساس اندازه کلنی بعد از ۱۲ روز با یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. جدایه هایی که میزان رشد کلنی آنها در محیط DF+ACC بیش از محیط DF بود، انتخاب و در مرحله بعدی در محیط DF مایع مورد ارزیابی قرار گرفتند.

محیط مایع: در این روش مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه هر جدایه به ۳۰ میلی لیتر از سه محیط مایع شامل محیطDF(شاهد منفی)، محیطDF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم (شاهد مثبت) و محیط DF حاویACC ۰/۳ مولار به عنوان منبع نیتروژن تلقیح شد. نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر دورانی با ۱۲۰ دور در

دقیقه قرار داده شدند. سپس میزان جذب نور هر یک از نمونه ها در طول موج ۴۰۵nm قرائت گردید. میزان رشد هر جدایه در محیط DF حاوی ACC در مقایسه با محیط های شاهد مثبت و شاهد منفی به عنوان میزان فعالیت آنزیم ACC – دآمیناز آن جدایه مورد ارزیابی قرار گرفت(Glick, 1995).

آزمون میزان تحمل جدایه ها به خشکی

به منظور ارزیابی میزان تحمل جدایه ها به سطوح مختلف خشکی از توان رشد آنها در محیط کشت NB حاوی غلظت های ۰، ۲۰۳/۳۶۲، ۲۹۸/۵۸۷، ۴۳۸/۴۰ و۵۴۸/۸۳۸ گرم پلی اتیلن گلیکول۶۰۰۰ به ازاء هر کیلوگرم محیط کشت NB استفاده شد. پتانسیل‌های آبی سطوح فوق به ترتیب ۰، ۵ - ، ۱۰- ، ۲۰- و ۳۰- بار می باشد که بر اساس معادله Michel and Kaufman (۱۹۷۳)، محاسبه شده اند. میزان رشد جدایه ها با اندازه گیری چگالی نوری (Optical Density = OD)محیط رشد آنها **در** ۶۰۰ نانومتر، توسط اسپکتروفوتومتر تعیین و درصد کاهش رشد هر جدایه در سطوح مختلف پلی اتیلن گلیکول در مقایسه با میزان رشد همان جدایه در محیط NB محاسبه گردید. سه تکرار از محیط NB تلقیح نشده حاوی مقادیر مختلف پلی اتیلن گلیکول نیز به عنوان شاهد جهت تعیین میزان چگالی نوری این محیط در شرایط فوق تهیه و OD آنها نیز قرائت شد (Michel and Kaufman, 1973).

شناسایی جدایه های باکتری

از ۱۰۴ جدایه مورد مطالعه ۱۱ جدایه که حداقل از نظر یکی از صفات محرک رشدی برجسته تر بودند به عنوان جدایه های برتر نهایی انتخاب و خصوصیات مورفولوژیک و فیزیولوژیک آنها مورد مطالعه قرار گرفت. مشاهده شکل ظاهری و تعیین اندازه سلول باکتری با استفاده از میکروسکوپ نوری، لام میکرومتری و اوکولار مدرج، رنگ آمیزی گرم بر اساس روش بورک، Muray et al. (۱۹۹۴) و آزمایش گرم با استفاده از هیدروکسید پتاسیم۳ درصد Collins and Patircia (۱۹۸۵)، انجام شد. رنگ آمیزی اسپور بر اساس روش شافر- فولتون،Cappicino(۱۹۹۲)،آزمایش کاتالاز بر اساس تشکیل حباب های اکسیژن و آزمایش اکسیداز با استفاده از معرف تترامتیل پارا فنیلن دی آمین دی هیدرو کلراید انجام شد(Cappicino, 1992) . سنجش توان تولید اسید از قندها، تولید لسیتیناز، هیدرولیز کازئین و نشاسته مطابق روش های پیشنهاد شده توسط.Parry et al (۱۹۸۸)، و تولید H_2S ، هیدرولیز اسکولین، تولید اندول، و آزمون های وژز پرسکوئر (Voges Proskauer) متیل رد بر اساس روش های Smibert and Krieg (۱۹۹۴)، انجام شدند. هیدرولیز توئین۸۰ در سطح پلیت های توئین آگار بر اساس روش Harrigan and MC Cance (۱۹۷۶)، توان تحرک باکتری با روش های قطره معلق و مشاهده میکروسکپی (Muray et al., 1994) و کشت در محیط نیمه جامدSIM،(Baron and Fingold, 1990)بررسی گردید. آزمایشهای تکمیلی شناسایی ۱۱ جدایه برتر بر اساس کلیدهای شناسایی ارائه شده در کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی انجام شد(Holmes et al., 1984) .

نتایج-تحمل جدایه ها به شوری

از ۳۰۰ جدایه مورد بررسی در مرحله اول،۹۸/۶ ، ۹۸/۳ ، ۸۲/۳ و ۷۵/۷ درصد جدایه ها بعد از ۲۴ ساعت و ۱۰۰ ، ۹۹/۷ ، ۹۵/۳ و ۸۱/۷ درصد جدایه ها بعد از ۱۲۰ ساعت توانستند به ترتیب در سطوح شوری۱۰۰ ، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی مولار رشد کنند. افزایش سطح شوری به بیش از ۲۰۰ میلی مولار باعث کاهش قطر کلنی جدایه ها گردید. قطر کلنی بعضی از جدایه ها در ۲۴ ساعت اولیه نا محسوس بود، اما پس از ۱۲۰ ساعت به خوبی افزایش یافت (جدول ۱).

سیصد جدایه مورد مطالعه در آزمون تحمل به شوری با توجه به میزان رشد جدایه ها در سطوح مختلف شوری به ۵ گروه حساس، نیمه حساس، نیمه متحمل، متحمل و بسیار متحمل تفکیک شدند.گروه بندی بر مبنای میزان رشد جدایه ها در مقایسه با محیط غذایی بدون افزودن نمک که همه جدایه ها در آن رشد کردند و همچنین مقایسه جدایه ها با یکدیگر صورت گرفت.

جدول۱- خصوصیات محیط و تعداد جدایه های رشد یافته در سطوح مختلف شوری

خصوصیات محیط وتعداد جدایه رشد یافته	سطح شوری(میلی مولار)			
	۱۰۰	۲۰۰	۴۰۰	۶۰۰
قابلیت هدایت الکتریکی (dS/m)	۱۲/۳	۲۴	۴۶/۲	۶۴/۳
درصد نمک	۰/۷	۱/۵	۳/۳	۵/۲
پتانسیل اسمزی محاسبه شده (بار)	-۵/۶۷	-۱۱/۹	-۲۵	-۳۸/۵
تعداد جدایه رشد کرده بعد از ۲۴ ساعت	۲۹۶	۲۹۵	۲۴۷	۲۲۷
تعداد جدایه رشد کرده بعد از ۱۲۰ ساعت	۳۰۰	۲۹۹	۲۸۶	۲۴۵

مبنای گروه بندی، تعداد جدایه های مربوط به هر گروه، تعداد جدایه های انتخاب شده از هر گروه و شماره جدایه های برتر انتخابب شده از هر گروه در جدول شماره ۲ و نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مربوط به جدایه های انتخاب شده برای آزمون های گلخانه ای در جدول شماره ۳ آورد شده است.

توان حل کنندگی فسفات

جدایه ها از نظر توان حل کنندگی فسفات معدنی در سطح ۱ درصد تفاوت معنی دار با یکدیگر داشتند (جدول ۴). تعداد ۳۲ جدایه از ۱۰۴ جدایه توانستند بیش از ۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از فسفر معدنی نامحلول محیط را حل کنند و این میزان در ۱۵ جدایه بیش از ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. در ۱۸ جدایه از ۱۰۴ جدایه انتخابی نسبت قطر هاله به قطر کلنی

در محیط جامد حاوی فسفات آلی نامحلول بین۱/۵-۱/۲ و در ۱۲ جدایه این نسبت بیش از ۱/۵ بود. این ۱۲ جدایه در محیط مایع نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. تاثیر جدایه ها از نظر توان حل کنندگی فسفر آلی نامحلول نیز در سطح ۱ درصد معنی دار گردید (جدول۴). در نهایت تعداد ۴ جدایه که میزان فسفر محلول در محیط های رشدآنها حدود ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر یا بیشتر بود به عنوان جدایه های برتر نهایی انتخاب شدند. این جدایه ها توانستند pH محیط را از ۷/۲ به کمتر از ۴ کاهش دهند. نسبت قطر هاله به قطرکلنی این جدایه ها در محیط جامد حاوی فسفر آلی نیز قابل توجه بود. غلظت خالص فسفر از تفاضل فسفر مربوط به جدایه با شاهد قابل محاسبه است (جدول ۵).

جدول ۲ - گروه بندی جدایه ها از نظر تحمل به شوری

درجه تحمل	وضعیت رشد*	تعداد از ۳۰۰ جدایه	تعداد از۱۰۴ جدایه	شماره جدایه های برتر انتخابی
حساس	رشدضعیف تا نسبتا کم درسطح۱۰۰ mM	۲۶	۰	-
نیمه حساس	رشد متوسط تا شدید درسطح۱۰۰ و ضعیف تا نسبتا کم درسطح۲۰۰ mM	۲۹	۵	-
نیمه متحمل	رشد متوسط تا شدید درسطح ۲۰۰ وضعیف تا نسبتا کم درسطح۴۰۰ mM	۸۸	۲۹	۵، ۱۰، ۲۴۳
متحمل	رشد متوسط تا شدید درسطح۴۰۰ وضعیف تا نسبتا کم درسطح۶۰۰ mM	۸۲	۳۷	۲، ۳۸، ۱۶۱، ۱۷۱، ۲۳۱، ۲۴۵، ۲۴۷
بسیار متحمل	رشد متوسط تا شدید درسطح۶۰۰ mM	۷۵	۳۳	۲۲۲
	تعداد کل	۳۰۰	۱۰۴	۱۱

* مبنای مقایسه، میزان رشد کلنی هر جدایه در محیط NA بدون شوری بوده است

جدول ۳ – نتایج تجزیه فیزیکی و شیمیایی خاک مربوط به جدایه های انتخابی برتر

شماره خاک	دور آبیاری (روز)	شماره جدایه	عمق (Cm)	ECe (dS/m)	pH (1:1)	درصد T.N.V	درصد O.C	میکروگرم برگرم فسفر	پتاسیم	آهن	روی	منگنز	مس	درصد شن	درصد رس
۲	۴۸	۲۳۱	۰ - ۴۰	۷/۳۳	۷/۹۵	۱۴/۴	۰/۵۴	۲۱/۲۹	۲۵۶/۸	۳/۷۴	۰/۸۵	۴/۳۷	۱/۲	۵۶	۲۰
			۴۰ - ۸۰	۶/۸۳	۷/۶۱	۱۴/۵	۰/۲۱	۳/۲۷	۲۱۸	۲/۰۶	۱/۳	۲/۰۵	۱/۰۱	۵۰	۲۲
۳	۳۴	۲، ۵و۱۰	۰ - ۴۰	۴/۸	۷/۶۸	۸/۹	۰/۴۶	۲۲/۱۱	۱۹۸	۴/۵۵	۱/۸۶	۴/۷۲	۱/۱۵	۶۴	۱۶
			۴۰ - ۸۰	۵/۲۲	۷/۵۲	۹/۱	۰/۲۵	۸/۱۶	۲۵۶	۲/۹۵	۰/۶	۳/۴۱	۱/۰۳	۷۸	۹
۷	۴۴	۲۴۳	۰ - ۴۰	۲/۶۳	۸/۴۵	۱۴/۷	۰/۳۷	۱۱/۶	۳۹۰	۳/۶۷	۰/۸۶	۴/۰۷	۰/۳۵	۵۸	۲۴
			۴۰ - ۸۰	۳/۰۸	۸/۳۱	۱۵/۸	۰/۱۱	۵/۶۲	۴۰۸	۳/۶۶	۰/۵۲	۳/۲۶	۱/۲۹	۴۸	۳۳
۸	۳۶	۲۴۵و۲۴۷	۰ - ۴۰	۳/۷۱	۷/۷۵	۱۷	۰/۶۴	۴۷/۹۹	۱۹۸	۴/۰۲	۲/۷	۱۰/۳۰	۱/۱۹	۵۸	۱۹
			۴۰ - ۸۰	۴/۸۵	۷/۶۵	۲۰/۳	۰/۳۷	۳۰/۳۲	۳۳۲	۴/۱	۱/۴۴	۷/۱۱	۱/۳۴	۵۴	۲۱
۱۰	۴۸	۳۸	۰ - ۴۰	۷/۵۹	۷/۹۲	۱۴/۷	۰/۶۴	۲/۲۶	۳۲۰	۴/۷۷	۰/۶۶	۱۱/۵۰	۱/۴۸	۵۴	۲۸
			۴۰ - ۸۰	۱۰/۰۳	۷/۸	۱۶/۵	۰/۴۳	۱/۶۴	۳۹۰	۵/۴۸	۰/۵۵	۱۱/۲۱	۱/۳۸	۴۹	۳۶
۱۴	۴۰	۲۲۲	۰ - ۴۰	۳/۰۹	۷/۶۸	۱۳/۸	۰/۶۲	۳۸/۱۶	۲۱۸	۴/۹۹	۳/۱۶	۱۱/۲۰	۱/۴۱	۶۸	۱۸
			۴۰ - ۸۰	۲/۳۶	۷/۸۱	۱۸/۶	۰/۲۵	۲۳/۷۲	۲۷۴	۲/۵۲	۰/۸۵	۳/۱۲	۱/۱۰	۴۷	۲۳
۲۶	۳۰-۳۵	۱۷۱	۰ - ۴۰	۵/۹۵	۷/۷۱	۱۶/۱	۰/۱۷	۴/۶	۳۵۰	۲/۵۱	۰/۳۷	۲/۹۵	۱/۱۴	۴۱	۳۹
			۴۰ - ۸۰	۸۸/۸	۷/۹۰	۱۶/۵	۰/۱۱	۶/۳۲	۳۶۰	۳/۰۹	۰/۵۶	۱/۵۱	۰/۲۲	۴۷	۳۳
۳۰	۴۰	۱۶۱	۰ - ۴۰	۶/۶۸	۸	۱۳/۸	۰/۲۷	۷/۷۸	۴۲۸	۵/۳۴	۰/۵۴	۴/۱۳	۱/۲۲	۶۲	۳۱
			۴۰ - ۸۰	۹/۶۵	۷/۹۹	۱۷/۵	۰/۱۳	۴/۷۳	۲۷۴	۴/۴۹	۰/۸۳	۲/۲۵	۰/۳۷	۳۱	۵۷

جدول۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر جدایه های محرک رشد گیاه

منابع تغییر	میانگین مربعات (MS)																							
	فسفر						IAA						ACC (OD)					سیدروفور		PEG (OD)				
	معدنی		آلی																					
	pH	غلظت	کلنی هاله	pH	غلظت	قطرهاله	قطرکلنی	غلظت	DF	DFN	DFACC	DFACC-DF	کلنی /هاله	P0	P1	P2	P3	P4
ایزوله	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××	××
	۱/۳۲	۱۹۹۷۳	۷/۲۸	۴/۴۵	۱۶۸۳/۷	۲/۵۵	۳/۴۵	۱۴۵/۹	۰/۰۰۰۷۶	۱/۹۸۳	۰/۵۷۰	۰/۵۸۹	۰/۴۸۳	۰/۱۹۴	۰/۱۳۹	۰/۰۸۳	۰/۱۲۹	۰/۶۲۸
خطا	۰/۰۳۵	۳۴/۰۳	۰/۰۳۹	۰/۰۱۶	۸۲/۳۶	۰/۲۷۶	۰/۲۴۷	۲/۵۰	۰/۰۰۰۰۹	۰/۰۰۵	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۴	۰/۰۲۰	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۱۶	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۰۰۳
درجه آزادی	۱۰۳	۱۰۳	۱۰۳	۱۱	۱۱	۲۵	۲۵	۲۵	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰۳	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰

×× = معنی دار در سطح یک درصد

جدول۵- میزان کاهش pH ، غلظت فسفرمحیط ونسبت قطرهاله به کلنی جدایه های انتخابی حل کننده فسفاتهای نامحلول

شماره جدایه	فسفات معدنی (محیط مایع)		فسفات آلی		
	pH	غلظت فسفر (µg/ml)	نسبت قطرهاله به کلنی (محیط جامد)	pH (محیط مایع)	غلظت فسفر (µg/ml)
۲	۲/۷۹k	۴۳۷/۵ a	۱۲/۵۶ a	۲/۶۷ f	۱۱۹/۷ a
۵	۳/ ۸۰j	۳۱۵d	۶/۳ c	۳/۵۹ d	۶۷/۶de
۲۳۱	۳/۸۵ j	۳۴۴/۲c	۵e	۳/۷۴d	۹۳/۷ bc
۲۴۵	۳/۷۷ j	۳۶۱/۷b	۷/۵۳ b	۳/۲۲e	۱۰۴/۱ ab
شاهد	۵/۹۳a	۱۵/۶yz	–	۶/۴۴a	۳۶/۸fg

حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد می باشد

توان تولید سیدروفور

تفاوت جدایه ها از نظرتوان تولید سیدروفور بر اساس شاخص نسبت قطر هاله به قطرکلنی در سطح ۱ درصد معنی دار شد(جدول۴). از بین ۱۰۴ جدایه مورد مطالعه، در ۴۶ جدایه بعد از ۲۴ ساعت این نسبت مساوی یا بیش از ۱/۵ بود. مقایسه میانگین این نسبت برای جدایه های مختلف نیز در سطح ۱ درصد معنی دار گردید. جدایه های ۱۰، ۳۸، ۱۶۱ و ۲۴۳ دارای بالاترین نسبت بودند و در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. جدول ۶ نسبت قطر هاله به قطر کلنی این جدایه ها را در فواصل زمانی اندازه گیری شده نشان می دهد. با توجه به اینکه ظهور هاله نارنجی در اطراف جدایه های فعال زودتر شروع و پیشرفت آن از سرعت اولیه بیشتری برخوردار بود، لذا نسبت قطر هاله به کلنی در ۲۴ ساعت اولیه به عنوان معیار انتخاب جدایه های برتر در نظر گرفته شد. این نسبت در جدایه ها با گذشت زمان به طور متوسط کاهش یافت (جدول ۶).

جدول ۶ – نسبت قطر هاله به کلنی جدایه ها در محیط CAS آگار در فواصل زمانی اندازه گیری شده

شماره ایزوله	۱ روز	۲ روز	۴ روز	۸ روز	۱۰ روز
۱۰	۳/۶۷bcd	۳/۷۷ab	۳/۹۰a	۲/ ۷۰ abc	۲/۰۷ bcdef
۳۸	۴/۳۷a	۳/۲۷ bcdef	۱/۹۳ i-r	۱/۳ o-v	۱/۲ pqrst
۱۶۱	۴/۰۷ab	۳/۱۷cdefg	۲/۸۷ cde	۲/۱۳ defgh	۱/۵۷ i-p
۲۴۳	۳/۹۳abc	۳/۹۳a	۳/۶۰ab	۲/۹۳ a	۲/۴۷ a

حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد می باشد

توان تولید IAA

از ۱۰۴ جدایه مورد مطالعه، ۴۷جدایه دارای اندازه کلنی مساوی یا بیش از ۲ میلیمتر و رنگ کلنی کم و بیش آلبالویی بودند.

در مورد سایر جدایه ها اندازه قطر هاله یا کلنی کوچکتر و رنگ آنها عمدتا قهوه ای کم‌رنگ بود. تعداد ۲۶ جدایه که قطر هاله یا کلنی آنها بیش از ۲/۵ و رنگ کلنی آنها تیپیک تر بود برای آزمون کمی انتخاب شدند. تفاوت بین میزان IAA تولیدی ایزوله‌ها در سطح ۱ درصد معنی دار شد (جدول۴). در ۱۹ جدایه میزان تولید IAA بیش از ۵ میکرو گرم در میلی لیتر بود. در نهایت ۴ جدایه که میزان تولیدIAA آنها بیش از ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر بود به عنوان جدایه های برتر نهایی انتخاب شدند. جدول ۷ خصوصیات این جدایه ها را در محیط جامد و مایع نشان می دهد.

جدول۷- وضعیت رنگ، قطر هاله، قطر کلنی و غلظت IAA تولیدی جدایه های انتخابی

شماره جدایه	محیط جامد			غلظتIAA در محیط مایع (µg/ml)
	قطر هاله (mm)	قطرکلنی (mm)	نوع و شدت رنگ	
۱۷۱	۴/۵abcd	۱/۵hi	آلبالویی کم رنگ	۳۴/۳a
۲۲۲	۵ab	۲ghi	آلبالویی	۱۳c
۲۳۱	۵/۳a	۵/۳a	آلبالویی کم رنگ	۱۱ cd
۲۴۵	۴/۷abc	۴/۷ ab	آلبالویی کم رنگ	۱۰/۷ cde

حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد می باشد

میزان فعالیتACC- دآمیناز

در ۲۲ جدایه از ۱۰۴ جدایه نسبت قطر کلنی در محیط DF حاوی ACC به قطر کلنی در محیط DF مساوی یا بیش از ۱/۵ و اختلاف اندازه کلنی آنها مساوی یا بیش از ۱ میلیمتر بود. از بین این ۲۲ جدایه ۱۱۷ جدایه که اختلاف رشد کلنی آنها در محیط DF حاوی ACC با محیطDF حاوی نیتروژن کمتر بود انتخاب، و میزان رشد آنها از طریق کدورت سنجی در محیط DF مایع حاویACC و مقایسه آنها با محیط های DF (شاهد منفی) و DF حاوی نیتروژن (شاهد مثبت) مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. تفاوت جدایه ها از نظر میزانOD در سطح ۱ درصد معنی دار گردید (جدول ۴). جدایه های ۲۳۱، ۲۴۵ و ۲۴۷ که دارای بیشترین OD در محیط DF حاویACC بودند و تفاوت OD آنها در محیط DF حاوی ACC با محیط DF نیز حداکثر مقادیر را داشت، به عنوان جدایه های برتر دارای فعالیت آنزیم ACC – دآمیناز انتخاب شدند(جدول۸).

میزان تحمل جدایه ها به خشکی

در این مرحله تعداد ۱۱ جدایه ای که در آزمونهای تعیین صفات محرک رشدی به عنوان جدایه های برتر انتخاب

شدند از نظر میزان تحمل به خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. با افزایش میزان پلی اتیلن گلیکول مصرفی میزان رشد جدایه ها به طور معنی داری کاهش یافت. میزان رشد جدایه ها در سطح ۵- بار از حداقل ۲۹/۲ تا حداکثر ۶۵ درصد، در سطح ۱۰ – بار از حداقل ۳۳ تا حداکثر ۷۲/۴ درصد ، در سطح ۲۰ – بار از حداقل ۵۷ تا حداکثر ۹۹/۲ و در سطح ۳۰ – بار از حداقل ۶۸/۴ تا حداکثر ۹۹/۹ درصد نسبت به شاهد بدون پلی اتیلن گلیکول کاهش یافت. جدایه شماره ۳۸ در سطح ۲۰ – بار و جدایه های ۲۴۵ و ۲۴۷ در سطح ۳۰ – بار قادر به رشد نبودند. میزان رشد جدایه شماره۲۴۷ در سطح ۲۰ – و جدایه های شماره ۵، ۱۷۱ و ۲۳۱ در سطح ۳۰ – بار ناچیز بوده است (جدول ۹).

جدول ۸- وضعیت رشد جدایه های انتخابی مولد ACC- دآمیناز در محیط DF مایع حاوی ACC

شماره جدایه	میزان OD			
	DF	DF+N	DF+ACC	اختلاف OD (ACC با DF)
۲۳۱	۰/۰۳۲bcd	۱/۸۴۷a	۰/۴۲۶c	۰/۳۹۴c
۲۴۵	۰/۰۲۳cd	۱/۷۲ab	۱/۱۶۹a	۱/۱۴۶a
۲۴۷	۰/۰۱۱d	۱/۷۲۳ab	۰/۹۸۰b	۰/۹۶۸b

حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد می باشد

جدول ۹- وضعیت رشد (OD 600nm) و میزان کاهش رشد (RP) جدایه ها در سطوح مختلف PEG

میزان PEG (gr)	شماره ایزوله										
	۲	۵	۱۰	۳۸	۱۶۱	۱۷۱	۲۲۲	۲۳۱	۲۴۳	۲۴۵	۲۴۷
۰	۰/۹۲۱f	۱/۰۷۲d	۱/۴۱۶b	۱/۱۲۶d	۱/۲۳۹c	۱/۳۳۷b	۱/۳۸۷b	۰/۹۴۶ef	۱/۷۴۶a	۱/۰۳۶ed	OD=۰/۹۶ef
(۰ بار)	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	RP=۰
۲۰۲/۱۳	۰/۴۴۷f	۰/۷۵۹cd	۰/۷۸۸c	۰/۶۷۳de	۰/۴۳۴f	۰/۸۱۶c	۰/۹۰۹b	۰/۶۶۷de	۱/۱۹۵a	۰/۶۵۷e	OD=۰/۵۸e
(۵- بار)	۵۱/۵b	۲۹/۲f	۴۴/۳c	۴۰/۴cd	۶۵a	۳۹/۱cd	۳۴/۵def	۲۹/۵f	۳۶/۶de	۳۶/۶de	RP=۳۹/۷cd
۲۹۵/۷۱	۰/۴۲d	۰/۷۱۶b	۰/۵۴۲c	۰/۵۷۹c	۰/۳۴۲e	۰/۷۲۳b	۰/۶۷۷b	۰/۳۲۹e	۰/۸۶a	۰/۵۴۳c	OD=۰/۵۳c
(۱۰- بار)	۵۴/۳c	۳۳g	۶۱/۷b	۴۸/۶def	۷۲/۴a	۴۵/۹ef	۵۱/۲cd	۶۵/۲b	۵۰/۷cde	۴۷/۶def	RP=۴۴/۷f
۴۲۸/۳۸	۰/۲۹۸d	۰/۴۲۹c	۰/۴۱۵c	۰/۰۰۸e	۰/۲۴۹d	۰/۵۳۳b	۰/۵۹۶ab	۰/۳۰۹d	۰/۶۴۴a	۰/۴۳۸c	OD=۰/۰۳۲e
(۲۰- بار)	۶۷/۶cd	۵۹/۹۶ef	۷۰/۷c	۹۹/۲a	۷۹/۹b	۶۰/۱ef	۵۷f	۶۷/۴cd	۶۳/۱de	۵۷/۷f	RP=۹۶/۷a
۵۴۸/۸۰	۰/۲۹۱c	۰/۰۶۲f	۰/۳۷۰a	۰/۰۰۱h	۰/۱۹۲e	۰/۰۲۸g	۰/۳۱۲b	/۰۱۰h	۰/۲۳۷d	۰/۰۰۳h	OD=۰/۰۰۴h
(۳۰- بار)	۶۸/۴h	۹۴/۲c	۷۳/۹g	۹۹/۹a	۸۴/۵e	۹۷/۹b	۷۷/۵f	۹۸/۹ab	۸۶/۴d	۹۹/۷a	RP=۹۹/۷a

حروف مشترک در هر ستون به معنی عدم وجود اختلاف معنی دار در سطح ۱ درصد می باشد

شناسایی نسبی جدایه های برتر

نتایج مطالعه ویژگیهای مرفولوژیک و خصوصیات بیوشیمیایی ۱۱ جدایه برتر انتخاب شده در مرحله نهایی، در جدول شماره ۱۰ آورده شده است. با توجه به نتایج حاصل می توان به عنوان شناسایی مقدماتی که محققا نیاز به تکمیل با استفاده از روشهای ژنتیکی دارد، چهار جدایه به شماره های ۳۸، ۱۶۱، ۱۷۱ و ۲۲۲ را که به شکل باسیل های گرم مثبت ، اسپوردار و بی هوازی اختیاری هستند، را از جنس*Bacillus* دانست. آزمایشات مرفولوژیک و فیزیولوژیک این ۴ جدایه نشان داد که جدایه ۱۷۱ دارای خاصیت تولید لسیتیناز بوده و از نظرتولید اسید از مانیتول منفی می باشد و مطابق نظر Fritz (۲۰۰۴)، احتمالا در گروه *Bacillus cereus* قرارمی گیرد. جدایه ۲۲۲ فاقد صفت تولید لسیتیناز است ولی قادر به تولید اسید از مانیتول و گلوکز و آرابینوز می باشد، بنابراین با توجه به سایر صفات بیوشیمیایی احتمالا متعلق به جنس *B. firmus* باشد. جدایه های ۳۸ و ۱۶۱ در تولید لسیتیناز و تولید اسید از مانیتول، گلوکز ، آرابینوز و گزیلوز ناتوان بودند. در مشاهدات میکروسکپی جدایه ۳۸ آرایش زنجیره ای و کلاف مانند و جدایه ۱۶۱ آرایش پراکنده و بدون زنجیر ایجاد کرده اند.

بنابراین با توجه به منفی بودن تولید لسیتیناز و فقدان قدرت همولیز خون و فرم ریزوئیدی کلنی و پاراسپورال بودن، می توان احتمال داد که در گروه *B.subtilis* قرار گیرند، اما از نظر صفات تولید اسید از قندها با این گروه تفاوت دارند. به هر حال تعیین توالی 16S rRNA/DNA و روش دو رگه سازی DNA/DNA برای تعیین هویت کامل و موقعیت فیلوژنتیکی این جدایه ها لازم است.

جدایه های شماره ۱۰ و۲۴۳ به ترتیب با صفات کوکوباسیل و باسیل بلند، گرم مثبت،کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی می باشند. جدایه شماره ۱۰ باتوجه به نتایج آزمونها، غیر منظم بودن باسیل و عدم رشد در شرایط بی هوازی احتمالا متعلق به جنس *Arthrobacter* و جدایه ۲۴۳ به علت داشتن دانه‌های متاکروماتیک احتمالا متعلق به جنس *Corynebacterium* باشند. ۵ جدایه به شماره های ۲، ۵، ۲۳۱، ۲۴۵ و ۲۴۷ از نوع باسیل گرم منفی و بدون اسپور می باشند. جدایه های ۲، ۵، ۲۳۱ و ۲۴۵ همگی کاتالاز و اکسیداز مثبت و قادر به حرکت بوده و توانایی تخمیر قند لاکتوز و رشد در شرایط بی هوازی را ندارند. بنابر این با توجه به نتایج جدول ۱۰

جدول ۱۰ – نتایج آزمون های مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه های برتر انتخابی

شماره جدایه	۲	۵	۱۰	۳۸	۱۶۱	۱۷۱	۲۲۲	۲۳۱	۲۴۳	۲۴۵	۲۴۷
واکنش گرم	–	–	+	+	+	+	+	–	+	–	–
شکل آرایش	باسیل کوتاه پراکنده	باسیل پراکنده	کوکوباسیل دو تایی	باسیل زنجیره	باسیل پراکنده	باسیل پراکنده	باسیل سه تایی	باسیل بلند پراکنده	باسیل بلند پراکنده	باسیل بلند پراکنده	باسیل بلند پراکنده
اندازه(μ)	۰/۸×۰/۵	۲×۰/۵	۱×۰/۵	۳-۵× ۰/۸-۱	۳×۰/۵	۳×۱/۳	۳×۱	۲×۰/۷	۳×۱	۳×۰/۸	۲×۱
شکل اسپور	–	–	–	بیضوی مرکزی	بیضوی مرکزی	بیضوی متورم	بیضوی مرکزی	–	–	–	–
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	–	–	+	+	+	+	–	+	–
OF[1] هوازی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF بیهوازی	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	+
حرکت	+	+	+	–	–	–	–	+	+	+	+
اندول	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
TSI[2]	A/A	K/A[3]	×	×	×	×	×	K/A	×	K/A	K/A
سیترات	+	+	×	–	–	–	–	+	×	+	+
همولیز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+B
تخمیر لاکتوز	–	–	×	×	×	×	×	–	×	–	+
رشد در EMB[4]	+	+	×	×	×	×	×	+	×	+	+
SS[5]	+	–	×	×	×	×	×	+ارغوانی	×	+ارغوانی	+ارغوانی
D.C[6]	+	+زرد	×	×	×	×	×	+زرد	×	+زرد	+زرد
B.SA[7]	–	–	×	×	×	×	×	–	×	–	–
LIA[8]	+ارغوانی	+ارغوانی	×	×	×	×	×	+ارغوانی	×	+	+ارغوانی
آرابینوز	–	–	+	–	–	–	+	–	+	+ –	–
گزیلوز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
مانیتول	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–
ساکارز	+	–	×	–	+		–	–	×	–	+ –
اوره-آز	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–
INM[9]	+	+	+	+	–	–	–	+	+	+	+
MR[10]	+	+	×	–	–	–	+	+	×	+	+
Tween	×	×	×	+	+	+	+	×	×	×	×
لستیناز	×	×	×	–	–	+	–	×	×	×	×
آمیلاز	×	×	×	+	+	+	+	×	×	×	×
نمک ۵٪	×	×	+	×	×	×	×	×	+	×	×
نمک ۷٪	+	×	+	+	+	+	+	×	+	×	×
نمک ۱۰٪	+	×	–	–	–	+	+	×	–	×	×
نمک ۱۵٪	×	×	–	×	×	×	×	×	–	×	×
پیگمان	–	=	=	=	=	+	+	–	–	–	–
احیاء نیترات	×	×	+	+	–	–	–	×	+	×	×
VP[11]	–	–	×	–	+	+	–	–	×	–	–
رشد در ۴	×	×	×	–	+	+	+	×	×	×	×
Skim milk	×	×	×	–	–	+	–	×	×	×	×
رشد در ۶۰	×	×	×	+	–	–	–	×	×	×	×
اسید از فروکتوز	×	×	×	–	+	+	–	×	×	×	×
گاز از گلوکز	×	×	×	–	–	–	–	×	×	×	×
رشد بیهوازی	×	×	–	+	+	+	+	×	–	×	×
تجزیه اسکولین	×	×	–	×	×	×	×	×	–	×	×
مقاومت سیتراسین	×	×	+	×	×	×	×	×	+	×	×
اسید از سالیسین	×	×	+	×	×	×	×	×	+	×	×
اسید ازگلوکز	–	–	–	×	×	×	×	–	–	–	–

(+)= انجام تست و نتیجه مثبت (–) = انجام تست و نتیجه منفی (×) = عدم ضرورت انجام تست

1.Oxidative/Fermentative
2.Triple Sugar Iron Agar
3. Alk/Acid
4. Eosine Methylene Blue
5. Salmonella Shigella Agar
6.Decarboxylate Agar
7. Bismuth Sulfite Agar
8. Lysine Iron Agar
9. Indole Nitrite Medium
10. Methyl red
11. Voges Proskauer

و ایجاد کلنی صورتی رنگ در محیط EMB و رنگ ارغوانی در محیط LIA احتمالا متعلق به جنس *Pseudomonas* و جدایه شماره ۲۴۷ که اکسیداز منفی و قادر به تخمیر قندهای لاکتوز و ساکارز است احتمالا متعلق به جنس *Citrobacter* باشند (Holmes et al., 1984).

بحث

بیش از ۸۰ درصد از ۳۰۰ باکتری جدا شده از ریزوسفر درختان پسته، کم و بیش توانستند حداکثر سطح شوری استفاده شده (EC= ۶۴ dS/m) را تحمل کنند. افزایش سطح شوری باعث کاهش توده کلنی جدایه ها گردید، به طوریکه در مورد بعضی از جدایه ها در سطوح بالای شوری میزان رشد در ۲۴ ساعت اولیه نامحسوس بود. هر چند که ارتباط معنی داری بین خصوصیات محل نمونه برداری و میزان تحمل جدایه ها به شوری مشاهده نشد، اما در مجموع تحمل قابل توجه جدایه ها می تواند احتمالا ناشی از شرایط حاکم بر باغهای پسته استان باشد. علیرغم نمونه برداری بعد از بارندگیهای زمستانه ، شوری نمونه های خاک مربوط به جدایه های انتخابی برتر از ۲/۳۶ تا ۱۰/۰۳ (جدول ۳) و در بین کل نمونه های خاک از ۱/۹۸ تا dS/m ۱۵/۱۷متغیر بود. مسلما میزان افزایش غلظت املاح و کاهش رطوبت در لایه های نمونه برداری شده در طول فصول گرم سال، شدیدتر بوده و میکروارگانیزم ها در معرض شدت بیشتری از این تنش ها قرار می گیرند. سویه های برتر PGPRsجدا شده از ریزوسفر ذرت درکشور هندوستان توانستند در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد، در حضور ۷ درصد کلرید سدیم و در محدوده pH=۵/۷-۹/۹ به خوبی رشد کنند(Tilack and Reddy, 2006).

از ۱۰۴ جدایه انتخاب شده برای تعیین صفات محرک رشدی ،۸۰ درصد دارای یکی از صفات PGPRs بودند. ۴۶ درصد از جدایه ها مولد سیدروفور، ۴۷ درصد مولد IAA، ۳۳ درصد دارای توانایی حل فسفاتهای نامحلول و ۲۲ درصد مولد آنزیم ACC – دآمیناز بودند. Cattelan et al. (۱۹۹۹)، ۱۱۶ جدایه را از ریزوسفر سویا جداسازی و مورد مطالعه قرار دادند.۲۲ جدایه حداقل یک صفتPGPRs مطالعه شده را داشتند. ۷ جدایه مولد سیدروفور،۵ جدایه حل کننده فسفات ، ۴ جدایه مولد IAA و ۸ جدایه قادر به استفاده از ACC بودند. در بررسی .Antoun et al(۱۹۹۸)، از بین ۲۶۶ سویه از باکتریهای ریزوبیومی ۸۳ درصد مولد سیدروفور، ۵۸ درصد مولدIAA و ۵۴ درصد حل کننده فسفات بودند.

از جدایه های ریزوسفری پسته، ۳۳ درصد دارای توان حل کنندگی فسفات های معدنی بودند. متوسط میزان انحلال فسفر معدنی ۳۸/۹۳ و حداکثر آن ۴۲۱/۹ میکروگرم در میلی لیتر مربوط به جدایه شماره۲ می باشد. این جدایه ضمن کاهش قابل توجه pH محیط رشد از ۷/۲ به ۲/۷۹ ،توانست ۸۴/۴ درصد فسفر نامحلول را به شکل محلول درآورد. .Jeon et al (۲۰۰۳)، نشان دادند که۳ سویه *Pseudomonas fluorescens* در محیط PKV (Pikovskaya) حاوی ۵ گرم در لیتر تری کلسیم فسفات توانستند در مدت ۵ روز به ترتیب ۴۵۸/۳ ، ۴۴۷/۶ و ۴۲۷/۷ میکروگرم در میلی لیتر از فسفر نامحلول را به شکل محلول تبدیل کنند. مقادیر فوق به ترتیب معادل ۴۵/۸ ، ۴۴/۸ و ۴۲/۸ درصدکل فسفر نامحلول محیط می باشند. pH محیط این جدایه ها نیز از ۷ به ترتیب به ۴/۱ ، ۴ و ۴/۴ کاهش یافته بود. جدایه های برتر حل کننده فسفات که از ریزوسفر درختان پسنه جدا شدند همگی متعلق به جنس *Pseudomonas* بوده،و به واسطه توانایی قابل توجه آنها در کاهش pH ، از کارآیی بالایی برخوردار بودند. .Ahmad et al (۲۰۰۶)، ۷۲ جدایه از باکتری های مختلف ریزوسفری را مورد بررسی قرار دادند که در بین آنها بیش از ۸۰ درصد باسیلوس و ۵۵/۵ در صد از سودوموناس ها حل کننده فسفات بودند.

در این پژوهش، ۴۶ درصد از جدایه ها مولد سیدروفور بودند. متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه ها بعد از ۲۴ ساعت از حداقل۱ تا حداکثر ۴/۳۷ متغیر، و میانگین آنها ۱/۷ بود. نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه ها به طور متوسط با افزایش زمان کاهش یافت. در بررسی .Soltani et al (۲۰۰۷)، تمام جدایه های *Pseudomonas fluorescens* توان تولید سیدروفور را داشتند اما نسبت قطر هاله به کلنی در آنها از ۰/۳۴ تا ۱/۲۱ متغیر بود. هیچکدام از جدایه های فلاووباکتریوم قادر به تولید سیدروفور نبودند. با توجه به نتایج جدول ۶، جدایه‌های برترجدا شده از ریزوسفر درختان پسته توان بیشتری در تولید سیدروفور داشته اند.

از ۱۰۴ جدایه مورد مطالعه در این پژوهش، ۴۷ درصد مولد IAA بودند. اندازه هاله جدایه ها در ارزیابی کیفی از کمتر از ۲ میلیمتر تا حداکثر ۵/۳ متغیر، و متوسط اندازه هاله ۳/۴ میلی متر بود. میزان تولید IAA از حد اقل ۲/۶۷ تا حداکثر ۳۴/۳ و متوسط IAA تولیدی ۸/۲۴ میکرو گرم در میلی‌لیتر بود. در بررسی Soltani et al (۲۰۰۷)، میزان تولید اکسین در جدایه های*Pseudomonas fluorescens* از ۱/۳ تا ۴/۵ و در فلاووباکترها از ۰/۲۷ تا۱۲/۰۳ میکرو گرم در میلی لیتر متغیر بود. در بررسی.Alikhani et al(۲۰۰۷)، از۲۲۰ جدایه ریزوبیومی خاکهای ایران،۷۴/۱ درصد مولد IAA بودند و حداکثر نسبت قطر هاله به قطر کلنی ۲/۷ گزارش شد. Ahmad et al.(۲۰۰۵)، تولید اکسین ۱۱ سویه *Pseudomonas*

fluorescens را در یک محیط مایع مغذی مورد برسی قرار دادند. میزان تولید اکسین این جدایه ها برحسب میزان تریپتوفان مصرفی متفاوت و از ۵/۳۴ تا ۲۲/۴۴ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود. درمطالعه Ahmad et al (۲۰۰۶)، در کشور هندوستان از۷۲ جدایه ریزوسفری حدود ۸۰ درصد از سودوموناسها و ۲۰ درصد از باسیلها مولد IAA بودند.

از جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق،۲۲ درصد مولد آنزیم ACC – دآمیناز بودند. حداکثر اختلاف قطر کلنی در محیط DF جامد حاوی ACC با محیط جامد DF برابر ۵ میلیمتر و حداکثر اختلاف دانسیته نوری مربوط به محیط DF مایع حاوی ACC با محیط مایع DF فاقد نیتروژن برابر ۱/۱۴۹ بود. در بررسی .Alikhani et al (۲۰۰۷)، از ۵۲ جدایه ریزوبیومی خاکهای ایران،۶۷/۳ درصد توانایی تولیدACC – دآمیناز را داشتند و میزان رشد بعضی از جدایه ها در محیط DF جامد حاوی ACC بیش ازمحیطDF جامد حاوی نیتروژن (شاهد مثبت) بود.

در بررسی تاثیر تنش خشکی، گر چه افزایش سطح پلی اتیلن گلیکول در محیط NB باعث کاهش معنی دار میزان رشد جدایه‌های انتخابی گردید، اما تمامی جدایه ها توانستند در سطح ۱۰- بار رشد کنند. در سطح ۲۰- بار یک جدایه و در سطح ۳۰- بار ۳ جدایه از ۱۱ جدایه قادر به رشد نبودند. بر اساس پرسشنامه های تکمیلی که در زمان نمونه برداری تهیه شدند، دور آبیاری در باغهای مربوط به جدایه های انتخابی از ۳۰ تا ۴۸ و در بین کل باغهای نمونه برداری شده از ۳۰ تا ۷۰ روز متغیر بود که این کمبود رطوبت نسبتا طولانی مدت می تواند تا حدودی مقاومت بالای باکتریهای ریزوسفری را در مقابل تنش خشکی توجیه کند. .Mohamad et al(۱۹۹۱)، ۹۲ سویه *Rhizobium meliloti* را از نظر تحمل به خشکی مورد مطالعه قراردادند. در۳۰ جدایه میزان رشد بر اساس کدورت محیط رشد از ۱۰۰ درصد در Mpa ۰/۴- تا صفر درصد(عدم رشد) در Mpa۱- نسبت به محیط شاهد فاقد پلی اتیلن گلیکول متغیر بود. در بررسی رحمان(۲۰۰۲) باکتری ریزوبیوم مقاوم به نمک توانست محیط (YEB (Yeast Extract Manitol Broth حاوی ۴۵ درصد PEG6000 (w/v) را به مدت ۵ روز بعد از تلقیح تحمل کند. سویه موتانت این باکتری که توان مقاومت به خشکی را از دست داده بود قادر به تثبیت نیتروژن در حضور ۵ درصد PEG نبود.

در این مطالعه مطابق جدول ۱۰، تعداد ۴ باسیل گرم مثبت اسپور دار بیهوازی اختیاری توانستند در تولید سیدروفور(جدایه های شماره۳۸ و۱۶۱) و IAA (جدایه های شماره ۱۷۱ و۲۲۲) فعال باشند. آزمایشات مرفولوژیک و فیزیولوژیک این ۴ جدایه نشان داد که جدایه ۱۷۱ احتمالا در گروه*Bacillus cereus*، جدایه ۲۲۲ احتمالا متعلق به جنس *B. firmus* و جدایه های ۳۸ و ۱۶۱ در گروه*B.subtilis* قرار گیرند. این سه گونه باکتری در گزارشات متعددی به عنوان باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه، خصوصا از نظر توان حل کنندگی فسفات های نامحلول معرفی شده اند (Gaind and Agur, 1991; Tilack et al., 2005; Rai, 2006). به هر حال تعیین توالی 16S rRNA/DNA و روش دو رگه سازی DNA/DNA برای تعیین هویت کامل و موقعیت فیلوژنتیکی این جدایه ها لازم است.

در بین ۱۱جدایه جدول ۱۰ دو جدایه ۱۰ و ۲۴۳به ترتیب به شکل کوکوباسیل و باسیل بلند هستند که جدایه شماره ۱۰ احتمالا متعلق به جنس*Arthrobacter* و جدایه ۲۴۳ به علت داشتن دانه های متاکروماتیک متعلق به جنس *Corynebacterium* باشد. این دو جدایه در تولید سیدروفور فعال بودند. گونه هایی از باکتری های این دو جنس به واسطه داشتن توان حل کنندگی فسفات های نامحلول و تثبیت غیر همزیست نیتروژن به عنوان باکتری های محرک رشد گیاه معرفی شده اند(Tilack et al., 2005; Rai, 2006).جدایه های شماره ۲، ۵، ۲۳۱، ۲۴۵ و ۲۴۷ در جدول ۱۰ به عنوان باسیل گرم منفی بدون اسپور گزارش گردیده اند. جدایه های ۲ و ۵ به واسطه توانایی قابل توجه در حل نمودن فسفاتهای نامحلول معدنی و آلی، جدایه های ۲۳۱ و ۲۴۵ به واسطه توانایی قابل توجه در حل نمودن فسفاتهای نامحلول معدنی و آلی و تولید ACC – دآمیناز و جدایه ۲۴۷ به واسطه توانایی قابل توجه در تولید ACC – دآمیناز به عنوان جدایه های برتر انتخاب شدند.

جدایه ۲۴۷ احتمالا متعلق به جنس *Citrobacter*، (Holmes et al., 1984) و سایر جدایه ها ی گرم منفی با توجه به ایجاد کلنی صورتی رنگ در محیط EMB و رنگ ارغوانی در محیط LIA و نتایج جدول ۱۰، احتمالا متعلق به جنس *Pseudomonas* باشند.گونه هایی از باکتری های جنس *Citrobacter* خصوصا در اراضی شالیزاری به واسطه داشتن توانایی تثبیت غیر همزیست نیتروژن باعث بهبود رشد گیاه شده اند(Tilack et al., 2005).گونه های متعددی از باکتریهای جنس *Pseudomonas*نیز دارای توان حل کنندگی فسفات های نامحلول (Cattelan et al., 1999; Jeon et al., 2003; Tilack et al., 2005; Rai, 2006)، تولید IAA (Patten and Glick, 2002; Ahmad et al., 2005; Tilack et al., 2005; Rai, 2006)، سیدروفور(Cattelan et al., 1999; Jeon, 2003; Soltani, 2007) و ACC – دآمیناز(Cattelan et al., 1999) بوده و به عنوان باکتری های محرک رشد گیاه معرفی شده اند.

در این پژوهش صفات محرک رشدی جدایه های انتخاب شده بسیار برجسته بوده و با توجه به تحمل بالای این جدایه ها به تنش های شوری و خشکی محیط، انتظار می رود پس از انجام مطالعات گلخانه ای بتوان از مایه تلقیح آنها برای بهبود وضعیت تغذیه ای و رشد درختان پسته در شرایط نامساعد باغهای استان کرمان استفاده کرد. عقیده بر این است که جداسازی و مطالعه جدایه های بومی که با محیط سازگار شده اند می تواند منجر به تولید مایه تلقیح هایی شود که برای محصولات آن منطقه کارآیی بیشتری نسبت به جدایه های غیر بومی داشته باشند(Fisher et al., 2007) .

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی مصوب قطب علمی بهبود کیفیت خاک برای تغذیه متعادل گیاه در دانشگاه تهران می‌باشد که بدینوسیله تشکر و قدردانی می نماید. از دیگر عزیزانی که در انجام این پژوهش ما را یاری رساندند، سپاسگزاری می‌گردد.

REFERENCES

Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2005). Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of tryptophan.*Turk. J. Biol*. 29: 29-34.

Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M. S. (2006). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res*.36: 1-9.

Alexander, D. B., and Zuberrer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagent to evaluate siderophore production by rhizobacteria.*Biol.Fertil.Soil* 12(1): 39-45.

Alikhani, H. A., Saleh Rastin, N., and Bihamta, M. R. (2007). IAA and ACC-deaminase production by native rhizobia strains and effects of selected strains on plant growth characterization .*Iranian J. Agric. Sci*., 38 (4): 693-703.(In Farsi).

Amooaghaie, R., Mostajeran, M., and Emtiazi, G. (2002). The effect of strain and concentration of *Azospirillum brasilense* bacterium on growth and development of root in wheat cultivars. *Iranian J. Agric. Sci*., 33(2): 213-222.(In Farsi)

Anonymous. (2005). *Agronomic and horticultural crops*. Ministry of agriculture, Tehran, Iran. (In Farsi).

Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., and Lalande, R. (1998). Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legomes: effect on radishes (*Raphanus sativa* L.) *Plant Soil*, 204(1): 57- 67.

Ashraf, M., Hasanain, S., Berge, O., and Mahmood, T. (2004). Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biol. Fertil. Soils*, 40(3): 157-162.

Bacili, M., Rodriguez, H., and Moreno, M. (2004). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum. Biol. Fertil. Soils*, 40(3): 188-193.

Barazani, O., and Friedman, J. (1999). Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria. *J. Chem. Eco*., 25(10): 2397-2406.

Baron, E. J., and Fingold, S. M. (1990). *Bairly and Scott's diagnostic Microbiology*, 8th ealn, St. Louis. Mosby.

Bellis, P. D., and Ercolani, L. (2001). Growth interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. *Appl.Env. Microbiol*. 67(4): 1945-1948.

Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C. P., and Enebak, S. (2001). Alteration in plant growth and in root hormone levels of Lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol*. 47(9): 793-800.

Brick, J. M., Bostock, R. M., and S E., Silverstone, S. E. (1991). Rapid insitu assay for IAA production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Appl. Env. Microbiol*. 57(2): 535-538.

Brown, P. H., Zhang, Q., and Ferguson, L. (1994). Influence of rootstock on nutrient acquisition by Pistachio. *J. Plant Nutr*., 17(7), 1137-1148.

Cappiccino, J., (1992). *Microbiology: a laboratory manual*. The Benjamin/Cummings publishing company, INC.39. Bridge parkway Redwood City, California,94065

Cattelan, A. J., Hartel, P. G., and Fuhrmann, J. J. (1999). Screening for plant growth promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J*. 63:1670-1680.

Collins, C. H., and Patircia, M. (1985). *Microbiologycal methods*-5th ed. Filmset and printed in England by Butlerand Tanner LTD fome and London.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., and Barka, E. A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant disease: principles, mechanisms of action, and future prospects (minireview). *Appl.Env. Micribiol*., 71(9): 4951-4959.

Egamber, D. D., and Hoflich, G. (2003). Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. *Soil Biol. Biochem*.35: 973-978.

Fernandz, L. A., Zalba, P., Gomez, M. A., and Sargardoy, M. A. (2007). Phosphate- solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils*. 43(6): 805-809.

Fisher, S. E., Fisher, S. I., and Magris, S. (2007). Isolation and characterization of bacteria from the rhizosphere of wheat. *World J. Microbiol. Biotech*., 23(7): 895-903.

Fritz, D. (2004). Taxonomy of the Genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore–forming bacteria. *The Am. Phytopathol. Soc*., 94(11):1245-1248.

Gaind, S., and Gaur, A. C. (1991). Thermotolerant

phosphate solubilizing microorganisms and their interaction with mung bean. *Plant Soil*, 133(1): 141-149.

German, M. A., Burdman, S., and Okon, Y. (2000). Effect of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regims. *Biol Fertil Soils*, 32: 259-264.

Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Micobiol*. 41: 109-117.

Glick, B. R., Cheng, Z., and Czarny, J. (2007). Promoting of plant growth by ACC deaminase – producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol*., 119: 329-339.

Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L. J., and Poole, P. S. (2002). Role of microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil*, 245(1): 83-93.

Harrigan, W., and Cance, M. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, London, Academic Press.

Holmes, B., Owen, R., and McMeekin, T. (1984). *Bergeys manual of systematic Bacteriology*. Vol.1, Williams and Wilkins, U.S.A

Hontzeas, N., Saleh, S. S., and Glick, B.R. (2004). Changes in gen expression in Canola roots induced by ACC deaminase containing PGPR. *The Am. Phytopathol. Soc*., MPMI, 17(8): 865-871.

Jeon, J.S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., and Song, H. G. (2003). Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganism. *J. Microbiol*., 41(4): 271-276.

Lucy, M., Reed, E., and Glick, B. R. (2004). Application of free living plant growth promoting rhizobacteria (review article). *Antonie Van Leeuwenhock*, 86(1): 1-25.

Marschner, P., Crowly, D. E., and Sattelmacher, B. (1997). Root colonization and Iron- nutritional status of *Pseudomonas florescens* in different plant species.*Plant Soil*, 196(2): 311-316.

Michel, D.E., and Kaufmann, M. R. (1973). The osmotic potential of polyethylene Glycol 6000. *Plant physiology*, 51: 914-916

Mohamad, R. M., Akhavan-Khavazian, M., Campbell, W. F., and Rumbaugh, M. D. (1991). Identification of salt and drought –tolerant *rhizobium meliloti* strains. *Plant Soil*. 134(2): 271-276.

Muray, R. G., Doetsch, E., and Robinow, C. E. (1994). *Determinative and cytological light microscopy*; In: Reddy, C.A. (Ed), methods for general and molecular bacteriology. pp: 21-41.

Parry, M., Tarnball, P. C., and Gibson, J. R. (1988). *A color atlas of Bacillus species*. Wolfe medical publication LTD. 2-16 Toring ton place, London WCOIG 7 lt, England.

Patten, C.L., and Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. and Env. Microbiol*., P.,3795-3801.

Rai, M. K. (2006). *Hand book of microbial biofertilizers*. Food products press, an imprint of the Haworth press, Inc .p.p. 137-182.

Rehman, A., and Nautiyal, C. S. (2002). Effect of drought on the growth and survival of the strees-tolerant bacterium *Rhizobium sp*.NBRI2505 sesbania and its drought –sensitive transposon Tn5 mutant. *Current Microbiol*., 45(5): 368-377.

Reihani Tabar, A., Saleh Rastin, N., Alikhani, H. A., and. Mohammadi, M. (2002). Effect of native *Pseudomonas fluorescens* strains on the nutrient uptake by wheat *Iranian J. Agric. Sci*. 33 (4): 771-780. (In Farsi)

Rodriguez, H., and Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv*. 17: 319- 339.

Rogers, S. L., and Burns, R. G. (1994). Changes in aggregate stability, nutrient status, indigenus microbial population, and seedling emergence, following inoculation of *Nostoc muscorum*. *Biol Fertil Soils*, 18(3): 209- 215.

Smibert, R. M., and Krieg, N. R. (1994). *Phenotypic characterization*; In: P. Gerhardt, P., R. G.E. Murray, W.A. Wood and N.R.Krieg (eds). *methods for genetic and molecular bacter*iology, p.p.607-654. Washington, DC: American Society for microbiology.

Soltani Tolarod, A. A., Saleh Rastin, N., Khavazi, K., and Asadi Rahmani, H. (2007). Isolation and evaluation of PGP characteristics of some *fluorescent Pseudomonads* of Iranian soils. *Iranian J. Soil and Water Science*, 21(2): 277-289. (In Farsi)

Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Aus. J. Agric. Res. 9 : 778-781.

Tenuta, M. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria: prospects for increasing nutrient acquisition and disease controle. Internet search (http://www.ms.umanitoba.ca).

Tilak, K. V. B. R., and Reddy, B. S. (2006). *Bacillus cereus* and *B. circulans*- novel inoculants for crops. *Current science*, 90(5): 642-644.

Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N.,Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Nautiyal, C. S., Mittal, S., Tripathi, A. K., and. Johri, B. N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current science*, 89(1): 136-150.

Timmusk, S., and. Wagner, E. G. H. (1999). The PGPR *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gen expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. *The Am. Phytopathol. Soc*., MPMI, 12(11): 951-959.

Vessay, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*,255(2): 571-586

Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., and Vivanco, J. M. (2003) .Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol*., 132: 44-51.

مجله تحقیقات آب و خاک ایران (۴۰) ۲، ۱۳۸۸ (۱۹۰-۱۷۷)

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.