ارزیابی تأثیر باکتری‌های ریزوسفری و غیر ریزوسفری حل‌کننده فسفات بر بهبود شاخص‌های رشد گیاه گندم تحت تنش شوری و خشکی

حسینعلی علیخانی[1]، حسن اعتصامی و لیلا محمدی

استاد گروه علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران؛ **Halikhan@ut.ac.ir**

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران؛ **Hassanetesami@ut.ac.ir**

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران؛ **Lemohammadi@ut.ac.ir**

دریافت: **96/8/7** و پذیرش: **96/12/22**

چکیده

یکی از راهکارهای کاهش کودهای شیمیایی فسفره در دیم زارها، استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات است. در این پژوهش، جدایه‌های باکتری ریزوسفری و غیر ریزوسفری از دیم‌زارهای گندم قزوین و زنجان جداسازی و از نظر ویژگی‌های محرک رشد گیاهی و مقاومت به شوری و خشکی غربالگری شدند. در مجموع 184 جدایه ریزوسفری و غیر ریزوسفری از این دیم‌زارها جداسازی شد. با توجه به نتایج غربال‌گری، دو سویه ریزوسفری *Pseudomonas* sp. W7 و *P. baetica* W153 و دو سویه غیر ریزوسفری *Bacillus pumilus* W72 و *B. safensis* W73 به عنوان سویه‌های برتر انتخاب و تأثیر آنها بر شاخص‌های رشد گندم و مقدار فسفر گیاه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در آرایش فاکتوریل با سه تکرار تحت تنش خشکی (فشار اسمزی منفی پنج بار) و شوری (نیم درصد NaCl) در شرایط درون شیشه‌ای بررسی شد. در این تحقیق، سویه‌های W7، W153، W72، W73 و B0 به عنوان فاکتور اول و ارقام گندم روشن (رقم فسفر کارا) و مرودشت (رقم فسفر ناکارا) به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. برترین سویه‌ها از حیث شاخص HD/CD (قطر هاله به قطر کلونی) در ارزیابی کیفی توان حل‌کنندگی فسفات آلی و معدنی باکتری‌های ریزوسفری بودند. هر دو گروه باکتری (ریزوسفری و غیر ریزوسفری) تقریبا توانایی تحمل یکسانی به شوری و خشکی نشان دادند. شاخص‌های رشد گیاه هر دو رقم گندم تحت تنش شوری و خشکی کاهش یافتند. بر اساس نتایج حاصله، تلقیح دو رقم گندم با باکتری‌های حل‌کننده فسفات منتخب ضمن افزایش مقدار فسفر محلول در محیط رشد توانستند به‌طوری معنی‌داری شاخص‌های رشد گیاه (30 تا 53 درصد) و مقدار جذب فسفر گیاه (14 تا 32 درصد) را نسبت به تیمار بدون باکتری افزایش دهند. نتایج همچنین نشان دادند که باکتری‌های غیرریزوسفری (با وجود داشتن توانایی حل‌کنندگی فسفات کمتر) نسبت به باکتری‌های ریزوسفری از کارایی بیشتری در انحلال فسفات نامحلول (خاک فسفات) در محیط رشد گیاه برخوردار بودند. به طور کلی این نتایج نشان داد که استفاده از باکتری‌های مقاوم به شوری و خشکی برتر حل‌کننده فسفات می‌تواند برخی از محدودیت‌های تولید گندم در دیم‌زارها را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: ارقام گندم فسفرکارا و فسفرناکارا؛ دیم‌زارها ؛کود زیستی؛ باکتری‌های مقاوم به شوری و خشکی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم خاک

مقدمه

امنیت غذایی یکی از نیازهای اساسی جامعه بشری بوده که نمی‌تواند توسط هیچ جامعه‌ای نادیده گرفته شود. باتوجه به رشد روز افزون جمعیت و کاهش باروری سطح خاک‌های مناسب کشاورزی، نسبت سطح خاک کشاورزی مطلوب به جمعیت، به شدت درحال کاهش بوده و یکی از نیازهای عمده، افزایش عملکرد در واحد سطح به‌ویژه در شرایط تنش کم‌آبی و در خاک‌های شور می‌باشد. گندم، مهم‌ترین گیاه زراعی بوده و در تأمین غذای بخش عمده‌ای از مردم جهان نقش اساسی دارد. بیش از 53 درصد کالری دریافتی انسان‌ها از مصرف نان و دیگر فرآورده‌های گندم تأمین می‌شود. سطح زیر کشت گندم کشور حدود هفت میلیون هکتار برآورد شده که بیش از 56 درصد زمین‌های زیر کشت گندم در ایران به صورت دیم بوده و با توجه به بارندگی‌کم و غیریکنواخت در بیشتر مناطق، تنش کم‌آبی جزءلاینفک این مناطق است (مومنی، 1389).

در کشت‌های آبی، محدود بودن منابع آبی و بویژه بهره‌وری پایین آن، آب در حد بهینه در اختیار گیاه قرار نمی‌گیرد. لذا در بیشتر موارد، گیاه با تنش کم‌آبی روبرو است (مومنی، 1389). با توجه به افزایش روز افزون تقاضا برای غذا، کافی نبودن اراضی غیرشور و دچار تنش کم‌آبی، به ناچار باید از پتانسیل خاک‌های مبتلا به تنش کم‌آبی و شور برای تولید بیشتر به‌ویژه در مورد محصولات استراتژیک مانند گندم استفاده کرد. در سال های اخیر توجه مسئولین کشور نیز به این مسئله جلب شده و افزایش عملکرد در این خاک‌ها جزء برنامه‌های کلان کشور قرار گرفته است. بخش عمده ای از کشور ایران (61 درصد از مساحت 1650000 کیلومترمربع کشور) جزء مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌باشد و وجود مشکل تغذیه فسفر در گیاه و نیز تنش‌های محیطی شدید به‌ویژه تنش کم‌آبی و شوری خاک از جمله چالش‌های مهم در تولید بخش کشاورزی محسوب می‌گردند (مومنی، 1389). گزارش شده است که برخی از عوامل غیرزیستی مانند تنش‌های کم‌آبی و شوری و کاهش کارایی عناصر غذایی ضروری خصوصا فسفر، بر رشد و عملکرد گیاهان زراعی از جمله گندم در دیم‌زارها اثر می‌گذارند (کاوامورا و همکاران، 2013). بوداک و همکاران (2013) نشان دادند که اعمال تنش کم‌آبی و شوری به عنوان یک تنش خارجی موجب کاهش شاخص‌های رشد و عملکرد گندم گردید. با توجه به آهکی‌بودن اکثر خاک‌های ایران، pH بالا و شرایط خشکسالی اخیر، مقدار فسفر قابل دسترس گیاه در اکثر مناطق کشاورزی ایران، از جمله دیم‌زارها، بسیار کم است. به منظور افزایش قابلیت دسترسی فسفر برای گیاهان، مقادیر زیادی از کود شیمیایی فسفره به طور منظم مورد نیاز است. اما استفاده بی‌رویه از کود شیمیایی فسفره باعث مشکل زیست محیطی فراوانی می‌گردد (آدیسمو و کلوپر، 2009). علاوه بر این، استفاده از کودهای شیمیایی فسفره در دیم‌زارها معمول نیست و در صورت استفاده، باعث افزایش شوری خاک می شود. از این رو، به علت افزایش قیمت کودهای فسفاته و راندمان پایین آنها (10-30 درصد)، استفاده از منابع کودی جایگزین ارزان قیمت بومی مثل خاک فسفات در کشورهای در حال توسعه مانند ایران در حال افزایش است. اما مشکل اصلی استفاده از این منابع کودی در خاک‌ها مخصوصا خاک‌های آهکی ایران کارایی پایین آنها می‌باشد (نعیم و همکاران، 2013). مشخص شده است که برخی از این مشکل‌ها را می‌توان با استفاده از باکتری های حل‌کننده فسفات تا حدی کاهش داد (آدیسمو و کلوپر، 2009). گزارشاتی وجود دارد که نشان می‌دهد فعالیت‌های باکتری‌های محرک رشد گیاه از جمله توان حل‌کنندگی فسفات آنها تحت تأثیر شرایط محیطی مثل تنش‌های شوری و خشکی می‌باشد (شارما و همکاران، 2013).

بنابراین باکتری‌هایی قادرند فراهمی فسفر را برای گیاهان تحت شرایط تنش‌های محیطی افزایش دهند که خودشان مقاوم به این تنش‌ها باشند. گزارش شده است که یکی از راه‌های دستیابی به تولید بیشتر محصولات استراتژیک مانند گندم، استفاده از پتانسیل باکتری‌های مقاوم به تنش‌های محیطی و حل‌کننده فسفات های نامحلول می‌باشد. این باکتری‌ها می‌تواند تحمل گیاهان را به شرایط تنش کم‌آبی و شوری و کارایی مصرف کودهای فسفره را افزایش دهند (خان و همکاران، 2014). در مطالعات گذشته، اثر باکترهایی مثل *سودوموناس*، *باسیلوس* و *آرتروباکتر* در افزایش رشد گیاه گندم تحت شرایط تنش شوری و خشکی بررسی شده است (تیواری و همکاران، 2011 ؛ یانگ و همکاران، 2010). اطلاعاتی زیادی در مورد اثر باکتری‌های حل‌کننده فسفات و مقاوم به شوری و خشکی بر افزایش فراهمی فسفر و افزایش رشد گیاه گندم (کشت شده در دیم‌زارها) تحت تنش شوری و خشکی وجود ندارد. با توجه به موارد ذکر شده، هدف از این پژوهش، ارزیابی درون شیشه‌ای اثر باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری مقاوم به شوری و خشکی برتر حل‌کننده فسفات نامحلول بر افزایش شاخص‌های رشد گیاه گندم و مقدار فسفر گیاه

در حضور خاک فسفات (به عنوان منبع فسفر) تحت تنش شوری و خشکی حاکم بر دیم زارهای گندم بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های ریزوسفری و غیر ریزوسفری

در ابتدا بر اساس مطالعات کتابخانه‌ای و میدانی مشخص شد که بخش قابل‌توجهی از دیم‌زارهای گندم عمدتاً در غرب استان قزوین و شرق استان زنجان متمرکز هستند. لذا با استفاده از دستگاه موقعیت‌یاب جغرافیایی (GPS)[1] و مبتنی بر مکان‌یابی دقیق محل‌های نمونه‌برداری، اقدام به تهیه نمونه‌های (55 نمونه) خاک ریزوسفری (خاک چسبیده به ریشه و متأثر از ترشحات ریشه) و خاک غیرریزوسفری از مزارع دیم‌زار گندم شد. گیاهان سالم در مرحله گلدهی بطور تصادفی از موقعیت‌های مختلف در مزارع جمع‌آوری و در جعبه‌های مخصوص حاوی یخ فورا به آزمایشگاه انتقال یافتند تا جهت جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری از آنها استفاده شود. نمونه‌ها تا قبل از فرایند جدا سازی در دمای 4C° نگهداری شدند و در کوتاه‌ترین زمان بعد از نمونه‌برداری مراحل جداسازی انجام گرفت. به منظور جداسازی باکتری ریزوسفری 10 گرم ریشه حاوی خاک ریزوسفری به ارلن مایر 250 میلی‌لیتری حاوی 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل منتقل و به مدت30 دقیقه بر روی شیکر با 120 دور در دقیقه در دمای 28 درجه سانتی‌گراد تکان داده شد. سپس سری‌های رقت (از 10^{-2} تا 10^{-7}) تهیه و یک‌دهم میلی‌لیتر از آن بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت آگار مغذی[2] پخش گردید. تمام پلیت‌ها به صورت وارونه در دمای 28 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت گرماگذاری و سپس توسط دستگاه شمارش کلنی، تعداد کلنی‌های باکتری در ظرف پتری مربوط به رقتی از خاک که تعداد کلنی‌های آن بیش از 30 و کمتر از 300 عدد بود شمارش و بر این اساس تعداد باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری جداسازی شده بصورت CFU[3] بر گرم خاک گزارش شدند. مراحل خالص‌سازی این جدایه‌ها پس از کشت مجدد روی همان محیط از طریق بازکشت[4] انجام گرفت. جدایه‌های باکتری مشابه بر اساس خصوصیات فنوتیپی (شکل، تحرک، رنگ، سرعت رشد، مورفولوژی کلنی) و رنگ‌آمیزی گرام گروه‌بندی شدند و در یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس برای مطالعه بیشتر ذخیره شدند. مراحل جداسازی باکتری‌ها از خاک غیرریزوسفری مشابه به روش جداسازی باکتری‌ها از خاک ریزوسفری انجام گرفت. همچنین نمونه‌هایی از خاک بعد از عبور دادن از الک دو میلی‌متری، برای اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی براساس روش های متداول (علی احیایی و بهبهانی زاده، 1372) مورد تجزیه قرارگرفت.

تعیین ویژگی‌های محرک رشد گیاه و تحمل به خشکی و شوری جدایه‌ها

ارزیابی توان تولید ایندول استیک اسید[5] (IAA)، فعالیت آنزیم ACC[6]-دآمیناز و سیدروفور جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری به ترتیب بر طبق پتن و گلیک (2002)، پنروز و گلیک (2003)، و شئون ونیلنز (1987) انجام گرفت. مقدار تولید IAA توسط هر یک از جدایه‌ها (جمعیت یکسان شده 5×10^{9} CFU ml^{-1}) با استفاده از محیط DF[7] اندازه گیری شد. برای این منظور 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 30 میلی‌لیتر محیط DF حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر ال- تریپتوفان[8] منتقل گردید. بعد از 72 ساعت رشد در انکوباتور در دمای 28 درجه سانتی گراد، سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ (در g 10000 و به مدت 15 دقیقه) و دو میلی‌لیتر از محلول صاف رویی با چهار میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی[9] مخلوط گردید، این مخلوط به مدت 20 دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV3100) میزان جذب نور در طول موج 535 نانومتر قرائت گردید. مقدار تولید IAA ($\mu g\ ml^{-1}$) توسط هر جدایه از مقایسه‌ی جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد تهیه شده در غلظت‌های صفر تا 100 میلی‌گرم در لیتر از IAA محاسبه گردید. به منظور توانایی جدایه‌ها در مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن، 50 میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌ها (جمعیت یکسان شده CFU ml^{-} 5×10^{91}) با روش قطره‌گذاری در پتری‌های حاوی محیط های DF + سه میلی‌مولار ACC ، محیط DF + یک‌دهم مولار سولفات آمونیوم (شاهد مثبت) و محیط DF بدون ACC و سولفات آمونیوم (شاهد منفی) کشت داده شدند. محیط‌های تلقیح شده به مدت 48 ساعت در دمای 28 درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور خوابانده شدند. جدایه

1. The Global Positioning System (GPS)
2. Nutrient Agar (NA)
3. Colony-Forming Unit (CFU)
4. Sub-culturing
5. Indol-3- Acetic Acid (IAA)
6. 1-AminoCyclopropane-1-Carboxylate (ACC)
7. Dworkin and Foster (DF) salt minimal medium
8. L-tryptophan
9. Salkowski Reagent

هایی که قادر به رشد در محیط ACC بودند از نظر توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز مثبت ارزیابی شدند. به منظور تعیین سیدروفور باکتری‌ها از محیط CAS[1] – آگار استفاده شد. در این روش ابتدا سوسپانسیون جدایه‌ها (جمعیت یکسان شده 5×10^{9} CFU ml^{-1}) بطور جداگانه تهیه، سپس باکتری‌ها با روش قطره‌گذاری در پتری‌های حاوی 30 میلی‌لیتر محیط CAS-آگار کشت داده شدند. به این صورت که پلیت‌های حاوی محیط کشت CAS-آگار پس از جامدشدن به چهار قسمت مساوی تقسیم و از سوسپانسیون تازه هر جدایه به مقدار 15 میکرولیتر در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری تلقیح شد. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ محیط CAS-آگار از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلونی باکتری‌ها ارزیابی گردید. به منظور تعیین توان کیفی جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی نامحول، از محیط کشت اسپربر (اسپربر، 1958) استفاده گردید. ظهور هاله شفاف در پیرامون کلونی باکتری به عنوان نشانه حل فسفات در نظر گرفته شد. قطر کلونی رشد یافته (CD) و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات (HD) که در اطراف هر کلنی تشکیل شده بود به دقت اندازه‌گیری شدند.

برای ارزیابی انحلال فسفات نسبت متوسط قطر هاله به قطر کلونی (HD/CD) بعد از پنج روز محاسبه گردید. توان حل‌کنندگی فسفات‌های آلی نیز توسط جدایه هایی برتر (HD/CD، بیش از 1/5) بر روی محیط کشت ISP (محیط کشت اصلاح شده اسپربر) انجام گرفت که در آن به جای ترکیب شیمیایی تری‌کلسیم‌فسفات از یک منبع آلی به نام اینوزیتول‌هگزافسفات استفاده شد. برای بررسی دقیق‌تر تعیین توان انحلال فسفات‌های نامحلول (منبع تری‌کلسیم‌فسفات و خاک فسفات)، جدایه برتر منتخب با استفاده از محیط اسپربر حاوی منبع تری کلسیم فسفات مورد سنجش کمی قرارگرفتند. پنج روز بعد از تلقیح باکتری‌ها، مقدار فسفر آزاد (حل) شده (میلی‌گرم بر لیتر) توسط هر جدایه براساس میزان جذب نور (با استفاده اسپکتروفتومتر در470 نانومتر) مربوط به آن با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از KH_2PO_4 محاسبه گردید. علاوه بر فسفر، pH محیط کشت‌های حاوی این دو منبع فسفر نیز قرائت گردید. به منظور ارزیابی میزان تحمل سویه‌ها به سطوح مختلف تنش خشکی (علی و همکاران، 2014)، از توان رشد آن‌ها در محیط کشت NB[2] حاوی غلظت‌های مختلف پلی‌اتیلن‌گلیکول6000 استفاده شد (غلظت‌های صفر، 202/2، 367/7 و 481/9 گرم پلی‌اتیلن‌گلیکول 6000 به ازاء هر لیتر محیط کشت NB که معادل پتانسیل‌های آبی صفر، 5-، 15- و 25- بار می باشد). میزان رشد جدایه‌ها پس از 48 ساعت با اندازه گیری OD محیط رشد آن‌ها در طول موج 600 نانومتر، توسط دستگاه Absorbance Microplate Readers مدل Bio-Tek Elx800 USA تعیین و درصد کاهش رشد هر جدایه در سطوح مختلف پلی‌اتیلن‌گلیکول در مقایسه با میزان رشد همان سویه در محیط NB بدون PEG6000 محاسبه گردید (علی و همکاران، 2014). علاوه‌براین، تحمل سویه‌ها به سطوح مختلف شوری (یک تا هشت درصد از املاح NaCl) با مشاهده و مقایسه آنها با کیفیت کلنی‌های رشد یافته در پلیت‌های شاهد (NA بدون نمک) پس از 48 ساعت ارزیابی گردید (اورهان و گولشت، 2015).

شناسایی جدایه‌های منتخب باکتری ریزوسفری و غیر ریزوسفری

به منظور شناسایی جدایه‌های برتر، جدایه‌های مورد نظر در محیط کشت NB در دمای 28 درجه سانتی گراد کشت داده‌شدند و DNA ژنومی با استفاده از کیت جداسازی (Promega, Madison, WI, USA) از این جدایه‌ها استخراج گردیده شد. تکثیر ژن 16S rRNA بر طبق شرایط توصیف شده توسط ادواردز و همکاران (1989) انجام‌گرفت. ژن 16S rRNA با استفاده از پرایمرهای باکتریایی عمومی (5'-27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و (5'-1429R TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') تکثیرشد. توالی ژن‌های 16S rRNA بعد از خالص‌سازی محصولات PCR با کیت خالص‌سازی (Promega, Madison, WI, USA) توسط دستگاه سنجش توالی DNA با پرایمر 27F در شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین شدند. تمام اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA توسط نرم افزارهای Edit sequence (version 5.1) ویرایش گردید. توالی نوکلئوتیدهای محصولات PCR با توالی نوکلئوتیدهای موجود در GenBank مقایسه گردید. توالی‌هایی نوکلئوتیدهای موجود در GenBank که شباهت نزدیکی با توالی نوکلئوتیدهای جدایه های مورد مطالعه داشتند، گزارش شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه به پایگاه داده‌های GenBank ارسال شد و با شماره دسترسی های مختلف ثبت گردید.

---

1. Chrome Azurol S (CAS)
2. Nutrient broth (NB)

ارزیابی درون شیشه‌ای اثر سویه‌های منتخب بر روی پاسخ های رشد و مقدار فسفر گیاه گندم

این آزمایش با هدف ارزیابی اثر باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری برتر حل‌کننده فسفات بر روی شاخص رشد ارقام گندم و تامین فسفر گیاه از یک منبع فسفر نامحلول (خاک فسفات) تحت تنش شوری (0/5 درصد کلرید سدیم) و خشکی (فشار اسمزی 5- بار ایجاد شده توسط PEG6000) انجام‌گرفت. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در 3 تکرار درون لوله‌های آزمایش (200 mm × 20) (اعتصامی و علیخانی، 2016) انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل سویه‌های باکتری در پنج سطح (B0 یا شاهد منفی، W7، W153، W72 و W73) و ارقام گندم در دو سطح (رقم گندم روشن-فسفرکارا و رقم گندم مرودشت-فسفرناکارا) بودند. در این آزمایش یک شاهد مثبت (بدون تنش خشکی و شوری و باکتری و حاوی فسفر محلول) به منظور مقایسه کردن تیمارها با آن نیز در نظر گرفته شد. برای تأمین منبع فسفر در لوله‌های آزمایش کشت شده از خاک فسفات آسفوردی (15 گرم در لیتر) و در لوله‌های آزمایش شاهد مثبت از محلول غذایی حاوی فسفر محلول (10 میلی‌لیتر در لیتر، از نمک مونوکلسیم‌فسفات نیم مولار) استفاده شد.

ارقام گندم مورد مطالعه در این تحقیق شامل ارقام روشن به عنوان رقم فسفرکارا و مرودشت به عنوان رقم فسفرناکارا بودند. بذور سالم و یکنواخت ارقام گندم پس از ضدعفونی سطحی و جوانه‌دار شدن برای انتقال به درون لوله‌های اپندورف داخل لوله‌های آزمایش حاوی 60 میلی لیتر محلول غذایی هوگلند با منابع مختلف فسفر (نامحلول و محلول) با پنس استریل در زیر لامینار منتقل شدند. پس از آن، گیاهک‌ها با 100 میکرولیتر از سوسپانسیون هر سویه (5×10^8 CFU ml^{-1}) بر طبق طرح آزمایش تلقیح شدند. شاهد منفی با 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری استریل شده تلقیح گردید. سپس لوله های آزمایش حاوی تیمارهای مختلف در اتاقک رشد با شدت روشنایی 15 هزار لوکس (12 ساعت در روشنایی و 12 ساعت در تاریکی) به مدت 45 روز در دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در پایان این دوره، اثر تیمارهای مختلف بر شاخص‌های مهم گیاهی شامل وزن خشک ریشه و وزن خشک اندام‌های هوایی همچنین غلظت فسفر حل شده درمحلول غذایی و میزان فسفر جذب شده توسط گیاه اندازه‌گیری و ثبت شد. ریشه و اندام‌هوایی گیاه در آون به مدت 24 ساعت در دمای 65 درجه سانتی گراد، خشک گردیده شدند. نمونه‌های گیاهی خشک شده به صورت مجزا توسط آسیاب پودر شده و در ظروف پلاستیکی درب‌دار به منظور تهیه عصاره گیاهی و انجام آزمایش‌های تجزیه‌ای، نگهداری شدند. به منظور اندازه‌گیری فسفر در محلول‌رشدی از روش آبی (اولسن) و فسفر بافت‌های گیاهی از روش‌زرد (مولیبدو وانادات) استفاده شد (امامی، 1375).

آنالیز آماری نتایج

تجزیه واریانس (ANOVA) و محاسبات آماری با استفاده از برنامه‌های کامپیوتری MSTAT و SAS (Institute, Cary, NC, USA) و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزارهای GeraphPad prism 6 انجام گردید. مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه دانکن در سطح پنج انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

نتایج آنالیز نمونه‌های خاک نشان داد که خاک‌ها عمدتاً دارای بافت لوم، قابلیت هدایت الکتریکی 3/1 تا 5/67 دسی زیمنس بر متر، pH 7/63 تا 8/3، فسفر قابل جذب 3/2 تا 9/9 میلی‌گرم بر کیلوگرم، پتاسیم قابل جذب 150 تا 251 میلی‌گرم بر کیلوگرم، کربنات کلسیم معادل 10/5 تا 28/2 درصد، سدیم 18/7 تا 34/4 میلی‌گرم بر کیلوگرم و ماده آلی 0/53 تا 1/42 درصد بودند. در مجموع 184 جدایه باکتریایی ریزوسفری و غیر ریزوسفری از دیم‌زارهای گندم از دو استان جداسازی شد. براساس نتایج ارزیابی تعیین ویژگی‌های محرک رشد گیاه و تحمل جدایه‌ها به شوری و خشکی (نتایج نشان داده نشده است)، در این تحقیق دو جدایه باکتری ریزوسفری و دو جدایه باکتری غیرریزوسفری به عنوان جدایه‌های برتر انتخاب و شناسایی شدند. شناسایی ژن 16S rRNA این جدایه‌ها نشان داد که توالی‌های ژن 16S rRNA دو جدایه ریزوسفری و دو جدایه غیرریزوسفری مشابهت نزدیکی با سویه‌های (MF689054) *Pseudomonas* sp. W7، *baetica* W153 (MF689057) و *Bacillus pumilus* W72 (MF689055)، *P. safensis* W73 (MF689056) به‌ترتیب داشتند.

ویژگی‌های محرک رشد گیاه سویه‌های باکتری برتر

نتایج ارزیابی توانایی باکتری‌ها از نظر داشتن ویژگی محرک رشد گیاه در جدول 1 نشان داده شده است. همه سویه‌های مورد ارزیابی در این تحقیق توانایی تولید ویژگی محرک رشد گیاه را داشتند، اگرچه میزان توانایی آنها با هم متفاوت بود. برترین سویه‌ها از حیث شاخص HD/CD (قطر هاله به قطر کلونی) در ارزیابی کیفی توان حل‌کنندگی فسفات آلی و معدنی باکتری های ریزوسفری بودند. سویه W72 و W73 به ترتیب در رتبه

های بعدی قرار داشتند (جدول 1). این روند در ارزیابی کمی حل فسفات نیز مشاهده شد. سویه W153 برترین بود. ریزجانداران موجود در خاک و ریشه گیاهان، با تولید آنزیم‌های فسفاتاز[1] (اسیدی و قلیایی) فسفر آلی را معدنی می‌کنند. گزارش شده است مکانیسم اصلی برای معدنی کردن فسفر آلی تولید فسفاتازهای اسیدی می‌باشد (خان و همکاران، 2009). کارایی متفاوت فسفاتازهای میکروبی نیز در انحلال ترکیبات آلی فسفری در فراریشه و جذب فسفر به وسیله گیاهان گزارش شده است (رودریگرز و همکاران، 2006). از بین ریزوباکتری‌های حل کننده فیتات، معمول‌ترین آنها گونه‌هایی از جنس‌های *باسیلوس*، *بورخولدریا*، *انتروباکتر*، *سودوموناس*، *ریزوبیوم*، *سراشیا* و *استافیلوکوکوس* هستند (شیدووا و همکاران، 2008).

نتایج مربوط به توان کمی انحلال فسفات نامحلول کاملا مشابه اندازه گیری کیفی و بر روی محیط کشت جامد اسپربر نبود. البته گزارشات زیادی وجود دارد که این عدم یکسانی نتایج کیفی و کمی را نشان داده است (دونات-کورا و همکاران، 2005). با وجود این، این سویه ها از روند کلی و مشابهی برخوردار بودند و توانایی بالایی در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی داشتند (جدول 1). توان‌کمی انحلال فسفات نامحلول معدنی در محیط کشت اسپربر حاوی تری‌کلسیم فسفات حدود دو برابر بیش از خاک فسفات بود. بطوری که در جدول 1 دیده می شود در هر دو منبع فسفات (تری‌کلسیم فسفات و خاک فسفات) رابطه معکوسی بین مقدار فسفر آزاد شده و pH وجود دارد. این یافته نشان می‌دهد که کاهش pH می‌تواند مکانیسم این جدایه‌ها در حل فسفات‌های نامحلول معدنی از هر دو منبع فسفات باشد. در بعضی موارد بین توانایی کاهش pH با توانایی انحلال فسفر معدنی، همبستگی وجود ندارد (چن، 2006). علاوه براین، این سویه‌های توانمند در حل فسفات معدنی از منبع تری کلسیم فسفات همان سویه‌های توانمند در حل فسفات معدنی از منبع خاک فسفات بودند. مواد ترشح شده به وسیله باکتری‌های حل‌کننده فسفات مانند اگزالات، لاکتات، سیترات، سوکسینات، آنیون‌های کربوکسیلیک و پروتون‌ها که منجر به کاهش پ- هاش محیط می‌شوند در افزایش حلالیت ترکیبات فسفات‌کلسیم نقش دارند (دوبل و مرباچ، 2005؛ شهاب و احمد، 2008). در پژوهش دیگر نیز تمامی جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* موجب انحلال تری‌کلسیم‌فسفات در محیط مایع و جامد و کاهش pH شدند (آذرمی و همکاران، 1393). همچنین پییرا و کسترو (2014) گزارش کردند با افزایش جمعیت باکتری های حل‌کننده فسفات، مقدار pH 4- 3/2 واحد کاهش نشان داد. کاهش pH احتمالا به دلیل تولید اسیدهای آلی در طول دوره رشد باکتری‌ها می‌باشد که این اسیدها از طریق گروه‌های هیدروکسیلی و کربوکسیلی با کلاته‌کردن کاتیون‌های پیوند شده با فسفات و همچنین اسیدی‌کردن خاک (کاهش pH)، منجر به انحلال مقدار قابل‌توجهی فسفر می‌شوند (پارادهان و سوکا، 2006).

نتایج حاصل از این ارزیابی نشان داد که همه سویه‌ها از نظر تولید IAA مثبت بودند. علاوه براین، این باکتری‌ها از نظر مقدار تولید این هورمون با یکدیگر تفاوت داشتند. این سویه‌ها توان تولید هورمون IAA در محدوده 20 تا 60 میلی‌گرم بر لیتر داشتند. بیشترین مقدار تولید این هورمون در سویه ریزوسفری W7 مشاهده شد (جدول 1). توانایی تولید IAA در شمار متعددی از باکتری‌های آزادزی، همزیست و پاتوژن گزارش‌شده است. گزارش‌شده است که 80 درصد باکتری‌های خاکزی (ریزوسفری و غیرریزوسفری) قادر به تولید IAA هستند و تولید این هورمون در باکتری‌ها تحت تأثیر عوامل متعددی نظیر تنش های محیطی، pH، گرسنگی‌کربن و ترکیبات ترشحات ریشه ای قرارمی‌گیرد (تساوکلاو و همکاران، 2006).

از نظر توان تولید سیدروفور، هر چهار سویه یک هاله نارنجی اطراف کلنی‌ها بر روی محیط CAS نشان دادند. تشکیل این رنگ به علت حذف کمپلکس CAS –آهن (III) در طی تشکیل سیدروفور می‌باشد. این سویه‌ها به علت تولید ACC دآمیناز قادر به استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن نیز بودند. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که باکتری تولید کننده آنزیم ACC دآمیناز عمدتا در مناطقی که تنش محیطی از جمله شوری، خشکی و...وجود دارند، بیشتر یافت می‌شوند (گلیک، 2014). از این رو وجود چنین باکتری‌هایی در منطقه دیم زار دور از انتظار نبود.

مطالعات گذشته نشان می‌دهد که جدایه‌های حل‌کننده فسفات، دارای سایر صفات محرک‌رشدی نیز می‌باشند، براساس یافته‌های علمی، باکتری‌های محرک رشد گیاه احتمالاً با بیش از یک مکانیسم عمل می‌کنند (شرما و همکاران، 2013) و عقیده بر این است که ریزموجودات حل‌کننده فسفات، به طورهم زمان دارای پتانسیل کنترل پاتوژن‌های گیاهی و هم‌چنین افزایش رشد گیاه از طریق تولید سیدروفور، آنزیم‌های هیدرولیتیک و IAA هستند (شرما و همکاران، 2013). گولاتی و همکاران (2010) نیز گزارش نمودند جدایه BIHB 723

[1] Phosphatases

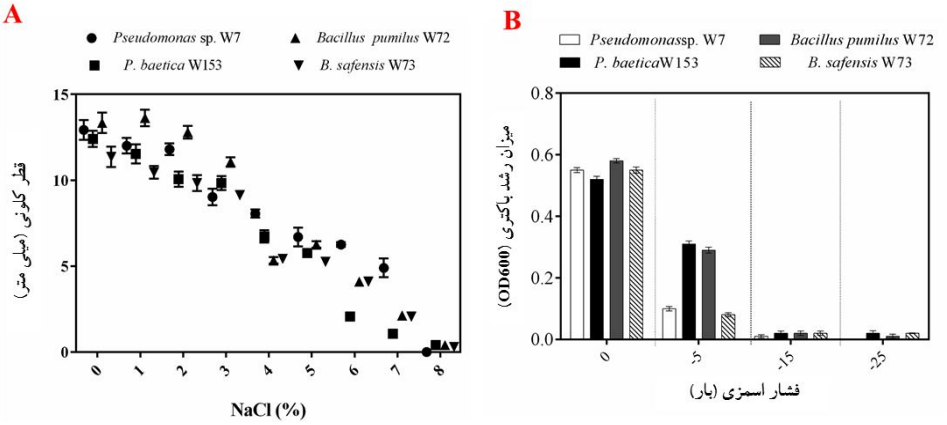
متعلق به *سینتوباکتر* حل کننده فسفات، قادر به تولید سایر متابولیت‌های محرک رشدی نظیر IAA، ACC- دآمیناز، سیدروفور و آمونیاک می‌باشد.

توان تحمل سویه‌ها به شوری و خشکی

نتایج ارزیابی توان تحمل سویه‌ها به خشکی و شوری در شکل 1 نشان داده شده است. نتایج این ارزیابی نشان داد (شکل1A) که فقط در فشار 5- باکتری ها نسبت به شاهد (فشار صفر) رشد قابل‌توجه‌ای داشتند. بطورکلی، جمعیت باکتری‌ها (OD_{600}) در تنش کم‌آبی 15- و 25- بار نسبت به شاهد منفی PEG=0 بشدت کاهش‌یافت و این کاهش با افزایش تنش کم‌آبی رابطه مستقیم داشت. نتایج تحمل به شوری نشان داد (شکل 1A) که تمامی سویه‌ها قادر به تحمل غلظت یک، دو و سه درصد کلریدسدیم در مقایسه با شاهد بودند در حالیکه که در شوری‌های بالاتر کاهش رشد باکتری‌ها در مقایسه با شاهد قابل‌ملاحظه بود. هر دو گروه باکتری (ریزوسفری و غیرریزوسفری) تقریباً توانایی تحمل یکسانی به شوری و خشکی نشان دادند.

جدول 1- ارزیابی ویژگی‌های محرک رشد سویه‌های ریزوسفری (W7 و W153) و غیرریزوسفری (W72 و W73) و ارزیابی توان‌کمی انحلال فسفات نامحلول معدنی با منبع تری‌کلسیم فسفات و خاک فسفات و تغییرات pH در محیط اسپربر در طی رشد هر سویه برتر بعد از پنج روز

ویژگی های محرک رشد گیاه	شاهد	سویه های غیر ریزوسفری		سویه های ریزوسفری	
		***B. safensis* W73**	***Bacillus pumilus* W72**	***P. baetica* W153**	***Pseudomonas* sp. W7**
تولید IAA (میلی‌گرم بر لیتر)	-	43/4 ± 3	39/3 ± 3	28/2 ± 4	53 ± 3
تولید ACC دآمیناز (قطر کلونی، میلی متر)	-	3/5 ± 0/3	4/0 ± 0/4	5/0 ± 0/6	6/0 ± 0/7
تولید سیدروفور (قطر هاله به کلونی)	-	1/2 ± 0/5	1/4 ± 0/8	1/6 ± 0/5	1/8 ± 0/7
حلالیت فسفات نامحلول معدنی (قطر هاله به کلونی)	-	1/86 ± 0/4	2/0 ± 0/6	1/7 ± 0/5	1/63 ± 0/5
حلالیت فسفر آلی (قطر هاله به کلونی)	-	3/0 ± 0/4	3/0 ± 0/6	3/2 ± 0/7	3/4 ± 0/8
فسفر قابل جذب (میلی گرم بر لیتر) در محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات	18 ± 1	300 ± 3	392 ± 4	410 ± 4	361 ± 1
فسفر قابل جذب (میلی گرم بر لیتر) در محیط کشت حاوی خاک فسفات	10 ± 1	131 ± 6	165 ± 5	185 ± 4	151 ± 2
pH در محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات	6/5 ± 0/2	5 ± 0/2	4/3 ± 0/2	3/5 ± 0/1	4/9 ± 0/1
pH در محیط کشت حاوی خاک فسفات	6/8 ± 0/1	5/4 ± 0/1	4/9 ± 0/1	4/6 ± 0/1	5/2 ± 0/2

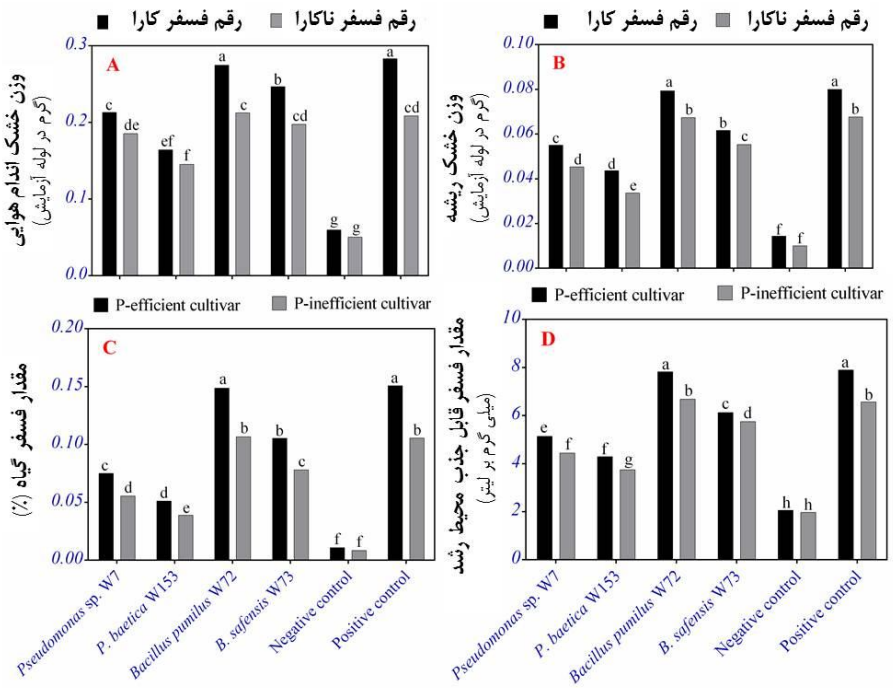


شکل 1- (A) ارزیابی توان تحمل سویه های ریزوسفری (W7 و W153) و غیرریزوسفری (W72 و W73) به شوری و (B) و توان تحمل آن‌ها به خشکی پس از 48 ساعت

مطالعات گذشته نشان داده است که توانایی و کارایی باکتری‌های محرک رشد گیاه در فراهمی عناصر غذایی و افزایش تحمل گیاه به تنش‌های زیست محیطی با شرایط محیطی از جمله آب و هوا، شرایط آب و هوایی، ویژگی‌های خاک (مثل شوری) و تعامل با سایر فلورهای میکروبی بومی در خاک درارتباط می‌باشد (گیانگو و همکاران، 2008). به‌عنوان مثال، کارایی ریزموجودات حل‌کننده فسفات فسفر به شدت تحت تأثیر عوامل محیطی به ویژه عوامل تنشی می‌باشد (سانچز پوررو و همکاران، 2009). آپادایا و همکاران (2009) دریافتند که باکتری‌های حساس به شوری توانایی تولید ویژگی‌های محرک رشد گیاه را در محیط شور از دست می‌دهند. گزارش شده است که ریزوباکترهای جدا شده از محیط‌های شور نسبت به ریزوباکترهای‌های جدا شده از زیستگاه‌های غیر شور کارایی بیشتر در افزایش مقاومت گیاه به شوری دارند (ایگیبریوا، 2009). در این مطالعه، هر چهار سویه جداسازی شده از دیم‌زارها مقاوم به شوری و خشکی بودند که می‌توانند در خاک‌های شور استفاده شوند. باکتری مقاوم به شوری از طریق مکانیسم‌های مختلفی مثل دفع سدیم از سلول‌ها، تولید پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی، تجمع درون‌سلولی ترکیبات محلول سازگار مثل پرولین، تری هالوز، گلیسین بتائین، ساکاروز و گلیسرول، انطباق پروتئین‌ها و آنزیم‌ها با غلظت‌های بالا یون‌های محلول و تجمع پتاسیم می‌توانند غلظت‌های بالای نمک را تحمل کنند (راپل و همکاران، 2013). استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های شور از اهمیت خاصی برخوردار است. بدین منظور باکتری‌های مورد استفاده باید توانایی رشد و فعالیت در شرایط شور را نیز دارا باشند. چن و همکاران (2002) گزارش کردند که بیشترین میزان تحمل شوری باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر چند گیاه زراعی چهار درصد کلریدسدیم بوده است. در تحقیق حاضر، برخی از جدایه‌ها قادر بودند بیشتر از چهار درصد کلریدسدیم را نیز تحمل کردند. گزارش شده است که باکتری‌های حل‌کننده فسفات همچنین از محیط دارای تنش جداسازی شده‌اند به عنوان مثال باکتری نمک دوست *Kushneria sinocarni* جداسازی شده از رسوبات دریاچه نمکی در سواحل شرقی در چین جداسازی شد که در خاک‌های کشاورزی شور مورد استفاده قرار گرفت (ژو و همکاران، 2011).

اثر سویه‌ها بر شاخص‌های رشد گیاه و مقدار فسفر

تجزیه واریانس اثر تیمارهای اصلی (سویه‌های باکتریایی و ارقام گندم) و اثرات متقابل تیمارها (باکتری ها × ارقام گندم) نیز در سطح یک درصد معنی‌دار شده است (جدول تجزیه واریانش نشان داده نشده است). یعنی اینکه حداقل بین دو تیمار از تیمارهای موجود اختلاف معنی‌داری وجود دارد. با توجه به این که اثرات متقابل تیمارها معنی‌دار شده است بنابراین از اثرات اصلی تیمار صرفنظر می‌شود. شکل 2 مقایسه میانگین وزن خشک اندام‌هوایی گیاه، وزن‌خشک ریشه، مقدار فسفر گیاه و مقدار فسفر محلول رشد گیاه در اثرات متقابل تیمارهای مختلف جدایه‌های باکتریایی محرک رشد گیاه و ارقام گندم به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (در سطح پنج درصد) را نشان می‌دهد.



شکل 2- مقایسه میانگین ارزیابی پاسخ های مورفولوژیکی مختلف گندم (رقم روشن-فسفرکارا و رقم مرودشت-فسفر ناکارا) (A و B) و مقدار فسفر گیاه و فسفر محیط رشد گیاه (C و D) در شرایط درون شیشه ای به مدت 45 روز در محلول هوگلند با نیم درصد نمک کلرید سدیم و پتانسیل آبی 5- بار بعد از تلقیح با دو سویه های ریزوسفری (W7 و W153) و دو سویه غیرریزوسفری (W72 و W73) حل‌کننده فسفات و مقاوم به شوری و خشکی . حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد آزمون دانکن است.

در همه صفات اندازه‌گیری شده، تیمار رقم گندم فسفر-کارا با اختلاف معنی‌دار در تیمارهای مختلف باکتری بیش از تیمار رقم گندم فسفر-ناکارا بود. بر طبق شکل 2، تیمار باکتری W72 (*B. pumilus*) در تمام شاخص‌های رشد، محتوای فسفر محلول و میزان جذب فسفر گیاه بدون اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد مثبت در مرتبه نخست به‌عنوان تیمار برتر اثبات شد و سپس تیمار های باکتری W73 (*B. safensis*)، W7 (*Pseudomonas* sp.)، W153 (*P. baetica*) و B0 در مرتبه‌های دوم تا پنجم قرارگرفتند. تیمار رقم فسفر-کارا نسبت به تیمار فسفر-ناکارا با اختلاف معنی‌دار برتری از خود نشان داد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که باکتری W153 اگرچه رتبه اول در آزمون کمی و رتبه دوم در آزمون کیفی توان انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی و آلی را داشت (جدول 1) ولی از نظر عملکرد و رشد گیاه اثر افزایشی کمتری نسبت به سه جدایه دیگر داشت (شکل 2). این موضوع می‌تواند نشان دهد که توانایی انحلال فسفات در شرایط تلقیح آزمایشگاهی و توانایی افزایش رشد گیاه در شرایط گلخانه‌ای یا مزرعه‌ای الزاماً باهم همراه نیستند (باشان و همکاران، 2013). نکته قابل‌توجه و ذکر در این آزمون این بود که تمام تیمارهای آزمایشی در بین کلیه شاخص‌های اندازه‌گیری شده دارای یک روند همسان بود که نشان از صحت بالای انجام مراحل آزمون کشت درون شیشه‌ای گندم دارد. باکتری‌های *سودوموناس* پتانسیل قابل توجهی در بهبود کارآیی جذب فسفر از خود نشان داده‌اند و به علت وسعت انتشار، توان‌کلونیزاسیون بالای ریشه اکثر گیاهان، تنوع‌گونه‌ای، مقاوم بودن به تنش‌های محیطی از جمله شوری و کم‌آبی، توانایی بالای آنها در رقابت‌با سایر ریزسازواره‌های برای عناصر غذایی و سازگاری سریع با شرایط محیطی مختلف توانسته‌اند به عنوان کود زیستی مناسب از جایگاه و اهمیت ویژه‌ای برخوردار گردند (ویاس و گولاتی، 2009). باکتری‌های *باسیلوس* هم به علت تشکیل اندوسپور دارای خصوصیاتی هستند که آنها را برای توسعه به عنوان کودهای زیستی، مناسب می‌سازد از جمله این خصوصیات می‌توان به مقاومت بالای آنها به تنش‌ها اشاره کرد. ذبیحی و همکاران (1388) در بررسی خود نشان دادند که تلقیح بذور با سویه‌های باکتری *سودوموناس* باعث افزایش معنی‌داری در عملکرد و اجزاء عملکرد گندم شده است. تحقیقات زیادی در زمینه باکتری‌های حل‌کننده فسفات انجام شده است.

بسیاری از این مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از این باکتری‌ها می‌تواند سبب افزایش عملکرد و رشد محصولات مختلف گردند (دوبل و مرباچ، 2005؛ شرما و همکاران، 2013). افضل و همکاران (2005) گزارش کردند که تلقیح گندم با مخلوطی از باکتری‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* به شکل تنها و یا ترکیب با مواد آلی موجب افزایش معنی‌دار عملکرد زیستی گندم نسبت به تیمار بدون باکتری شد. پییرا و کسترو (2014) گزارش کردند که تلقیح خاک تیمار شده با تری‌کلسیم‌فسفات به باکتری‌های *Rhodococcus*، *Pseudomonas* و *Arthrobacter* به ترتیب موجب افزایش 63%، 52% و 81% وزن خشک ریشه گیاه ذرت نسبت به تیمار شاهد بدون باکتری شد. نتایج این پژوهش‌ها نشان داده است که مکانیسم‌های زیادی مسئول افزایش رشد و عملکرد در گیاهان می‌باشند. یو و همکاران (2011) افزایش رشد و عملکرد گیاه در اثر کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات را به افزایش جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر نسبت دادند. به هرحال چندین پژوهش نشان دادند که افزایش در رشد و عملکرد گیاه در اثر کاربرد این باکتری‌ها با افزایش جذب فسفر در گیاه همراه نبوده است (پونگوژالی و همکاران، 2008)؛ بنابراین علاوه بر افزایش جذب فسفر و سایر عناصر غذایی، تولید هورمون‌های گیاهی به وسیله ریزجانداران در ریزوسفر گیاه، توان تولید ACC-دآمیناز، کنترل پاتوژن‌های گیاهی و تولید سیدروفور ازجمله مکانیسم‌های افزایش رشد و عملکرد در گیاهان توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد (هن و همکاران، 2006).

علاوه بر حلالیت فسفر در محیط رشدی، جذب فسفر توسط گیاه به رشد ریشه نیز بستگی دارد. سیستم ریشه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است زیرا به گیاه برای جذب آب و عناصر غذایی کمک می‌کند (فاجیرا و موریا، 2011). جذب فسفر توسط گیاه متناسب با تراکم ریشه است، بنابراین افزایش سطح ریشه توانایی گیاه در جذب فسفر از خاک را افزایش می‌دهد (گرانت و همکاران، 2001). اقبال حسین و همکاران (2013) بیان کردند که افزایش جذب فسفر در گیاه می‌تواند به دلیل افزایش رشد ریشه‌ها یا طویل شدن ریشه‌های مویین به وسیله ریزجانداران خاص باشد؛ بنابراین افزایش فراهمی فسفر در محیط رشد تنها مکانیسم افزایش جذب نیست. همان‌طور که نتایج پژوهش حاضر نشان داد کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول معدنی به‌طور معنی‌داری زیست توده ریشه را افزایش داد. این نتایج می‌تواند به توانایی باکتری‌های مورد مطالعه در تولید IAA مربوط شود (جدول 1)، زیرا گزارش شده است که مقادیرکم از IAA موجب طویل شده ریشه‌های اولیه می‌شود درحالی‌که مقادیر زیاد IAA موجب افزایش تشکیل ریشه‌های فرعی می‌شود (ژیو و همکاران، 1996). همچنین حفظ غلظت اتیلن در مقادیر کم می‌تواند رشد ریشه گیاه را افزایش دهد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات با توانایی تولید ACC-دآمیناز می‌توانند از طریق تجزیه اتیلن به آمونیاک و آلفا کتوبوتریک اسید غلظت اتیلن را در مقادیرکم حفظ کنند (پییرا و کسترو، 2014). به نظر می‌رسد وجود تلفیقی از مکانیسم‌های یاد شده در این سویه‌ها بیشترین تأثیر را در افزایش شاخص های رشد گیاه گندم داشته است. مطالعات گذشته نشان می‌دهند که در اثر تیمار گیاهان با باکتری‌های محرک رشد گیاه تحت تنش شوری، پتانسیل نسبی آب افزایش نشان داد.

مکانیسم‌های اختصاصی باکتری‌های محرک رشد گیاه برای افزایش مقاومت به شوری در گیاهان افزایش اسیدآبسزیک، حذف رادیکال‌های آزاد، نگهداری توژسانس‌آبی در گیاهان و تولید مقدار زیاد پرولین می‌باشد. همچنین این باکتری‌ها با افزایش رشد ریشه و جذب عناصر غذایی و کاهش جذب کلر و سدیم سبب افزایش پایداری غشای سلولی، و افزایش کلروفیل، سطح برگ و پتانسیل نسبی آب برگ می‌شوند و در نهایت منجر به افزایش رشد گیاهان تحت تنش می‌شوند (اعتصامی و بیتی، 2017). نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که باکتری‌های مقاوم به شوری و خشکی توانستند احتمالاً از طریق کاهش اثر تنش شوری و خشکی موجب بهبود رشد ارقام گیاه گندم (فسفرکارا و فسفرناکارا) شوند. بوداک و همکاران (2013) نشان دادند که اعمال تنش کم آبی به عنوان یک تنش خارجی موجب کاهش شاخص های رشد و عملکرد گندم گردید. آنها همچنین گزارش نمودند که تیمارهای مختلف باکتری تأثیر متفاوتی بر برخی از شاخص‌های رشد گیاه تحت تنش داشتند. سلیمانی و همکاران (2017) نیز کاهش شاخص‌های رشد و اجزاء عملکرد گندم در شرایط شور در کشت بدون خاک را گزارش نمودند. این محققین یافتند که باکتری‌های محرک رشد گیاه و مقاوم به شوری و خشکی می‌توانند اثر منفی تنش شوری و خشکی را تا حدی خنثی کنند.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این پژوهش حاکی از آن است که باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری جداسازی شده از گندم دیم از توانایی زیادی در انحلال فسفات معدنی و سایر ویژگی‌های محرک رشد گیاه برخوردارند. علاوه براین، این باکتری‌ها مقاوم به شوری و خشکی نیز می‌باشند. نتایج آزمون درون‌شیشه‌ای نیز نشان داد که تلقیح دو رقم گندم فسفرکارا و ناکارا با باکتری‌های حل‌کننده فسفات منتخب ضمن افزایش مقدار فسفر محلول در محیط رشدی توانست به‌طوری معنی‌داری رشد و مقدار جذب فسفر گیاه را نسبت به تیمار بدون باکتری افزایش دهد. باکتری‌های مورد بررسی همچنین توانستند موجب افزایش تحمل گیاه به تنش شوری شوند. در بین چهار باکتری مورد بررسی باکتری غیرریزوسفری W72 در تمام شاخص‌های رشد، مقدار فسفر محلول و مقدار جذب فسفر گیاه بدون تفاوت معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد رتبه اول را داشت و مؤثرترین باکتری بود. همچنین نتایج نشان داد باکتری‌های غیرریزوسفری متعلق به جنس *Bacillus* (W72 و W73) نسبت به باکتری‌های ریزوسفری متعلق به جنس *Pseudomonas* (W7 و W153) از کارایی بیشتری برخوردار بودند. از آنجایی که در شرایط دیم مصرف کودهای شیمیایی موجب افزایش مضاعف شوری خاک می‌گردد و کاربرد کودهای شیمیایی و از جمله کودهای فسفره معمول نمی باشد و یا در حداقل مقدار ممکن انجام می شود، استفاده از چنین باکتری‌هایی می‌تواند برخی از محدودیت‌های تولید گندم در دیم‌زارها را کاهش دهند. با این وجود کاربرد آنها به عنوان کود زیستی در شرایط مزرعه به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

سپاسگزاری

از حمایت‌های دانشگاه تهران و حمایت‌های مالی از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران سپاسگزاری می‌گردد.

فهرست منابع:

1. آذرمی ف, مظفری و, عباس‌زاده دهجی پ, حمیدپور, م. 1393. جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* از ریزوسفر درختان پسته و تعیین برخی خصوصیات محرک رشدی آن‌ها. زیست شناسی خاک, 2(2), 173-186.
2. امامی، ع. 1375 . روش های تجزیه گیاه جلد اول .نشریه شماره 982 ، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، وزارت کشاورزی، تهران.
3. ذبیحی، ح.، ثواقبی فیروزآبادی، غ.، خاوازی، ک. و ع. گنجعلی. 1388. بررسی تأثیر کاربرد سویه‌هایی از *سودوموناس*‌های *فلورسنت* بر عملکرد و اجزای عملکرد گندم در سطوح مختلف شوری خاک. آب و خاک، 23 (1)، 199-208.
4. مومنی، ع . 1389. پراکنش جغرافیائی و سطوح شوری منابع خاک ایران. پژوهش های خاک، شماره 3، ص 15-1.
5. علی احیایی، م.، و ع.ا. بهبهانی زاده.1372. شرح روش های تجزیه شیمیایی خاک (جلد اول) .نشریه 893 ، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، وزارت کشاورزی، تهران.
6. Adesemoye, A.O., Kloepper, J.W., 2009. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 1-12.
7. Ali, S.Z., Sandhya, V., Rao, L.V., 2014. Isolation and characterization of drought-tolerant ACC deaminase and exopolysaccharide-producing fluorescent *Pseudomonas* sp. Annals of Microbiology 64, 493-502.
8. Bashan, Y., Kamnev, A.A., de-Bashan, L.E., 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biology and Fertility of Soils 49, 465-479.
9. Budak, H., Kantar, M., Yucebilgili Kurtoglu, K., 2013. Drought tolerance in modern and wild wheat. The Scientific World Journal 2013.
10. Chen, J.-H., 2006. The combined use of chemical and organic fertilizers and/or biofertilizer for crop growth and soil fertility. Land Development Department Bangkok Thailand, p. 20.

11. Chen, L., Figueredo, A., Villani, H., Michajluk, J., Hungria, M., 2002. Diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from field-grown soybean nodules in Paraguay. Biology and Fertility of Soils 35, 448-457.
12. Deubel, A., Merbach, W., 2005. Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils, Microorganisms in soils: roles in genesis and functions. Springer, pp. 177-191.
13. Donate-Correa, J., León-Barrios, M., Pérez-Galdona, R., 2005. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. Plant and Soil 266, 261-272.
14. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M., Bottger, E.C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research 17, 7843-7853.
15. Egamberdieva, D., 2009. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. Acta Physiologiae Plantarum 31, 861-864.
16. Etesami, H., Alikhani, H.A., 2016. Co-inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria allows reduced application rates of N-fertilizer for rice plant. Rhizosphere 2, 5-12.
17. Etesami, H., Beattie, G.A., 2017. Plant-Microbe Interactions in Adaptation of Agricultural Crops to Abiotic Stress Conditions, Probiotics and Plant Health. Springer, pp. 163-200.
18. Fageria, N.K., Moreira, A., 2011. 4 The Role of Mineral Nutrition on Root Growth of Crop Plants. Advances in Agronomy 110, 251-331.
19. Giongo, A., Ambrosini, A., Vargas, L.K., Freire, J.R.J., Bodanese-Zanettini, M.H., Passaglia, L.M.P., 2008. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. Applied Soil Ecology 38, 261-269.
20. Glick, B.R., 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research 169, 30-39.
21. Grant, C.A., Flaten, D.N., Tomasiewicz, D.J., Sheppard, S.C., 2001. The importance of early season phosphorus nutrition. Canadian Journal of Plant Science 81, 211-224.
22. Gulati, A., Sharma, N., Vyas, P., Sood, S., Rahi, P., Pathania, V., Prasad, R., 2010. 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 192, 975-983.
23. Han, H.-S., Lee, K.D., 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant Soil and Environment 52, 130.
24. Iqbal Hussain, M., Naeem Asghar, H., Javed Akhtar, M., Arshad, M., 2013. Impact of phosphate solubilizing bacteria on growth and yield of maize. Soil & Environment 32.
25. Kavamura, V.N., Santos, S.N., da Silva, J.L., Parma, M.M., Ávila, L.A., Visconti, A., Zucchi, T.D., Taketani, R.G., Andreote, F.D., de Melo, I.S., 2013. Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. Microbiological Research 168, 183-191.
26. Khan, M.S., Zaidi, A., Ahmad, E., 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms, Phosphate Solubilizing Microorganisms. Springer, pp. 31-62.
27. Khan, M.S., Zaidi, A., Wani, P.A., Ahemad, M., Oves, M., 2009. Functional diversity among plant growth-promoting rhizobacteria: current status, Microbial Strategies for Crop Improvement. Springer, pp. 105-132.
28. Naeem, A., Akhtar, M., Ahmad, W., 2013. Optimizing available phosphorus in calcareous soils fertilized with diammonium phosphate and phosphoric acid using Freundlich adsorption isotherm. The Scientific World Journal 2013.

29. Orhan, F., Gulluce, M., 2015. Isolation and characterization of salt-tolerant bacterial strains in salt-affected soils of erzurum, Turkey. Geomicrobiology Journal 32, 521-529.
30. Patten, C.L., Glick, B.R., 2002. Role of Pseudomonas putida indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology 68, 3795-3801.
31. Penrose, D.M., Glick, B.R., 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum 118, 10-15.
32. Pereira, S.I.A., Castro, P.M.L., 2014. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance Zea mays growth in agricultural P-deficient soils. Ecological Engineering 73, 526-535.
33. Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., Sa, T., 2008. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. Journal of Microbiology and Biotechnology 18, 773-777.
34. Pradhan, N., Sukla, L.B., 2006. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology 5.
35. Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., Bashan, Y., 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. Plant and Soil 287, 15-21.
36. Ruppel, S., Franken, P., Witzel, K., 2013. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. Functional Plant Biology 40, 940-951.
37. Sánchez-Porro, C., Rafael, R., Soto-Ramírez, N., Márquez, M.C., Montalvo-Rodríguez, R., Ventosa, A., 2009. Description of Kushneria aurantia gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Halomonadaceae, and a proposal for reclassification of Halomonas marisflavi as Kushneria marisflavi comb. nov., of Halomonas indalinina as Kushneria indalinina comb. nov. and of Halomonas avicenniae as Kushneria avicenniae comb. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59, 397-405.
38. Schwyn, B., Neilands, J.B., 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry 160, 47-56.
39. Shahab, S., Ahmed, N., 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. African Journal of Biotechnology 7.
40. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H., Gobi, T.A., 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus 2, 587.
41. Shedova, E., Lipasova, V., Velikodvorskaya, G., Ovadis, M., Chernin, L., Khmel, I., 2008. Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of Serratia plymuthica. Folia Microbiologica 53, 110-114.
42. Soleimani, R., Alikhani, H.A., Towfighi, H., Pourbabaei, A.A., Khavazi, K., 2016. Indole-3-Acetic Acid and 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase-Producing Bacteria Alleviate Sodium Stress and Promote Wheat Growth. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 1-12.
43. Sperber, J.I., 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian journal of agricultural research 9, 782-787.
44. Tiwari, S., Singh, P., Tiwari, R., Meena, K.K., Yandigeri, M., Singh, D.P., Arora, D.K., 2011. Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (Triticum aestivum) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. Biology and Fertility of soils 47, 907.
45. Tsavkelova, E.A., Klimova, S.Y., Cherdyntseva, T.A., Netrusov, A.I., 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: a review. Applied Biochemistry and Microbiology 42, 117-126.

46. Upadhyay, S.K., Singh, D.P., Saikia, R., 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. Current Microbiology 59, 489-496.
47. Vyas, P., Gulati, A., 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonas. BMC Microbiology 9, 174.
48. Xie, H., Pasternak, J.J., Glick, B.R., 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium Pseudomonas putida GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. Current Microbiology 32, 67-71.
49. Yang, C.H., Chai, Q., Huang, G.B., 2010. Root distribution and yield responses of wheat/maize intercropping to alternate irrigation in the arid areas of northwest China. Plant Soil Environ 56, 253-262.
50. Yu, X., Liu, X., Zhu, T.H., Liu, G.H., Mao, C., 2011. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. Biology and Fertility of Soils 47, 437-446.
51. Zhu, F., Qu, L., Hong, X., Sun, X., 2011. Isolation and characterization of a phosphate-solubilizing halophilic bacterium Kushneria sp. YCWA18 from Daqiao Saltern on the coast of Yellow Sea of China. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011.

Evaluation of the Effect of Rhizospheric and Non-Rhizospheric phosphate Solubilizing Bacteria on Improving the Growth Indices of Wheat under Salinity and Drought Stress

H. A. Alikhani[1], H. Etesami and L. Mohammadi

Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran; E-mail: halikhan@ut.ac.ir

Assistant Professor, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran; E-mail: hassanetesami@ut.ac.ir.

MS.c Student, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran; E-mail: lemohammadi@ut.ac.ir

Received: October, 2017 & Accepted: March, 2018

Abstract

Phosphate solubilizing bacteria application in dry-land farming is a strategy for decreasing the consumption of P- fertilizers and environmental stresses. In this study, 184 rhizosphere and non-rhizosphere bacterial isolates from Qazvin and Zanjan soils were screened for plant growth promoting traits and tolerance to salinity and drought stresses. According to the results, two rhizosphere bacterial strains (*seudomonas* sp. W7 and *P. baetica* W153) and two non-rhizospheric bacterial strains (*Bacillus pumilus* W72 and *B. Safensis* W73) were carefully chosen as superior strains. The effects of superior strains on wheat growth indices and plant P content were evaluated in a completely randomized design with factorial arrangement with three replications under drought stress (osmotic pressure -5 bar) and salinity (0.5% NaCl) stresses in vitro condition. Strains W7, W153, W72, W73 and B0 were considered as the first factor and the wheat cultivars Roshan (P-efficient cultivar) and Marvdasht (P-inefficient cultivar) were considered as the second factor. Rhizosphere bacteria were the best strains in the qualitative assessment (solubilization of organic and inorganic phosphate). Both groups of bacteria (rhizosphere and non-rhizosphere isolates) showed similar tolerances to salinity and drought stress. Growth indices of both wheat cultivars decreased under salinity and drought stress. The results showed that inoculation of two wheat cultivars with selected phosphate-solubilizing bacteria, while increasing the amount of soluble P in the growth medium, could significantly increase plant growth indices (30- 53%) and plant P uptake (14-32%) compared to non-inoculated treatments. The results also showed that non-rhizospheric bacteria (despite having lower phosphate solubilization ability) were more effective in solubilizing insoluble phosphate (rock phosphate) in plant growth medium than rhizosphere bacteria. In general, these results indicated that using phosphate solubilizing bacteria can reduce some of the limitations of wheat production in dry-land farming

Keywords: dry-land farming; Bio-fertilizer; P-inefficient and P-efficient wheat cultivars; salt and drought tolerant bacteria

[1]. Corresponding author: Professor of Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agricultural Engineering and Technology, University of Tehran, Iran