

جداسازی، شناسایی و بررسی ویژگی‌های محرک رشدی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر درختان زیتون در خاک‌های شور

کبری ثقفی¹، جعفر احمدی¹، احمد اصغرزاده، حسن رکنی زاده و سید مهدی حسینی مزینانی²

دانشجوی دکتری ژنتیک و به نژادی گیاهی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران؛ kobra_saghafi@yahoo.com

استاد گروه ژنتیک و به نژادی گیاهی دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین، ایران؛ j.ahmadi@eng.ikiu.ac.ir

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران؛ hassan.rokizadeh@gmail.com

استاد گروه ژنتیک مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران؛ hosseini@nigeb.ac.ir

دریافت: 97/5/30 و پذیرش: 97/12/20

چکیده

سودوموناس‌ها گروه مهمی از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد هستند که به دلیل توزیع گسترده در خاک، توانایی کلونیزاسیون ریزوسفر بسیاری از گیاهان و دارا بودن ویژگی‌های محرک رشدی متعدد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. پژوهش حاضر به منظور شناسایی جدایه‌های سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر درختان زیتون در باغ‌های شور استان قزوین و ارزیابی خصوصیات محرک رشدی این جدایه‌ها از قبیل توانایی تولید سیدروفور، اکسین، سیانید هیدروژن، آنزیم ACC deaminase، قابلیت انحلال فسفر در محیط مایع، تغییرات pH و میزان تحمل غلظت‌های مختلف نمک (100، 200 و 400 میلی‌مولار) انجام شد. به این منظور 15 جدایه سودوموناس از 42 نمونه خاک ریزوسفری از باغات زیتون استان قزوین جمع‌آوری گردید. بر اساس نتایج بالاترین مقدار تولید آنزیم ACC deaminase در جدایه‌های Q7 و Q9 مشاهده شد. بیشترین مقدار تولید اکسین در حضور 100ppm از ال-تریپتوفان مربوط به جدایه Q2 (11/96 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود). انحلال‌پذیری تری کلسیم فسفات در محیط مایع در ارتباط با pH همبستگی منفی نشان داد و بالاترین مقدار فسفر حل شده برابر با 251/35 میکروگرم بر میلی‌لیتر متعلق به جدایه Q13 بود. همچنین 40% جدایه‌ها قادر به تولید HCN نبودند. از نظر تولید سیدروفور در دوره‌های زمانی دو، چهار و شش روزه تمامی جدایه‌ها قادر به رشد و تولید سیدروفور در محیط CAS-Agar بودند. همچنین تمامی جدایه‌ها به استثنای جدایه‌های Q1 و Q8 در غلظت‌های مختلف نمک به خوبی رشد کردند. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و پتانسیل شناسایی شده در این جدایه‌ها، برخی از این جدایه‌ها می‌توانند به عنوان کاندیدا جهت انجام مطالعات ژنومیکس و همچنین افزایش تحمل به شوری گیاهان در باغات شور مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: ACC deaminase، اکسین، زیتون، سیدروفور، شناسایی مولکولی، درخت فیوژنی

¹ نویسنده مسئول، آدرس: قزوین دانشگاه بین‌المللی امام خمینی

² نویسنده مسئول، آدرس: پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ایران

مقدمه

گیاهان با استفاده از راهکارهای متفاوت و همزیستی با سایر موجودات می‌توانند به صورت مؤثری با تنش شوری خاک مقابله نمایند. یکی از راهکارهای شناسایی شده در این زمینه، تجمع باکتری‌های تحریک کننده رشد در اطراف ریشه‌های این گیاهان در خاک‌های شور می‌باشد. با توجه به اینکه این باکتری‌ها نقش مهمی در افزایش مقاومت گیاهان به تنش شوری دارند، مطالعات زیادی با متمرکز شدن بر روی میزان کارایی جنس‌های مختلف باکتری‌های PGPR به منظور کاهش تأثیر تنش شوری بر گیاه صورت گرفته است. دباشان و همکاران، 2012، چگونگی تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه بر رشد و نمو گیاهان با استفاده از دو مکانیسم مستقیم و غیر مستقیم دانسته و عنوان کردند باکتری‌ها در حالت مستقیم با استفاده از مکانیسم‌های تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های رشد گیاهی، سنتز آنزیم‌های تعدیل‌کننده رشد و توسعه گیاه، تولید انواع ویتامین‌ها، تولید سیدروفورهای کلاته‌کننده آهن و محلول ساختن فسفات باعث تحریک و افزایش رشد گیاهان می‌شوند و در حالت غیر مستقیم، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی اثرات مضر بیمارگرهای گیاهی را خنثی یا تعدیل نموده و بدین طریق موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند. رقابت برای جذب مواد و اشغال جایگاه‌های مناسب برای فعالیت پاتوژن‌ها، تولید آنتی‌بیوتیک، آنزیم‌های لیتیک و تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن بر اساس مکانیسم‌های رقابتی یا آنتاگونیسم و یا تحریک سیستم دفاعی گیاهان و ایجاد مکانیسم‌های دفاع سیستماتیک گیاهی همراه است (کویله‌روت و همکاران، 2009).

در این میان سودوموناس‌ها به دلیل قابلیت حرکتی، استفاده بهینه از مواد ترشحی ریشه گیاه، کوتاه بودن دوره رشد و تکثیر، پتانسیل بالا در کلونیزاسیون ریشه و همچنین توانایی بالا در تولید آنزیم ACC-دآمیناز به عنوان عامل کنترل‌کننده تنش‌های محیطی در مقایسه با سایر باکتری‌ها توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند (علی و همکاران، 2010). قابلیت تولید آنزیم ACC-دآمیناز و هیدرولیز ACC در خاک توسط سودوموناس‌های فلورسنت سبب متمایز شدن این باکتری‌ها در مقایسه با سایر گونه‌های باکتریایی خاکزی شده است. به طور کلی باکتری‌های دارای ژن‌های کدکننده آنزیم ACC دآمیناز (به صورت endogenous یا exogenous) می‌توانند رشد گیاه را از طریق تولید آنزیم ACC-دآمیناز افزایش دهند. باکتری‌های مولد این آنزیم، با مصرف ACC (پیش ماده اولیه تولید اتیلن در گیاهان عالی) ترشح شده از بذر

و ریشه‌های گیاه، مانع تبدیل آن به اتیلن شده و از اثرات سوء و بازدارنده رشد اتیلن تنشی که در پاسخ به تنش‌های محیطی در گیاه تولید می‌شود، جلوگیری می‌نماید. مهمترین نقش باکتری‌های PGPR در شرایط تنش شوری اثر تنظیمی این باکتری‌ها در رابطه با تعادل اسموتیک و هموستاز یونی می‌باشد که با تنظیم هورمون‌های رشدی، بیان ژن‌های مقاومت به تنش شوری، افزایش کارایی پروتئین‌ها و فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی در گیاه می‌باشد. در نتیجه فعالیت باکتری‌های PGPR در محیط ریشه، وضعیت آنتی‌اکسیدانتی، تجمع اسمولیت‌ها، کارایی سیستم جابجایی پروتونی، تفکیک نمکی و وضعیت دسترسی ریشه‌های گیاه به مواد غذایی بهبود یافته و تنش اسموتیک و سمیت یونی کاهش می‌یابد. در نتیجه این رخدادها، بیان ACC-دآمیناز افزایش خواهد یافت و گیاه قادر به پاسخگویی به تنش شوری خواهد بود.

همچنین برخی از باکتری‌های PGPR قادرند با کلات نمودن یون‌های سمی ریشه‌های گیاهان را در مقابل آلودگی‌های یونی یا کاتیونی محافظت نمایند و از این طریق توانایی ریشه‌های گیاه را برای مقابله با این یون‌ها افزایش دهند (جینگ و همکاران، 2006). افزایش جذب و محلول کردن عناصر غذایی، از طریق توسعه سیستم ریشه-ای گیاه می‌باشد. اساساً این باکتری‌ها باعث کاهش رشد طولی ریشه‌های اولیه و افزایش طول و تعداد ریشه‌های جانبی می‌شوند و همچنین سبب طولیل شدن ریشه‌های موئین نیز می‌گردند. در نتیجه چنین اثری، جذب مواد غذایی و آب و عناصر معدنی برای ریشه‌های گیاه به سهولت انجام گرفته و نتیجه آن افزایش رشد کل گیاه خواهد بود (الزمرانی و همکاران، 2006؛ ورسوگولو و منکسس، 2010؛ والکر و همکاران، 2012). کارلیداگ و همکاران (2007) تأثیر باکتری‌های محرک رشد *Bacillus OSU-142 Microbacterium Bacillus M3* را به صورت منفرد و ترکیبی روی درخت سیب مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش افزایش وزن میوه، طول ساقه و قطر ساقه را در مقایسه با تیمار کنترل نشان داد. همچنین میزان عناصر غذایی مقدار نیتروژن، فسفر، کلسیم، پتاسیم، آهن، منگنز، روی و مس در گیاه افزایش پیدا کرد. کاراکورت و همکاران (2011) گزارش کردند تلقیح ریشه درختان آلبالو با برخی از جدایه‌های باکتری‌های محرک رشد شامل *Bacillus Burkholderia -subtilis Bacillus megaterium Pseudomonas putida -cepacia*، به صورت منفرد و ترکیبی سبب رشد رویشی عملکرد و حجم میوه درختان آلبالو شده و بر روی خصوصیات شیمیایی مربوط به میوه

شامل یک محیط کشت عمومی¹ NB¹ (برای رشد عمومی جدایه‌ها) و دو محیط کشت افتراقی King B و Pseudomonas Agar Base (برای نمایان ساختن ویژگی خاص یعنی تولید بیشتر ماده فلورسانس) استفاده شد. پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در انکوباتور با دمای 27 درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از رشد باکتری‌ها، کلنی‌هایی که از لحاظ شکل، شفافیت و سایر ویژگی‌ها به سودوموناس‌های فلورسنت شبیه بودند به صورت جداگانه روی محیط کشت اختصاصی King B منتقل شده و دو تا سه بار کشت داده شدند تا از خلوص باکتری‌ها اطمینان حاصل شود. معیار شناسایی باکتری‌های سودوموناس‌های فلورسنت از سایر جنس‌ها در باکتری‌های خالص شده، رنگ فلورسنت (رنگ سبز متمایل به زرد) ساطع شده از کلنی‌ها در مقابل نور UV بود. 15 جدایه حاصل از کلنی‌های منتخب با آزمون‌های مختلف وابسته به کشت (موفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی) و آزمون غیر وابسته به کشت (شناسایی مولکولی از طریق تعیین توالی ژن rRNA 16S) مورد بررسی و آزمون قرار گرفتند (لیس، 2014).

آزمون‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

آزمون‌های تکمیلی به منظور شناسایی دقیق جدایه‌ها و براساس روش‌های طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌ها و کلیدهای شناسایی ارائه شده در منابع معتبر انجام شد (هلمز و همکاران، 1984).

به منظور شناسایی جدایه‌ها، از میان جدایه‌های انتخاب شده از آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم و بررسی مشخصات مورفولوژیک، ایجاد رنگ فلورسنت، کاتالاز، اکسیداز، آرژنین دهیدرولاز و تست تحرک استفاده گردید (باریل، 2012). برای بررسی ایجاد رنگ فلورسنت پس از کشت باکتری بر روی محیط کشت kingB و رشد باکتری روی محیط کلیه کلنی‌ها با استفاده از لامپ با تابش نور ماورای بنفش مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی حاصل از مشاهده شکل ظاهری با میکروسکوپ نوری، جدایه‌ها میله‌ای شکل و با آرایش متنوع راست و خمیده و گرم منفی بودند. رنگ‌آمیزی گرم بر اساس روش (گریجرسن، 1978)، برای انجام تست کاتالاز به روش اضافه کردن محلول H₂O₂ (30 درصد) بر روی کلنی‌ها و ظهور حباب‌های اکسیژن به عنوان شاخص برای کاتالاز مثبت بودن جدایه‌ها استفاده شد (چانس و ماهلی، 1955) برای انجام آزمون اکسیداز، چند قطره از

اثر مثبت داشته است. نتایج مطالعه پیوندی و همکاران (2012) نشان داد که کاربرد دو جدایه P19 و P21 باکتری سودوموناس فلورسنت بر گیاه زیتون باعث سبب افزایش حجم ریشه تعداد ریشه‌ها و طول آنها شد. اردوغان و همکاران (2018) به تأثیر مثبت و معنی‌دار یازده جدایه باکتری محرک رشد برون برگ، طول ساقه اصلی، شاخص سطح برگ، کلروفیل، نیتروژن، مقدار روی و آهن محتوای کلروفیل برگ در درختان انگور اشاره کردند. کیتیر و همکاران (2018) در پژوهشی که بر روی گیاه توت فرنگی و با کاربرد باکتری *Azospirillum brasilense* انجام دادند نتیجه گرفتند کاربرد این جدایه سبب افزایش کلروفیل، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی، محتوای آمینواسید و اسیدهای آلی در برگ گیاه گردید. تحقیقات نشان داده است کاربرد باکتری‌های PGPR به عنوان ابزاری قدرتمند در مقابله با تنش شوری در مزارع می‌تواند افق نوینی را در کشاورزی پیشرفته به منظور کاهش صدمات و خسارت‌های ناشی از تنش‌های زیست محیطی و افزایش کلی تولید محصولات کشاورزی باز نماید (میرانصاری، 2014). لذا با در نظر گرفتن این مهم، پژوهش حاضر به منظور جداسازی و بررسی خصوصیات باکتری‌های موجود در اطراف ریشه درختان زیتون باغ‌هایی با خاک شور در استان قزوین انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و آنالیز مقدماتی

برای انجام این پژوهش 42 نمونه خاک از ریزوسفر درختان زیتون از عمق 20-30 سانتی‌متری در باغ‌هایی با خاک‌های شور در استان قزوین جمع‌آوری گردید. موقعیت جغرافیایی تمامی نقاط نمونه‌برداری توسط دستگاه GPS ثبت و نمونه‌ها به‌طور جداگانه درون کیسه پلاستیکی قرار داده شده و به آزمایشگاه بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب منتقل شدند. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات مربوط به جداسازی در دمای 4 درجه سانتی‌گراد در سردخانه آزمایشگاه نگهداری شدند. برای جداسازی جدایه‌ها مقدار 10 گرم از هر نمونه خاک ریزوسفری همراه با ریشه به ارلن‌های حاوی 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم 0/9 درصد) منتقل و به مدت 30 دقیقه با سرعت 150 دور در دقیقه تکان داده شدند. از سوپانسیون باکتری‌ها غلظت‌های مختلف (از 10⁻² تا 10⁻⁷) تهیه و 0/1 میلی‌لیتر از هر غلظت توسط پیت بر سطح محیط کشت نوترینت کشت داده شد. کشت‌ها در سه تکرار و در سه محیط کشت

¹ Nutrient Broth

جذب نور در طول موج 535 نانومتر قرائت شد (بنت و همکاران، 2001). مقدار تولید اکسین با مقایسه این جذب با نمودار استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

اندازه‌گیری توان تولید سیانید هیدروژن

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن براساس روش دونیت-کوری و همکاران (2005) انجام شد. برای این منظور ابتدا جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط NB غنی شده با گلايسين (4/4 گرم در لیتر) کشت داده شدند. بدین صورت که هر پلیت با 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری که 48 ساعت انکوبه شده بود تلقیح، سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک 0/5 درصد در داخل درب پلیت قرار داده شد. سپس پلیت‌ها با استفاده از پارافیلیم درزبندی شده تا از خروج گاز سیانید هیدروژن جلوگیری شود. پلیت‌ها 5 روز در انکوباتور در دمای 27 درجه سلسیوس نگهداری و براساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (کم)، نارنجی (نسبتاً کم)، قهوه‌ای روشن (نسبتاً زیاد) و آجری (زیاد) که به ترتیب از 1 تا 5 درجه‌بندی شدند، میزان تولید سیانید هیدروژن تعیین گردید.

اندازه‌گیری پتانسیل انحلال‌پذیری فسفات در محیط مایع

برای این منظور از محیط² PKV که حاوی نمک نامحلول تری‌کلسیم فسفات بود استفاده گردید. در این روش ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده شده، سپس 200 میکرولیتر از تعلیق باکتری با جمعیت 10^7 cfu/ml به 25 میلی‌لیتر محیط PKV حاوی پنج گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات منتقل گردید. سپس ارلن‌های تلقیح شده همراه با یک شاهد به مدت 120 ساعت شیکر شده و سپس pH آنها قرائت گردید. همزمان با عملیات ذکر شده تعلیق باکتری سانتریفوژ (با دور 1000 به مدت 15 دقیقه) و 1 میلی‌لیتر از محلول رویی با 3 میلی‌لیتر آب مقطر و 1 میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات-وانادات مخلوط شد. پس از 10 دقیقه خواباندن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 470 نانومتر قرائت شده و میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از KH_2PO_4 محاسبه شد (ریچاردسون و سیمپسون، 2011).

معرف اکسیداز (محلول یک درصد دی‌متیل پارافنیلین دی‌آمین هیدروکلراید) بر روی کلنی‌ها ریخته شده و تغییر رنگ به سمت قرمز تیره یا سیاه به عنوان اکسیداز مثبت در نظر گرفته شد (تارند و همکاران، 1982)، تست آرزنین دهیدرولاز بر اساس تغییر رنگ معرف فنل رد (تورنلی و مارگارت، 1960) و توان تحرک باکتری از محیط نیمه جامد با ترکیب پپتون (10 گرم در لیتر) عصاره گوشت (سه گرم در لیتر)، کلرید سدیم (پنج گرم در لیتر) و آگار (0/4 گرم در لیتر) استفاده گردید. برای انجام این آزمون تحت شرایط سترون و به کمک سوزن پلاتین از کشت تازه باکتری مقداری برداشته شد و به طور عمودی در وسط لوله‌های حاوی محیط کشت تلقیح گردید. رشد منحصر به خط تلقیح نشانه غیرمتحرک بودن باکتری می‌باشد.

آزمون‌های محرک رشدی جدایه‌ها

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش نیمه کمی

CAS¹

این آزمون با استفاده از روش اصلاح شده الکساندر و زوبر (1991) صورت پذیرفت. برای تهیه این محیط، چهار محلول شامل معرف Fe-CAS، بافر، محلول غذایی و کازو آمینواسید با یکدیگر مخلوط گردید. ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت NB به مدت 48 ساعت کشت داده شد، سپس 15 میکرولیتر تعلیق تازه باکتری با جمعیت 10^6 cfu/ml به روش لکه-گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط CAS کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده تا زمان اندازه‌گیری در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. تولید هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی بیانگر تولید سیدروفور بود. در فواصل زمانی دو، چهار و شش روز قطر هاله، قطر کلنی و هم چنین نسبت قطر هاله به کلنی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان تولید اکسین

به منظور بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت NB کشت داده و سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط NB حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر آل-تریپتوفان منتقل گردید. بعد از 48 ساعت، سوسپانسیون باکتری سانتریفوژ و یک میلی‌لیتر از محلول بالای با دو میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5 میلی‌لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0/5 مولار) مخلوط شد. سپس به مدت 25 دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بلافاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان

² Pikovskayas Agar

¹ Chrome-azurol sulfonate

شد. ژل، به وسیله رنگ آشکارساز Simple Safe رنگ-آمیزی و به وسیله دستگاه ژل داکیومنت، تصویربرداری گردید. قطعات تکثیر یافته قطعات تکثیر یافته تعیین توالی شدند. مراحل انجام واکنش PCR در جدول 1 آمده است. آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. تجزیه‌های آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS و رسم نمودارها به وسیله نرم افزار Excel انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد.

نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزار Chromas pro بررسی شد به منظور مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی و تجزیه و تحلیل تکاملی قطعات تعیین توالی شده جهت ترسیم درخت فیلوژنی و تعیین میزان تشابه و اختلاف میان توالی‌های بدست آمده جدایه‌های مورد بررسی، از ابزار BLASTn پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) استفاده شد. از نرم افزار BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>) به منظور ایجاد کانتینگ از توالی‌های Forward و Reverse و در نهایت از نرم‌افزار Mega (<https://www.megasoftware.net>) برای انجام آنالیز فیلوژنتیکی استفاده گردید. نهایتاً ثبت توالی‌ها با برنامه BankIt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/?tool=ge>) صورت گرفت.

نتایج و بحث

کشت و رقت‌گیری متوالی 42 نمونه خاک بر روی محیط‌های کشت در نهایت منجر به جدا سازی 73 جدایه گردید. به منظور شناسایی دقیق کلیه جدایه‌های جداسازی شده با تست‌های بیوشیمیایی و بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند و در نهایت 15 جدایه به عنوان جدایه سودوموناس فلورسنت انتخاب شدند جدول 3 مشخصات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های مورد بررسی را نشان داده است.

پتانسیل تولید آنزیم ACC-deaminase

آزمون توان تولید آنزیم ACC-دآمیناز به روش پروز و گلیک (2003)، انجام گرفت. به منظور بررسی توان جدایه‌های مورد مطالعه در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن که می‌تواند نشانه تولید آنزیم ACC-دآمیناز توسط باکتری باشد. جدایه‌ها به مدت 48 ساعت در محیط کشت NB کشت داده شدند. سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون تازه هر جدایه به 20 میلی‌لیتر از سه محیط DF¹، حاوی 3 میلی‌مولار ACC (به عنوان تنها منبع نیتروژن)، محیط DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم (منبع نیتروژنی پایه) و محیط DF فاقد ACC و سولفات آمونیوم (فاقد هر گونه منبع نیتروژنی) تلقیح گردید. بعد از 48 ساعت انکوباسیون در دمای 28 درجه سلسیوس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در 405 نانومتر برای هر سه محیط قرائت شد. میزان جذب نور در این محیط به عنوان معیاری از رشد باکتری، ارزیابی گردید.

بررسی توان تحمل جدایه‌ها به شوری

به منظور بررسی توان تحمل جدایه‌ها به شوری، غلظت‌های 0، 100، 200 و 400 میلی‌مولار از نمک‌های کلرید سدیم (NaCl)، کلرید کلسیم (CaCl₂) و کلرید منیزیم (MgCl₂) به صورت ترکیبی و با نسبت مساوی در محیط کشت NB تهیه شد. در این روش، ابتدا جدایه‌ها به مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده شده و سپس 200 میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه با جمعیت 10^7 CFU/ml به 25 میلی‌لیتر محیط NB حاوی غلظت‌های مختلف نمک‌ها تلقیح گردید. ارلن‌های تلقیح شده همراه با یک شاهد برای هر غلظت نمک، به مدت 48 ساعت بر روی شیکر قرار داده شدند. سپس میزان جذب نور در طول موج 600 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و نسبت به میزان جذب نور در سطح صفر شوری مقایسه گردید.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

استخراج DNA از 15 جدایه مورد بررسی با استفاده از کیت مخصوص باکتری‌های گرم منفی شرکت سیناکلون و با استفاده از کشت 24 ساعته با جمعیت $4-6 \times 10^6$ انجام شد. واکنش PCR و تکثیر ژن 16S rDNA از ژنوم جدایه‌ها با استفاده از آغازگرهای عمومی (جدول 2) انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز یک درصد در اختلاف پتانسیل ثابت 80 ولت، همراه با نشانگر وزن مولکولی 1500 جفت بازی انجام

¹ Dworkin M., and Foster

جدول 1- مراحل واکنش دما و دوره های زمانی PCR با انتخاب دمای اتصال

| مرحله واکنش | دما (درجه سانتی گراد) | دوره زمانی | تعداد چرخه |
|-----------------------|-----------------------|------------|------------|
| واسرشت سازی اولیه DNA | 94 | 3 دقیقه | یک بار |
| واسرشت سازی DNA | 94 | 45 ثانیه | 35 بار |
| اتصال آغازگر | 52 | 45 ثانیه | |
| بسط آغازگر | 72 | 120 ثانیه | |
| بسط نهایی | 72 | 10 دقیقه | یک بار |

جدول 2- توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش PCR

| Primer name | Sequence | Reference |
|-------------|-----------------------------|-------------------------|
| 27F | 5'-AGAGTTTGATCTTGGCTCAG-3' | (تورنر و همکاران، 1999) |
| 1492R | 5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3' | (لین، 1991) |

جدول 3- برخی از ویژگی‌های فتوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های مورد بررسی

| جدایه | کاتالاز | اکسیداز | تحرك | آرژنین دهیدرولاز | شکل کلونی | رنگ آمیزی گرم |
|-------|---------|---------|------|------------------|-----------|---------------|
| Q1 | + | + | - | + | میله‌ای | - |
| Q2 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q3 | + | + | - | + | میله‌ای | - |
| Q4 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q5 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q6 | + | + | - | + | میله‌ای | - |
| Q7 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q8 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q9 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q10 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q11 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q12 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q13 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q14 | + | + | + | + | میله‌ای | - |
| Q15 | + | + | + | + | میله‌ای | - |

گونه‌های فلورسنت پاتوژن گیاهی از سایر فلورسنت‌ها می‌باشند، مثبت بود.

نتایج تست‌های فتوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها نشان داد که اغلب این جدایه‌ها، میله‌ای شکل، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت بودند. همچنین نتایج ارزیابی این جدایه‌ها از نظر تست آرژنین دهیدرولاز که تست افتراقی

جدول 4- جدول تجزیه واریانس بررسی ویژگی‌های محرک رشدی در جدایه‌ها

| میانگین مربعات | | | | | | | | | |
|----------------|------------|--------|-------------|-------------|--|---------|---------|------------------------------|---------|
| منبع تغییرات | درجه آزادی | pH | حلالیت فسفر | تولید اکسین | تحمل به غلظت‌های مختلف نمک ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | | | سیدروفور قطر هاله/کلونی (cm) | |
| | | | | | 400 | 200 | 100 | (2 روز) | (4 روز) |
| باکتری | 14 | 1/57** | 16459** | 5/95** | 0/120** | 0/145** | 0/327** | 0/312** | 0/321** |
| خطا | 29 | 0/045 | 755 | 0/427 | 0/014 | 0/014 | 0/006 | 0/008 | 0/008 |
| ضریب تغییرات | | 4/34 | 15 | 7/54 | 14/1 | 14 | 14 | 3/23 | 4/49 |

** معنی دار در سطح احتمال 1 درصد

فسفات در محیط مایع توسط جدایه‌ها نشان داد که همه جدایه‌ها قادر به انحلال آن بودند. کمترین مقدار انحلال فسفات متعلق به جدایه Q3 (31/6 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و بیشترین آن مربوط به جدایه Q13 (251 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود. مقایسه pH جدایه‌های مختلف با تیمار شاهد بدون باکتری نشان داد که تمامی جدایه‌ها موجب کاهش معنی‌دار pH شدند. دامنه تغییرات pH توسط جدایه‌ها نیز از 4/10 تا 5/94 متغیر بود. همچنین همبستگی منفی و معنی‌داری ($r = -0/23^{**}$) بین انحلال تری‌کلسیم فسفات و pH محیط کشت مشاهده گردید.

قابلیت انحلال‌پذیری فسفر به وسیله توانایی باکتری یا میکرووب در آزاد کردن اسیدهای آلی از طریق گروه هیدروکسیل و کربوکسیل می‌باشد که عناصر متصل به عنصر فسفر را کلاته کرده و در نتیجه آن را به فرم قابل انحلال در می‌آورد. انحلال‌پذیری فسفات توسط پروسه-های میکروبی مختلفی صورت می‌پذیرد که شامل تولید اسیدهای آلی و آزادسازی پروتون‌ها می‌باشد. شارما و همکاران (2017) در پژوهشی با جداسازی چهار جدایه سودوموناس‌های فلورسنت حل‌کننده فسفات از ریزوسفر گیاهان مختلف در شش منطقه عنوان کردند اغلب باکتری‌ها دارای پتانسیل معدنی‌سازی و انحلال‌پذیر کردن ترکیبات آلی و غیر آلی فسفردار هستند. ریچاردسون و سیمپسون (2011) علت انحلال فسفات‌های معدنی توسط باکتری‌های محرک رشد را تولید اسیدهای آلی جدا شده از محیط کشت، به عنوان مکانیسم اصلی انحلال فسفات-های معدنی ذکر کردند. همچنین هالدر و چاکرابارتی (1993) در مطالعه‌ای بر روی باکتری‌های ریزوبیوم لگومینوساروم ثابت کردند اسیدهای آلی جدا شده از محیط کشت باکتری می‌تواند موجب انحلال فسفات‌های معدنی شوند. در راستای این نظریه حضور اسیدهای آلی از قبیل اگزالیک، سیتریک، لاکتیک و گلوئیک با روش‌های مختلف کروماتوگرافی نظیر TLC و HPLC در محیط کشت مایع میکروارگانیزم‌های حل‌کننده فسفات توسط همین محققین گزارش شده است. این مواد مترشحه از باکتری‌ها همچنین سبب کاهش pH محیط کشت می‌شوند. مکانیسم اصلی برای حلال‌سازی مواد معدنی فسفات در خاک، کاهش pH از طریق تولید میکروبی اسیدهای ارگانیک و معدنی کردن فسفر آلی توسط اسید فسفاتاز است (شارما و همکاران، 2017).

اکسین از مهمترین هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد در گیاهان است. این هورمون تأثیر مهمی در تعاملات میکروارگانیزم‌ها و گیاهان دارد و بیش از 80 درصد باکتری‌های ریزوسفری قادر به تولید IAA می‌باشند (گلیک و همکاران 2007). نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که بیش از نود درصد جدایه‌ها قابلیت تولید اکسین با مقادیر مختلف را در حضور غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر ال - تریپتوفان را دارا بودند. نتایج آنالیز واریانس (جدول 4) نشان داد که تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد بین کلیه صفات مورد بررسی در جدایه‌ها وجود دارد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین کلیه جدایه‌ها دارای قابلیت تولید اکسین در غلظت 100 میلی‌گرم در لیتر ال - تریپتوفان بوده‌اند. توانایی تولید اکسین در جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق از حداقل 6/29 تا حداکثر 11/92 میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. بیشترین مقدار تولید اکسین مربوط به جدایه Q2 و کمترین مقدار تولید اکسین مربوط به جدایه Q11 می‌باشد. مقدار متوسط تولید اکسین توسط این جدایه‌ها برابر 8/61 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود.

در پژوهشی که توسط احمد و همکاران (2005) انجام شد با بررسی 21 جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescent* و *Azotobacter* جدا شده از ریزوسفر گیاهان مختلف و با بررسی ویژگی‌های محرک رشدی این جدایه‌ها قابلیت تولید اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت را از ویژگی‌های بارز این گروه از باکتری‌ها عنوان کردند. تولید اکسین در ریزوسفر به دلیل وجود جمعیت بالای میکروبی و سوبسترا در این ناحیه گزارش شده است. تولید اکسین در حضور غلظت-های مختلف تریپتوفان در 21 جدایه مربوط به جنس-های *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *pneumonia* and *Bacillus marinus Klebsiella* توسط عزیز و همکاران (2015) نیز گزارش شده است. همچنین تولید اکسین توسط جدایه‌های سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر درختان پسته در خاک‌های شور توسط آزرمی و همکاران (1393) گزارش شده است.

انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول توسط جدایه‌های سودوموناس‌های فلورسنت و همچنین تغییرات pH محیط کشت در سطح یک درصد معنی‌دار شد. نتایج مقایسه میانگین (جدول 5) ارزیابی انحلال تری‌کلسیم

جدول 5- مقایسه میانگین جدایه‌ها برای انحلال فسفر در محیط مایع و تولید اکسین

| تولید اکسین ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | انحلال فسفر ($\mu\text{g ml}^{-1}$) | PH | جدایه |
|--|--|--------------------|-------|
| 9/94 ^b | 81/2 ^c | 5/70 ^a | Q1 |
| 11/96 ^a | 245 ^{ab} | 4/20 ^d | Q2 |
| 9/39 ^{bd} | 31/6 ^d | 5/60 ^a | Q3 |
| 8/94 ^{be} | 232 ^{ab} | 4/10 ^d | Q4 |
| 9/30 ^{bd} | 233 ^{ab} | 4/10 ^d | Q5 |
| 8/02 ^{ef} | 236 ^{ab} | 40/5 ^d | Q6 |
| 8/58 ^{ce} | 115 ^c | 5/80 ^a | Q7 |
| 8/41 ^{ce} | 222 ^{ab} | 4/60 ^c | Q8 |
| 8/18 ^{df} | 86/6 ^c | 5/90 ^a | Q9 |
| 9/50 ^{bc} | 205 ^{ab} | 5/10 ^b | Q10 |
| 6/29 ^g | 247 ^b | 4/20 ^{cd} | Q11 |
| 7/83 ^{ef} | 128 ^c | 5/90 ^a | Q12 |
| 6/39 ^g | 251 ^a | 4/60 ^c | Q13 |
| 9/37 ^{bd} | 246 ^{ab} | 4/30 ^{cd} | Q14 |
| 7/00 ^{gf} | 194/75 ^b | 4/30 ^{cd} | Q15 |

در هرستون میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

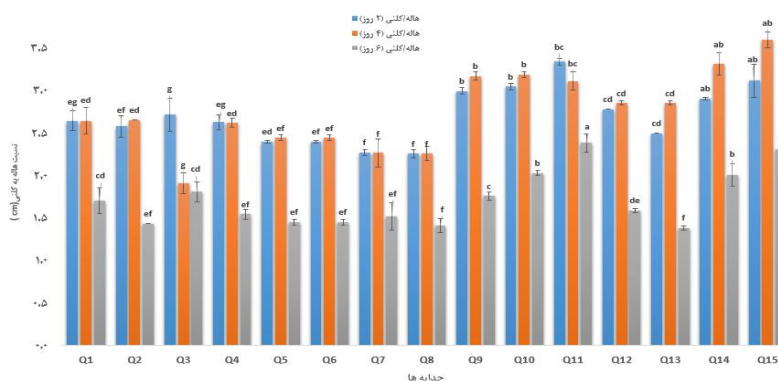
ناچیزی از تولید آن در مسیر بی‌هوازی اکسیداسیون باکتریایی صورت می‌پذیرد. همچنین در گیاهان سیانید هیدروژن به عنوان یک ماده همراه در مسیر بیوستز اتیلن تولید می‌شود. در این واکنش آنزیم ACC Oxidase ترکیب 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid را به اتیلن و HCN تبدیل می‌کند. دلیل احتمالی عدم تولید سیانید هیدروژن در این جدایه‌ها را می‌توان به توانایی بالای این جدایه‌ها در تولید آنزیم ACC-Deaminase به عنوان عاملی که از تولید اتیلن در گیاه جلوگیری می‌کند نسبت داد. سیانید باعث افزایش فعالیت ژن کدکننده ACC-Synthase ژن کلیدی مسیر بیوستز اتیلن- شده و در نتیجه باعث افزایش تولید اتیلن در گیاه آرابیدوپسیس می‌شود (پیرونک و بارومان 1987). همچنین در پژوهشی که توسط احمدی نجف آبادی و همکاران (1394) بر روی 16 جدایه سودوموناس فلورسنت مقاوم به شوری انجام شد بیش از هفتاد درصد جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبوده‌اند.

کلیه جدایه‌های شناسایی شده قادر به رشد و تولید سیدروفور در محیط CAS-آگار بودند نسبت قطر هاله به قطر کلنی در بازه زمانی دو، چهار و شش روز از 1/4 تا 3/6 سانتی‌متر متغیر بود. نسبت قطر هاله به کلونی در روز دوم از 2/26 تا 3/34، در روز چهارم از 1/91 تا 3/6، در روز ششم از 1/39 تا 2/39 و بطور متوسط از 0/37 تا 2/73 متغیر بود (شکل 1). نقش باکتری‌های مولد سیدروفورهای میکروبی در افزایش رشد گیاه می‌تواند

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش توانایی تولید سیانید هیدروژن را نداشته و یا مقدار بسیار کمی سیانید هیدروژن تولید کردند. به طوریکه 40 درصد جدایه‌ها (جدایه‌های Q4، Q5، Q6، Q8، Q9 و Q10) فاقد پتانسیل لازم برای تولید سیانید هیدروژن بوده و سایر جدایه‌ها (60%) مقدار بسیار کمی سیانید هیدروژن تولید کردند. یکی از قابلیت‌های مهم باکتری‌های سودوموناس تولید سیانید از اکسیداسیون اسید آمینه گلیسین می‌باشد. در اکسیداسیون باکتریایی اسید آمینه گلیسین دو فرآورده به نام‌های کربن دی‌اکسید و سیانید هیدروژن تولید می‌شود، که بر اساس این یافته‌ها هیدروژن سیانید آزاد از مشتقات اکسیدی گروه آمینومتیل اسید آمینه گلیسین بوده و در نتیجه مقدار تولیدی آن در سلول دقیقاً معادل با مقدار کربن دی‌اکسید تولید شده می‌باشد (بریسک و همکاران، 1969). در ادامه نتیجه تحقیقات (کلاوسون و یانگ، 1913) نشان داد که در طی فرآیند اکسیداسیون باکتریایی اسید آمینه گلیسین پیوند C-N گروه آمینومتیل این اسید آمینه به صورت دست نخورده باقی می‌ماند که در مراحل بعدی اکسیداسیون می‌تواند به صورت فرآورده‌های مشتقی رها شود. بر اساس نتایج بدست آمده در رابطه با اکسیداسیون هوازی و غیرهوازی اسید آمینه گلیسین توسط سویه‌های باکتریایی، می‌توان گفت که حجم قابل توجهی از هیدروژن سیانید آزاد شده تحت شرایط اکسیداسیون هوازی تولید می‌شود و سهم بسیار

کلات شدن آهن توسط سیدروفورهای میکروبی، صدمه نمی‌بینند زیرا دارای مکانیسم‌هایی برای انتقال آهن از این سیدروفورهای میکروبی به درون خود و جذب آن می‌باشند (گلیک، 1995). در پژوهش حاضر بر اساس ارزیابی قطر هاله، قطر کلنی و نسبت قطر هاله به کلنی دارای توان تولید سیدروفور کلیه جدایه‌ها در بازه زمانی مورد بررسی دو، چهار و شش روز بودند. در پژوهشی که توسط رسولی صدقیانی و همکاران (1387) از 201 جدایه سودوموناس فلورسنس جدا شده از ریزوسفر گندم همگی توان تولید سیدروفور داشتند. شریفی و همکاران (1396) با جداسازی 38 جدایه سودوموناس فلورسنس از ریزوسفر گیاه ذرت گزارش کردند کلیه جدایه‌ها قادر به تولید سیدروفور در محیط CAS-آگار بودند.

تحریک مستقیم رشد گیاه به دلیل نقش کلیدی آهن در فرایندهای متابولیک حیاتی در گیاهان به واسطه افزایش جذب آهن توسط گیاه یا به صورت غیر مستقیم و از طریق بیوکنترول عوامل بیمارگر گیاهی باشد. باکتری‌ها مواد کلات‌کننده‌ای با وزن مولکولی کم (400-1000Da) به نام سیدروفور ترشح می‌کنند. سیدروفورها (Siderophores) ترکیب‌های آلی با وزن مولکولی کم و لیگاندهای شیمیایی با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند شدن با آهن III هستند که تمایل زیاد به جذب آهن دارند. سیدروفور ترشح شده توسط باکتری با بخش اعظم آهن فریک موجود در خاک کمپلکس‌های پایدار تشکیل می‌دهد. باکتری‌هایی که سیدروفور تولید می‌کنند کمپلکس سیدروفور با آهن را توسط گیرنده‌های خاصی که در غشاء خود دارند جذب می‌کنند. گیاهان معمولاً از این



شکل 1- تغییرات نسبت قطر هاله به کلنی در تولید سیدروفور در بازه زمانی دو، چهار و شش روز

سازی شده از خاک‌های آلوده به مس، و با اندازه‌گیری نیمه کمی ACC-دآمیناز در این جدایه‌ها عنوان کردند تنها دو جدایه قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و تولید آنزیم ACC-دآمیناز بودند. در مطالعه‌ای که توسط سرچشمه پور و همکاران (1388) به روش اندازه‌گیری نیمه کمی از طریق کدورت‌سنجی انجام شد و از 104 جدایه 42 درصد از جدایه‌ها قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و تولید آنزیم ACC-دآمیناز بودند. میکروب‌های حاوی آنزیم ACC - دآمیناز باعث می‌شود مقدار ترشح ACC از ریشه گیاهان افزایش یابد و به دنبال آن رشد ریزوموجودات حاوی آنزیم ACC-دآمیناز در مقایسه با سایر میکروب‌ها در نزدیکی ریشه گیاهان افزایش یابد. با این مکانیسم نه تنها مقدار ACC درون گیاه کاهش می‌یابد بلکه سنتز زیستی هورمون اتیلن در شرایط تنش نیز به صورت چشمگیری کاهش می‌یابد (گلیک و همکاران، 2007).

نتایج جدول 6، بیانگر توانایی و کارایی بالای کلیه جدایه‌ها در تولید آنزیم ACC -دآمیناز و مصرف به عنوان منبع نیتروژن است. همچنین نتایج نشان داد هیچ کدام از جدایه‌ها در محیط DF عاری از منبع نیتروژن رشد نکردند. تمامی جدایه‌ها در محیط DF حاوی سولفات آمونیوم رشد کردند. نسبت جذب نور در محیط DF حاوی ACC به محیط DF حاوی سولفات آمونیوم بین مقادیر 0/8 تا 1/01 متغیر بود. این نتیجه نشان می‌دهد جدایه‌های مورد بررسی کارایی زیادی در تولید آنزیم ACC-Deaminase و مصرف ACC به عنوان منبع نیتروژن بوده و می‌توانند با کاهش اتیلن‌تنشی سبب حفاظت از گیاه در مقابل تنش گردند. نتایج نشان داد جدایه Q7 و Q9 که دارای بالاترین میزان OD در محیط DF حاوی ACC بودند، بهترین جدایه‌ها در مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن بود (جدول 4). کریمی و همکاران (1396) در مطالعه‌ای با بررسی پنج جدایه جدا

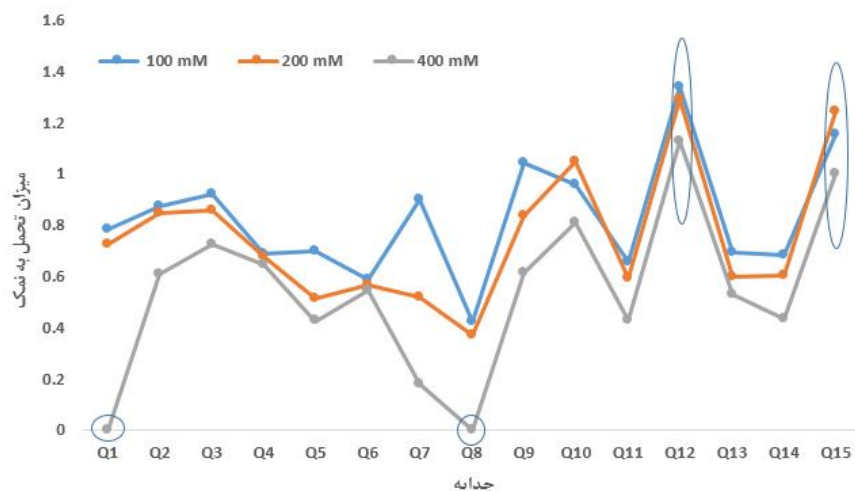
جدول 6- بررسی توانایی جدایه‌ها به منظور مصرف ACC به عنوان منبع نیتروژن در محیط مایع حاوی ACC

| DF-N | DF+ACC (mM) | DF+N (g/L) | DF+ACC/DF+N | نام جدایه | دآمیناز ACC |
|-------|-------------|------------|-------------|-----------|-------------|
| 0/166 | 1/619 | 1/739 | 0/931 | Q1 | + |
| 0/238 | 1/294 | 1/68 | 0/767 | Q2 | + |
| 0/247 | 1/849 | 1/892 | 0+/977 | Q3 | + |
| 0/241 | 1/818 | 1/86 | 0/9774 | Q4 | + |
| 0/311 | 1/834 | 1/906 | 0/9622 | Q5 | + |
| 0/613 | 1/859 | 2/47 | .0/7526 | Q6 | + |
| 0/409 | 1/899 | 1/86 | 1/0188 | Q7 | ++ |
| 0/348 | 1/776 | .1/871 | 0/9492 | Q8 | + |
| 0/5 | 1/886 | 1/881 | 1/0027 | Q9 | ++ |
| 0/352 | 1/624 | 1/782 | 0/9113 | Q10 | + |
| 0/134 | 1/652 | 1/923 | 0/8591 | Q11 | + |
| 0/177 | 1/697 | 1/877 | 0/9041 | Q12 | + |
| 0/193 | 1/74 | 1/886 | 0/9226 | Q13 | + |
| /179 | 1/718 | 1/855 | 0/9261 | Q14 | + |
| 0/11 | 1/66 | 1/859 | 0/893 | Q15 | + |

+ بیانگر توانایی تولید ACC به عنوان منبع نیتروژن است.

برداشت فعال یونها در پروتوپلاسم انباشته می‌سازند. لذا فشار آب داخل سلول در مقایسه با محلول خارجی منفی - تر باقی می‌ماند و سیستم‌های آنزیمی آنها به نحوی تکامل یافته‌اند که در شرایط سطوح بالای نمک در پروتوپلاسم انجام وظیفه می‌نمایند. در بعضی از گونه‌های باکتریایی که سطح نمک بالاتر است باکتری‌هایی با تحمل کمتر به شوری، از نظر سیستم‌های آنزیمی تطابق نداشته و برای تنظیم فشار اسمزی در پروتوپلاسم خود از محلول‌های آلی استفاده می‌کنند. باکتری‌های نمک دوست از طریق هدایت هیدرولیکی و از بین بردن آثار سمی یون سدیم در مقابل مقادیر بالای نمک مقاومت نشان داده و سبب بهبود حاصلخیزی خاک در مناطق شور و کاهش اثرات ناشی از تنش شوری در اطراف ریشه گیاه می‌شوند (مارگزین و شینر، 2001). شکل 2 جدایه‌های مورد بررسی را از لحاظ تحمل به نمک‌های مختلف را نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج آنالیز واریانس جدایه‌های مختلف از نظر میزان تحمل به غلظت‌های مختلف نمک با یکدیگر متفاوت بودند کلیه 15 جدایه در نمک‌های 100 و 200 میلی مولار رشد کردند اما در غلظت 400 میلی مولار نمک جدایه‌های Q1 و Q8 قادر به رشد و زنده‌مانی نبودند. همچنین نتایج نشان داد جدایه‌های Q12 و Q15 قادر به تحمل نمک در غلظت‌های تحت مطالعه با روند یکسانی بوده‌اند. جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش به دلیل رشد در غلظت‌های اشباع نمک و همچنین شرایط خاک‌هایی که باکتری‌ها از آن جداسازی شده‌اند را شاید بتوان به عنوان باکتری‌های هالوتولرانت یا هالوفیل قلمداد کرد. میرانصاری (2014) گزارش کرده‌اند که مکانیسم زیستی و سازگاری این باکتری‌ها به دلیل بالا بودن فشار اسمزی، تجمع املاح آلی در سیتوپلاسم و ایجاد تعادل اسمزی می‌باشد بدین صورت که مقدار نمک را بیشتر از آنچه که در محیط محلول خارجی وجود دارد از طریق



شکل 2- مقایسه جدایه‌های مختلف از نظر میزان تحمل به سطوح مختلف نمک

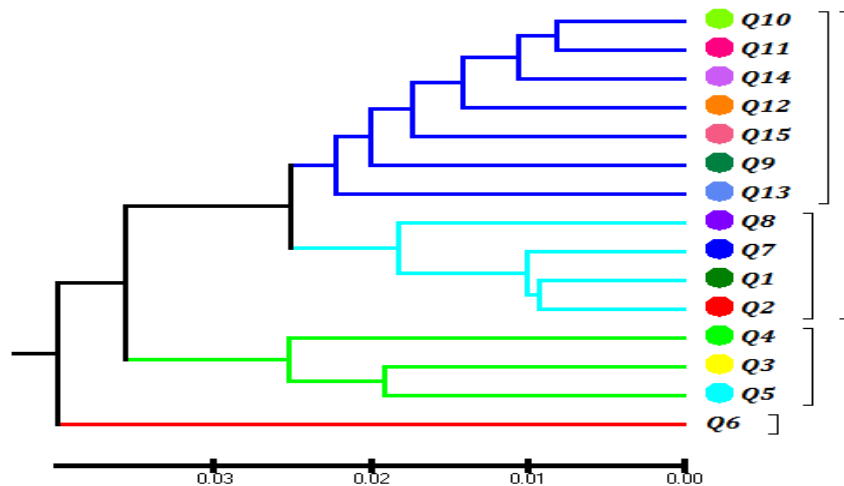
آنالیزهای بیوانفورماتیکی

بیوانفورماتیکی مانند NCBI Database Project, RDP و EZtaxon گونه و جنس مربوط به هر کدام از توالی‌های بررسی شد و به منظور پیدا کردن مشابه‌ترین توالی با توالی هر یک از جدایه‌ها با استفاده از روش هم‌ردیفی دوگانه با استفاده از برنامه Blast مقایسه هم‌ردیفی در رابطه با توالی‌های مذکور انجام شده و بر اساس نتایج به دست آمده مطابق با جدول 7 جدایه‌ها شناسایی شدند.

به منظور یکنواخت کردن توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از پرایمرهای Forward و Reverse از برنامه BioEdit v4.0 برای ایجاد کانتیگ استفاده گردید. سپس با استفاده از ابزار CAP contig assembly program موجود در نرم‌افزار، توالی‌های مورد نظر با یکدیگر ترکیب گردید و کانتیگ مورد نظر ساخته شد. در نهایت با استفاده از ابزارهای آنالیز و دیستابیس‌های

جدول 7- لیست جدایه‌ها بر اساس نتایج حاصل از BLAST در پایگاه‌های مختلف ژنتیکی (August 2018)

| کد ثبت در NCBI پایگاه | درصد تشابه | گونه شناسایی شده | جدایه |
|-----------------------|------------|--|-------|
| MH201181 | %99 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain F19 16S ribosomal RNA gene | Q1 |
| MH201182 | %98 | <i>Pseudomonas koreensis</i> strain JH1 16S ribosomal RNA gene | Q2 |
| MH201183 | %98 | <i>Pseudomonas putida</i> strain S6 16S ribosomal RNA gene | Q3 |
| MH201184 | %99 | <i>Pseudomonas putida</i> strain NBRC 14164 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Q4 |
| MH201185 | %99 | <i>Pseudomonas putida</i> strain CRN09 16S ribosomal RNA gene | Q5 |
| MH201198 | %98 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain RHH13 16S ribosomal RNA gene | Q6 |
| MH201199 | %98 | <i>Pseudomonas putida</i> strain PC16 16S ribosomal RNA gene | Q7 |
| MH201200 | %99 | <i>Pseudomonas</i> sp. UW4, complete genome | Q8 |
| MH201201 | %99 | <i>Pseudomonas syringae</i> strain yangyueP5 16S ribosomal RNA gene, | Q9 |
| MH201202 | %98 | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. neaurantiaca strain CIP 109457 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | Q10 |
| MH201206 | %99 | <i>Pseudomonas corrugata</i> strain 155-HR9 16S ribosomal RNA gene, | Q11 |
| MH201207 | %98 | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> strain R-15 16S ribosomal RNA gene, | Q12 |
| MH201208 | %99 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> strain LBUM770 16S ribosomal RNA gene, | Q13 |
| MH201209 | %99 | <i>Pseudomonas corrugata</i> strain 155-HR9 16S ribosomal RNA gene | Q14 |
| MH2012010 | %98 | <i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. neaurantiaca strain CIP 109457 16S ribosomal RNA gene, | Q15 |



شکل 3- درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش UPGMA و با استفاده از ژن 16S rRNA در جدایه‌ها

آنالیز فیلوژنتیکی توالی جدایه‌های مورد بررسی

برای درک روابط تکاملی ایزوله‌های مورد مطالعه و دسته‌بندی جدایه‌ها از توالی 16SrRNA به عنوان مارکر ژنتیکی برای خوشه‌بندی جدایه‌ها و نرم‌افزار MEGA جهت ترسیم درخت فیلوژنتیک استفاده شد در این روش کمترین فاصله ژنتیکی یک خوشه را تشکیل داده و سپس فاصله سایر واحدها از این خوشه به صورت میانگین بدست می‌آید و واحدی که کمترین فاصله را از خوشه حاصله دارد همراه با خوشه قبلی خوشه‌بندی می‌گردد.

نتایج حاصل از رسم درخت فیلوژنی موجب قرار دادن جدایه‌ها در سه دسته ژنتیکی جداگانه گردید که در هر دسته انشعابات اختصاصی و OTUهای¹ اختصاصی قرار می‌گیرد. دسته اول این توالی‌ها از حدفاصل Node اصلی به دو زیرگروه کوچک‌تر تقسیم شده است. در زیرگروه اول توالی‌های Q10, Q11, Q12, Q13, Q14, Q15 قرار گرفته‌اند. این مورد بیانگر این واقعیت است که این توالی‌ها از لحاظ ساختار توالی نوکلئوتیدی بسیار به همدیگر شبیه می‌باشند. در زیر گروه دوم دسته اول همانطوری که مشخص شده است توالی‌های Q7, Q8, Q1, Q2 قرار گرفته‌اند. همانطوری که در تفکیک اعضای این زیرشاخه مشخص شده است توالی‌های Q7, Q1, Q2 دارای شباهت بیشتری به یکدیگر هستند (در مقایسه با Q8). در دسته دوم نیز دو زیر گروه یافت می‌شود که در هر زیر گروه OTUهای اختصاصی بر اساس میزان شباهتی که نسبت به یکدیگر دارند قرار گرفته است. توالی‌های Q4, Q5, Q3 در این دسته قرار دارند و از لحاظ فیلوژنی و تشابه توالی دو OTU شامل

Q3 و Q5 دارای بیشترین شباهت به همدیگر هستند (در مقایسه با Q4). در دسته سوم نیز توالی Q6 به تنهایی قرار گرفته است که بیانگر تفاوت این توالی از سایر توالی‌ها می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از BLAST این جدایه *Pseudomonas aeruginosa* شناسایی شد با توجه به متمایز بودن جدایه Q6 در درخت فیلوژنی از سایر جدایه‌ها و با توجه به اینکه این گروه از سودوموناس‌ها جزو گروه‌های PGPR محسوب نمی‌شوند و همچنین با توجه به اینکه در درخت فیلوژنی ترسیم شده سایر جدایه‌ها نسبت به این جدایه سازماندهی شده‌اند و در محل ریشه از جدایه‌های Ingroup تفکیک شده است از این جدایه می‌توان به عنوان Outgroup نام برد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر تعدادی از جدایه‌ها به دلیل بالا بودن خصوصیات محرک رشدی از قبیل تولید اکسین، حل‌کنندگی فسفات، تولید سیدروفور و سایر ویژگی‌ها، در صورتی که در آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نیز از پتانسیل خوبی در کنترل تنش شوری و بهبود عملکرد برخوردار باشند می‌توانند به عنوان جدایه‌های مؤثر و کارآمد برای تهیه مایه تلقیح به منظور استفاده در کشت‌های گلخانه‌ای و در جهت افزایش تحمل گیاهان زراعی و باغی به تنش‌های محیطی و افزایش رشد و بهبود عملکرد مورد استفاده قرار گیرند. همچنین بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش برخی از جدایه‌های نیز می‌توانند به عنوان کاندیداهای مناسبی برای ادامه تحقیقات جهت انجام مطالعات کامل ژنومی و ژنومیکس مقایسه‌ای با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

¹ Operating Taxa Units

فهرست منابع:

1. احمدی نجف‌آبادی، م.، عسکری، ح.، سلطانی نجف‌آبادی، م. 1394. بررسی تأثیر سیانید هیدروژن در القای مقاومت به شوری در گیاه هالوفیت *Aeluropus litoralis*. نشریه مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، جلد 14(1): 55-66.
2. آذر می، ف.، مظفری، و.، عباس‌زاده دهجی، پ.، حمیدپور، م. 1393. جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنس از ریزوسفر درختان پسته و تعیین برخی خصوصیات محرک رشدی آنها. نشریه زیست‌شناسی خاک، جلد 2(32): 173-186.
3. رسولی صدقیانی، م.ح.، ملکوتی، م.ج.، خاوازی، ک.، قنادی مراغه، م. 1387. نقش سیدروفور سودوموناس‌های فلورسنت در جذب روی توسط گندم با استفاده از ایزوتوپ ⁶⁵Zn. مجله علوم و فنون هسته‌ای، جلد 43: 20-30.
4. سرچشمه، م.، ثوابی، غ.، صالح راستین، ن.، علیخانی، ح. پوربابایی، الف. 1388. جداسازی، غربالگری، شناسایی نسبی و تعیین تحمل به تنش شوری و خشکی جدایه‌های برتر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد (PGPR) درختان پسته. مجله تحقیقات آب و خاک ایران، جلد 40(2): 177-190.
5. شریفی، ر.، علیزاده، ح.، احمدزاده، م.، رسولی صدقیانی، م.ح. 1396. بررسی روش‌های مختلف ارزیابی تولید سیدروفور در سودوموناس‌های فلورسنت بومی ایران. فصلنامه علمی-پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها، جلد 21(6): 106-117.
6. کریمی، ز.، عباس‌زاده‌دهجی، پ.، اخگر، ع.، حمیدپور، م. 1396. جداسازی باکتری‌های محتمل به مس از یک خاک آلوده، شناسایی و بررسی خصوصیات محرک رشدی آنها. نشریه زیست‌شناسی خاک، جلد 5(2): 96-108.
7. Ahmad, F., Ahmad, I., KHAN, M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. Turkish Journal of Biology. 29(1): 29-34.
8. Alexander, D.B. and Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils. 12(1): 39-45.
9. Aziz, K., Nawaz, M., Nazir, J., Anjum, A., Yaqub, T., Ahmad, M., Rehman, M., Aziz, G. and Khan, M. 2015. Isolation, characterization and effect of auxin producing bacteria on growth of *Triticum aestivum*. Journal of Animal and Plant Sciences. 25(4): 1003-1007.
10. Barile, M.F. 2012. Gram staining technique, Methods in Mycoplasmaology VI: Mycoplasma Characterization. 1 (39): 12-23
11. Basharat, A. Anjum, N.S., Shahida, H. 2010. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology. 26(8): 1379-1384.
12. Bent, E., Tuzun, S. Chanway, C. P. Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology. 47(9): 793-800.
13. Brysk, M. M., Lauinger, C., & Ressler, C. (1969). Biosynthesis of cyanide from [2-¹⁴C¹⁵N] glycine in *Chromobacterium violaceum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 184(3), 583-588.
14. Chance, A. and Maehly, N. 1955 Assay of catalases and peroxidases. Methods of Biochemical Analysis. 1:357-424.
15. Clawson, B. J., & Young, C. C. (1913). Preliminary report on the production of hydrocyanic acid by bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 15(3), 419-422.
16. Couillerot, O.C., Prigent-Combaret, J., Caballero-Mellado, and Y. Moënne-Loccoz. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonads as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. Letters in applied microbiology. 48(5): 505-512.

17. De-Bashan L, Hernandez J, Bashan Y, 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation., *Applied Soil Ecology*, 61, 171-89
18. 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(1-2): 261-272.
19. El Zemrany, H., Cortet, J., Lutz, M.P., Chabert, A., Baudoin, E., and Haurat, J . 2006. Field survival of the phytostimulator *Azospirillum lipoferum* CRT1 and functional impact on maize crop, biodegradation of crop residues, and soil faunal indicators in a context of decreasing nitrogen fertilisation. *Soil biology and biochemistry*. 38: 1712–1726
20. Erdogan, U., Turan, M., Ates, F., Kotan, R., Çakmakçi, R., Erdogan, Y., ... & Tüfenkçi, S. (2018). Effects of Root Plant Growth Promoting Rhizobacteria Inoculations on the Growth and Nutrient Content of Grapevine. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1-8.
21. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 109–117.
22. Glick, B.R., Cheng, Z., Czarny, J., Duan, J .2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase containing soil bacteria. *European journal of plant pathobiology*. 119:329–339
23. Gregersen T. 1978. Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria., *European journal of applied microbiology and biotechnology*. 5: 2.123-7
24. Halder, A.K. and P. K. Chakrabarty. 1993. Solubilization of inorganic phosphate by *Rhizobium*. *Folia microbiologica*. 38(4): 325-330.
25. Jing, Y.S.J. and Gang, W.A.N.G., 2006. Effects of Salt Stress on Plants and the Mechanism of Salt Tolerance. *World Sci-tech R & D*. 4: 11-22.
26. Karakurt, H., Kotan, R., DADAŞOĞLU, F., ASLANTAŞ, R., & ŞAHİN, F. (2011). Effects of plant growth promoting rhizobacteria on fruit set, pomological and chemical characteristics, color values, and vegetative growth of sour cherry (*Prunus cerasus* cv. Kütahya). *Turkish Journal of Biology*, 35(3), 283-291.
27. Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M., & Sahin, F. (2007). Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae*, 114(1), 16-20.
28. Kitiir, N., Gunes, A., Turan, M., Yildirim, E., Topcuoglu, B., Turker, M., ... & Fırıldak, G. (2018). Bio-Boron Fertilizer Applications Affect Amino Acid and Organic Acid Content and Physiological Properties of Strawberry Plant. *Erwerbs-Obstbau*, 1-9.
29. Lane, D. J.1991. 16S/23S rRNA sequencing. In ‘Nucleic acid techniques in bacterial systematics’. (Eds E Stackebrandt, M Goodfellow). 115–175.
30. Lebeis, S.L. 2014. The potential for give and take in plant–microbiome relationships. *Frontiers in plant science*. 5: 287-289
31. Margesin, R. and Schinner, F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5(2): 73-83.
32. Miransari, M. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Nutrition*. 37(14): 2227-2235
33. Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase - containing plant growth - promoting rhizobacteria. *Physiologia plantarum*, 118 (1), 10-15.
34. Peyvandi, M., Farahani, F., Mazinani, M. H., Noormohamadi, Z., Ataii, S., & Asgharzade, A. (2012). *Pseudomonas* fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. *International Journal of Plant Production*, 4(1), 63-66.
35. Pirrung, M. and Brauman, J. 1987. Involvement of cyanide in the regulation of ethylene biosynthesis. *Plant physiology and biochemistry*. 25(1): 55-61.

36. Richardson, A.E. and Simpson, R.J. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus. *Plant physiology*. 156(3): 989-996.
37. Sharma, S., Kumar, V., Tripathi, R. B. 2017. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of microbiology and Biotechnology Research*. 1(2): 90-95.
38. Tarrand, J. Gröschel, D. 1982. Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology* 16(4):772-4:
39. Thornley, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology*. 23: 37 52.
40. Turner, S., Pryer, K.M., Miao, V.P., and Palmer, J.D. 1999. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 46(4): 327-338.
41. Veresoglou S.D. and Menexes G. 2010. Impact of inoculation with *Azospirillum* spp. on growth properties and seed yield of wheat: a meta-analysis of studies in the ISI Web of Science from 1981 to 2008. *Plant Soil*. 337: 469–480
42. Walker, V., Couillerot, O., Von Felten, A., Bellvert, F., Jansa, J., and Maurhofer, M. 2012. Variation of secondary metabolite levels in maize seedling roots induced by inoculation with *Azospirillum*, *Pseudomonas* and *Glomus* consortium under field conditions. *Plant Soil*. 356: 151–163.

Characterization of *Pseudomonas fluorescens* bacteria isolated from *Olea europaea* rhizosphere in Saline Soils

K. saghafi, J. Ahmadi¹, A. Asgharzadeh, H. Roknizadeh, and S. M. Hosseini Mazinani²

Ph.D Student, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran;

E-mail: kobra_saghafi@yahoo.com

Professor. Dept. of Genetic and plant breeding Imam Khomeini International University; Qazvin, Iran;

E-mail: j.ahmadi@eng.ikiu.ac.ir

Associate Professor. Soil and Water Research Institute Agricultural Research, Education and

Extension Organization, Karaj, Iran; E-mail: a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

Assistant Professor. Dept. of medical Zanjan University of Medical Sciences; Zanjan, Iran,

E-mail: hassan.roknizadeh@gmail.com

Professor. Dept. of plant Molecular Genetic National Institute of Genetic Engineering and

Biotechnology, Tehran, Iran; E-mail: hosseini@nigeb.ac.ir

Received: August, 2018 & Accepted: March, 2019

Abstract

Pseudomonas bacteria are the most important plant growth promoting rhizobacteria due to their widespread distribution in soil, their potential to colonize many plant roots and possessing different plant growth promoting characteristics. The present study aimed to identify isolates of *Pseudomonas fluorescens* strains of olive tree rhizosphere in saline gardens of Qazvin province. Plant growth promoting characteristics of fifteen isolates of *Pseudomonas fluorescens* strains such as siderophore, auxin, hydrogen cyanide, ACC deaminase enzyme production, phosphorus solubility in liquid medium, pH changes and salt tolerance (NaCl, MgCl₂ and CaCl₂) (100, 200, 400 mM) were evaluated. Results showed that the dominant strains in producing ACC deaminase were Q7 and Q9, respectively. The Q2 strain was the best one to enhance the production of auxin (11.96 µg.ml⁻¹). The solubility of phosphorus in conjunction with pH showed a negative correlation and the highest amount of dissolved phosphorus was related to Q13 (251) isolate. Also, the half of strains (40%) was not able to produce HCN. Commonly, all studied strains were able to produce siderophore after two, four and six days of incubation. Except Q1 and Q8, other strains were able to grow in the considered salt concentrations. Based on the results, we concluded that some of these strains can be targeted for genomics studies to improve salt stress resistance in plants and orchards under saline soils conditions.

Keywords: ACC deaminase, Auxin, Olive, Siderophore, molecular detection, phylogeny tree

¹ Corresponding author: Imam khomeini international university, Qazvin

² Corresponding author: National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology