نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۶، ص. ۱۷۲۳-۱۷۱۲

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 6, Jan.-Feb. 2018, p. 1712-1723

شناسایی مولکولی و تعیین خصوصیات محرک رشدی سویه‌های باکتری جدا شده از ریزوسفر گندم

ویدا همتی[۱]- هادی اسدی رحمانی[۲*]- شکوفه رضایی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۵/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۷

چکیده

باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق مکانیسم های مختلف مانند حل‌کنندگی فسفات، تولید اکسین و سیدروفور باعث افزایش عملکرد گیاهان زراعی می‌شوند. در این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های ریزوسفر گندم انجام شد و برخی از خصوصیات محرک رشدی از قبیل تولید اکسین، سیدروفور و حل‌کنندگی فسفات معدنی مورد اندازه گیری قرار گرفت. برای غربالگری ژنتیکی ۲۰ جدایه مورد بررسی از روش آنالیز محدودگر دی‌ان‌ای ریبوزومی تکثیری یا ARDRA استفاده شد. بدین منظور پس از انجام PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA، از آنزیم‌های برشی HpaII و RsaI برای هضم ناحیه ژنی 16S rDNA استفاده شد. نتایج غربالگری ژنتیکی نشان داد پس از هضم ناحیه تکثیر شده با آنزیم های برشی تنوع قابل ملاحظه ای مشتمل بر هفت الگوی برشی قابل مشاهده است. گونه‌های *Chryseobacterium ginsenosidimutans*، *C. lathyri*، *C. piperi*، *C. taiwanense*، *Novosphingobium aromaticivorans*، *Pedobacter duraquae* و *Sphingomonas koreensis* شناسایی شدند. نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید اکسین بودند که بیشترین اکسین تولید شده (۲۵/۹۳ میلی‌گرم در لیتر) مربوط به جدایه F1 بود. همچنین تنها سه جدایه F3، F45 و F46 توانایی تولید سیدروفور در محیط CAS آگار را دارا بودند. در مورد توان حل‌کنندگی فسفات معدنی، نتایج نشان داد که تنها دو جدایه توانایی حل‌کنندگی فسفات را داشتند که در این میان جدایه F6 (۴/۱۶ قطر هاله به کلنی) بیشترین توان حل‌کنندگی را داشت.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باکتری‌های محرک رشد گیاه، سیدروفور

مقدمه [۱]

گندم یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در تولید فرآورده‌های غذایی محسوب می‌شود. کشت گندم بدلیل افزایش روز افزون جمعیت و مصرف سرانه بالای نان محور اصلی سیستم‌های زراعی در دنیا ارزیابی گردیده است. در کشاورزی نوین با توجه به افزایش جمعیت انسانی و در پی بحران‌های آلودگی محیط زیستی بدلیل استفاده از سموم و کودهای شیمیایی، اتخاذ راهکارهای مناسب که چنین خطراتی را نداشته باشند، ضروری است که یکی از این راهکارها مصرف کودهای زیستی در سیستم های زراعی است (۳۳). کاربرد باکتری‌هایی که در ریزوسفر گیاهان زراعی ساکن بوده و دارای تأثیرات مثبتی بر رشد و عملکرد گیاهان می‌باشند در بیشتر گزارشات مورد اشاره قرار گرفته است. این باکتری‌ها که با عنوان محرک رشد گیاه (PGPR) نامیده می‌شوند شامل گونه‌های متعددی از باکتری‌های متعلق به جنس‌هایی مانند *Azotobacter*، *Azospirillum*، *Bacillus*، *Herbaspirillum* و *Pseudomonas* می‌باشند. هر چند مطالعات نشان داده است که باکتری‌های ریزوسفری تنوع زیادی داشته و هر روزه جنس‌های جدیدی به این گروه اضافه می‌گردد (۲۳). این باکتری‌ها دارای جمعیت بیشتری در ناحیه ریزوسفری می‌باشند که به‌واسطه تجمع انواع ترکیبات آلی آزاد شده از ریشه‌ها است که غنی از عناصر و مواد غذایی مورد نیاز باکتری‌هاست (۳۴).

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد از طریق مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم اثرات مفیدی را بر روی گیاه اعمال می‌کنند (۲۵). در روش مستقیم، باکتری‌های محرک رشد به طور مستقیم و با استفاده از روش‌های مختلف باعث بهبود و افزایش رشد گیاه می‌شوند. تولید و ترشح تنظیم کننده‌های رشد مثل اکسین، سیتوکنین و جیبرلین، انحلال فسفات‌های معدنی و یا آلی نامحلول، تثبیت نیتروژن

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج
۲- دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
(*- نویسنده مسئول: Email: asadi_1999@yahoo.com)
DOI: 10.22067/jsw.v31i6.65753

اتمسفری و تولید آنزیم‌های مثل آنزیم (ACC) – دی‌آمیناز از جمله مکانیسم‌های مستقیم می‌باشند (۱۸ و ۲۴). توانایی تولید اکسین در باکتری‌هایی از قبیل *Alcaligenes*، *Azotobacter*، *Azospirillum*، *Entrobacter*، *Flavobacterium*، *Pseudomonas*، *Rhizobium* و *Xanthomonas* به اثبات رسیده است (۵ و ۲۸). در روش غیرمستقیم، این باکتری‌ها با استفاده از مواد بازدارنده از قبیل آنزیم‌ها و یا ترکیباتی مانند سیانید هیدروژن و یا از طریق افزایش مقاومت طبیعی گیاه میزبان موجب کاهش و یا توقف کامل بیمارگرهای گیاه میزبان می‌شوند. گزارش شده است که باکتری *Pseudomonas stutzeri* با تولید آنزیم کیتیناز سبب لیز شدن هیف‌های قارچ *Fusarium solani* گردیده است (۷ و ۱۰).

باکتری‌های افزاینده رشد با کمک به جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه، باعث بهبود جوانه‌زنی و کمک به گیاه برای رشد در شرایط تنش‌های محیطی می‌شوند (۳۵). شائوکات و همکاران (۳۱) گزارش کردند که جدایه‌های *Azospirillum*، *Azotobacter* و *Pseudomonas* تأثیر مثبت و معنی‌داری بر روی جوانه‌زنی و رشد گیاه‌چه ذرت نشان دادند. همچنین سیدشریفی و خاوازی (۳۰) گزارش کردند که تلقیح بذر ذرت هیبرید SC-434 با باکتری *Azospirillum* باعث تسریع در رشد گیاه‌چه و مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذر ذرت می‌شود.

هدف از این مطالعه شناسایی جدایه‌های باکتریایی و غربالگری مولکولی آنها با استفاده از روش آنالیز محدودگر دی‌ان‌ای ریبوزمی تکثیری یا ARDRA، بررسی صفات محرک رشد یعنی قابلیت تولید اکسین، سیدروفور و حل کنندگی فسفات این جدایه‌ها، و در نهایت بررسی تأثیر آنها بر صفات مربوط به جوانه‌زنی بذر گندم بود.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد استفاده

در این تحقیق ۲۰ جدایه باکتری که طی مطالعات گذشته از خاک‌های ریزوسفر گندم از استان‌های تهران، قزوین، زنجان، آذربایجان شرقی و غربی، کردستان و همدان جداسازی شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند (۴). برای خالص‌سازی و نگهداری، یک کلنی از هر جدایه در محیط نوترینت آگار (Nutrient Agar (NA کشت داده و گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت دو الی چهار روز انجام گرفت تا باکتری‌ها به میزان کافی رشد کنند، بعد از آن در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باکتری‌ها مورد رنگ‌آمیزی گرم قرار گرفته و از نظر شکل ظاهری مورد مطالعه قرار گرفتند. در این تحقیق از دو باکتری شناسایی شده موجود در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب شامل *Pseudomonas fluorescens* strain R169 و *Azospirillum lipoferum* strain OF به عنوان شاهد استفاده گردید.

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی

جهت استخراج DNA ژنومی از جدایه‌های مورد بررسی از روش مبتنی بر CTAB استفاده شد (۱۴). برای تکثیر ناحیه 16S rDNA از ترکیب آغازگرهای 27F (5′- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3′) و 1492R (5′- TACGGTTACCTTGTTACGACTT -3′) به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد (۲۱). فرآیند تکثیر PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکر (Techne, Genius FGEN02TP, USA) صورت گرفت. در این واکنش از پنج میکرولیتر بافر تکثیر PCR، سه میکرولیتر نمونه حاوی DNA، ۱/۵ واحد DNA Taq polymerase، ۰/۴ میلی‌مولار dNTP، دو میلی مولار $MgCl_2$ و ۰/۴ میکرومولار آغازگرها و آب دیونیزه سترون تا حجم ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید. در این واکنش واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴ دقیقه و برنامه حرارتی شامل ۳۰ چرخه واسرشته‌سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، توسعه DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ثانیه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه استفاده گردید.

آنالیز محدودگر DNA ریبوزمی تکثیری

برای غربالگری ژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی از روش آنالیز محدودگر DNA ریبوزمی تکثیری[1] یا ARDRA استفاده شد. بدین منظور پس از PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F و 1492R برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA، از آنزیم‌های برشی HpaII و RsaI برای هضم ناحیه ژنی 16S rDNA استفاده شد. در این واکنش از ۵ میکرولیتر بافر، ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۱/۵ واحد آنزیم برشی و آب دیونیزه سترون تا حجم ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید و سپس دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا عمل برش ناحیه ژنی انجام شود. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای غیرفعال کردن آنزیم قرار داده شد و در نهایت چندشکلی ایجاد شده ناشی از برش با آنزیم‌های محدودگر و طول قطعات برش خورده بر روی ژل الکتروفورز دو درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

از بین جدایه‌هایی که الگوی برشی مشابهی توسط آنزیم‌های برشی داشتند، یکی انتخاب گردید و محصول تکثیر شده مربوط به ناحیه 16S rDNA جهت خالص‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی از طریق شرکت تکاپوزیست تهران به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت توالی‌های نوکلئوتیدی، جهت رؤیت آن‌ها و

1- Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ایجاد ناحیه کانتیگ از نرم‌افزار Vector NTI نسخه ۱۰ استفاده شد. توالی‌های اصلاح شده با فرمت FASTA ذخیره شدند و هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (۳) با توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI و EzTaxon مقایسه شدند.

ارزیابی قابلیت تولید سیدروفور

آزمون تولید سیدروفور با استفاده از محیط CAS Blue Agar انجام شد (۲). برای تهیه این محیط چهار محلول شامل محلول معرف Fe-Cas، محلول بافر PIPES، محلول غذایی و محلول کازآمینواسید به طور مجزا تهیه، سترون و سپس با هم مخلوط شدند. پلیت‌های شامل CAS Agar پس از انجماد با تیغ استریل به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند و از سوسپانسیون تازه جدایه‌ها با جمعیت (۴×۱۰^{۸} CFU/ml) به اندازه پنج میکرولیتر در وسط هر قسمت به روش قطره‌گذاری تلقیح شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری‌ها ارزیابی گردید. هم چنین قطر کلنی باکتری و نسبت قطر هاله به قطر کلنی نیز اندازه‌گیری و محاسبه شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی قابلیت تولید اکسین

به منظور بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت(Tryptic Soy Broth (TSB کشت داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل گردید. بعد از ۴۸ ساعت سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۵ دقیقه و با نیروی ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با دو میلی‌لیتر معرف سالکوسکی مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفوتومتر میزان جذب نور آن در ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید (۸). مقدار تولید اکسین هر جدایه با مقایسه مقدار جذب نور آن با منحنی تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه شد.

ارزیابی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی

به منظور بررسی توان حل‌کنندگی فسفات معدنی، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت(Tryptic Soy Broth (TSB کشت داده شدند و از سوسپانسیون جدایه‌ها به اندازه دو میکرولیتر روی محیط کشت اسپربر به روش قطره‌گذاری تلقیح شدند. سپس تشتک پتری به مدت ۵ روز در انکوباتور با دمای ۲± ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت. ظهور هاله شفاف در پیرامون کلنی باکتری به عنوان نشانه حل‌کنندگی فسفات در نظر گرفته شد. برای ارزیابی نسبی انحلال فسفات، نسبت قطر کل (هاله + کلونی) بر قطر کلونی محاسبه گردید (۲۹). محیط کشت اسپربر شامل ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۱ گرم در لیتر $CaCl_2$، ۰/۲۵ گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$، ۲/۵ گرم در لیتر $Ca_3(PO_4)_2$ و ۱۰ گرم در لیتر آگار می‌باشد که با pH حدود ۷/۲ تنظیم می‌شود.

تأثیر جدایه‌های باکتریایی بر صفات مربوط به جوانه‌زنی

برای بررسی تأثیر جدایه‌هایی باکتریایی، صفات مربوط به جوانه زنی شامل وزن تر و خشک ریشه و گیاهچه، طول ریشه‌چه و ساقه-چه، درصد، سرعت و متوسط سرعت جوانه‌زنی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

بذر گندم رقم چمران از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. به منظور ضدعفونی، بذرها بمدت ۴۵ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفتند و بلا فاصله چندین بار با آب مقطر سترون شسته شدند. به منظور اجرای تیمار تلقیح باکتریایی، باکتری‌ها تا فاز لگاریتمی تکثیر گردیدند و جمعیت باکتری ها در حدود $۹/۸\times۱۰^{۷}$ CFU/ml تنظیم شد. بذرهای استریل به فلاسک‌های حاوی مایه تلقیح باکتری‌ها منتقل شده و بمدت ۳۰ دقیقه برروی شیکر دورانی قرار گرفتند. در مرحله بعد تعداد ۱۰۰ عدد بذر در داخل پتری‌دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی در سه تکرار قرار داده شد. سپس درب پتری‌دیش‌ها با پارافیلم بسته شده و درون انکوباتور با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. هر روز بذرها از نظر جوانه‌زنی مورد بررسی قرار گرفتند. تا پایان روز هفتم تعداد ۱۰ بذر از تکرارها برداشت شد و صفات مربوط به جوانه‌زنی شامل وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک گیاهچه، طول ریشه چه و ساقه‌چه، درصد، سرعت و متوسط سرعت جوانه‌زنی مورد اندازه گیری قرار گرفت (۱۶ و ۱۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی انجام گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و برای انجام مقایسه میانگین داده‌ها از روش آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید.

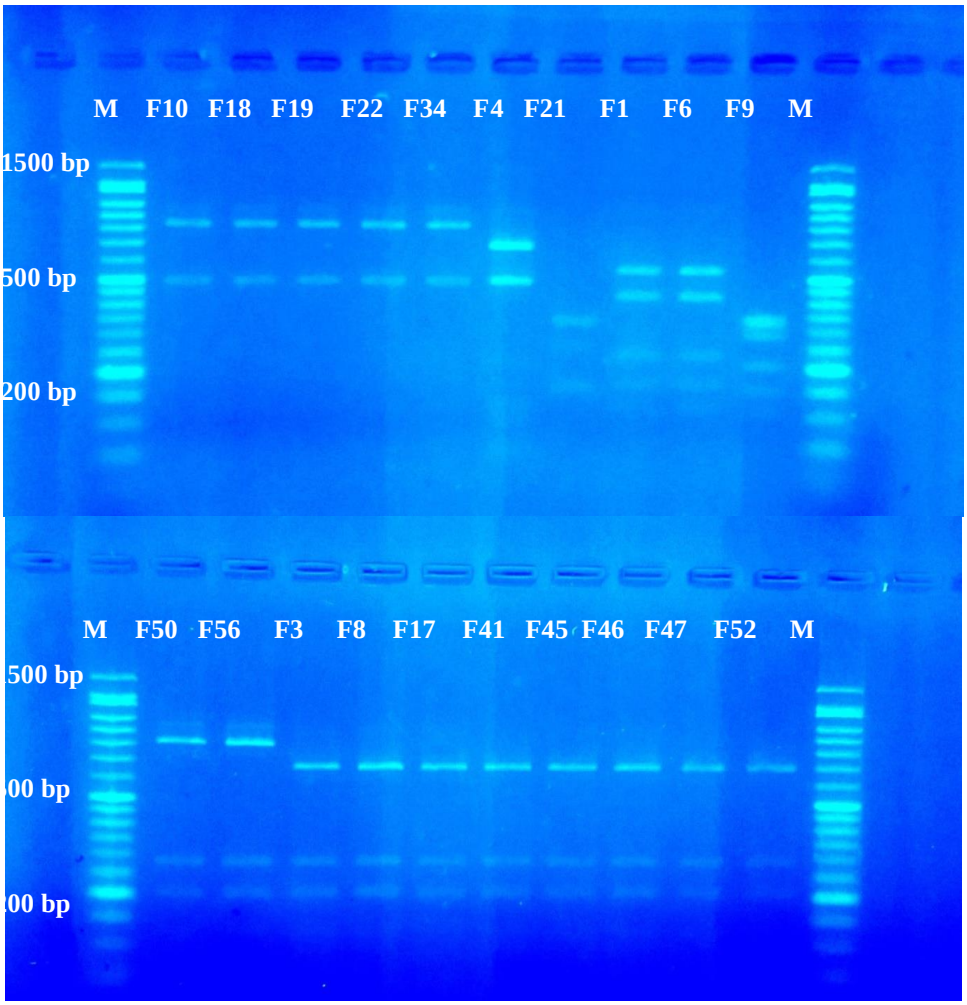
نتایج و بحث

استخراج DNA به روش CTAB به عنوان روش مطلوب و مناسب جهت استخراج DNA ۲۰ جدایه بدست آمده ارزیابی شد. تکثیر ناحیه 16S rDNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، تکثیر بخشی از ژنوم به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز را در کلیه جدایه‌های مورد بررسی نشان داد. پس از هضم ناحیه تکثیر شده 16S rDNA با آنزیم‌های برشی HpaII (شکل ۱) و RsaI (شکل ۲)، هفت الگوی

برشی مشاهده گردید که از هر کدام یک نمونه برای توالی‌یابی فرستاده شد. گونه‌های *Chryseobacterium ginsenosidimutans*، *C. lathyri*، *C. piperi*، *C. taiwanense*، *Novosphingobium aromaticivorans*، *Pedobacter duraquae* و *Sphingomonas koreensis* شناسایی شدند (جدول ۱).

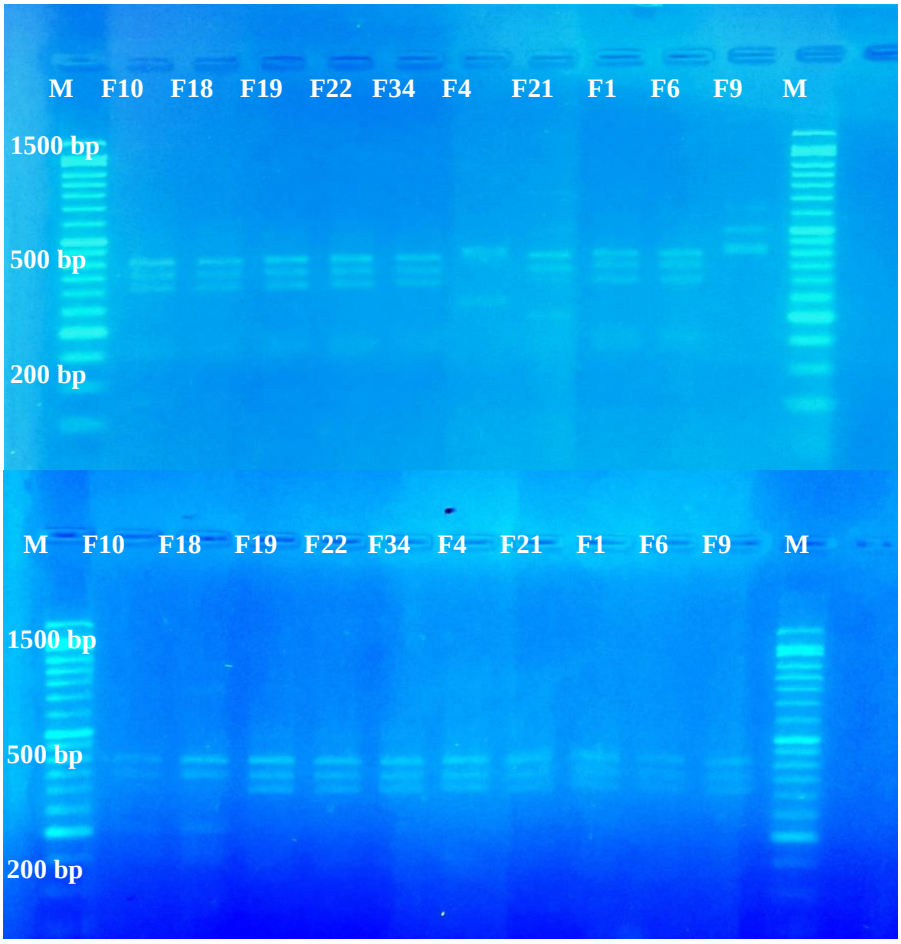
تولید سیدروفور

در این آزمایش، نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری توان تولید سیدروفور نشان داد که تنها سه جدایه (F3، F45، F46) توانایی تولید سیدروفور را داشتند که در این میان جدایه F46 (با میانگین ۲/۸۶ قطر هاله به کلنی) بیشترین توانایی تولید را دارا بود (شکل ۳). چن و همکاران (۱۲) نشان دادند که سیدروفور تولید شده توسط باکتری *Pseudomonas putida* حلالیت آهن، مس، منگنز و روی را افزایش داد.



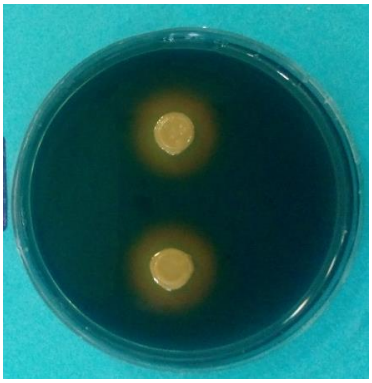
شکل ۱- 16S rDNA-RFLP. قطعه حاصل از PCR ناحیه 16S rDNA (1500bp) با آنزیم محدودگر Hpa II برش داده شده است. جدایه‌های F10، F18، F19، F22 و F34: *Chryseobacterium ginsenosidimutans*، جدایه F4: *Sphingomonas koreensis*، جدایه F21: *Chryseobacterium taiwanense*، جدایه‌های F1 و F6: *Pedobacter duraquae* ، جدایه F9: *Novosphingobium aromaticivorans*، جدایه های F50 و F56: *Chryseobacterium piperi* و جدایه‌های F3، F8، F9، F17، F41، F45، F46، F47 و F52: *Chryseobacterium lathyri*. M: سایز مارکر 100bp

Figure 1- 16S rDNA-RFLP. The amplified 16S rDNA PCR fragment (1500bp) was digested by HpaII restriction enzyme. F10, F18, F19, F22 and F34: *Chryseobacterium ginsenosidimutans*. F4: *Sphingomonas koreensis*. F21: *Chryseobacterium taiwanense*. F1, F6: *Pedobacter duraquae*. F9: *Novosphingobium aromaticivorans*. F50 and F56: *Chryseobacterium piperi*. F3, F8, F9, F17, F41, F45, F46, F47 and F52: *Chryseobacterium lathyri*. M: DNA ladder 100bp



شکل ۲- 16S rDNA-RFLP. قطعه حدود 1500bp حاصل از PCR ناحیه 16S rDNA با آنزیم محدودگر RsaI برش داده شده است. جدایه‌های F10، F18، F19، F22 و F34: *Chryseobacterium ginsenosidimutans*، جدایه F4: *Sphingomonas koreensis*، جدایه F21: *Chryseobacterium taiwanense*، جدایه‌های F1 و F6: *Pedobacter duraquae*، جدایه F9: *Novosphingobium aromaticivorans*، جدایه های F50 و F56: *Chryseobacterium piperi* و جدایه‌های F3، F8، F9، F17، F41، F45، F46، F47 و F52: *Chryseobacterium lathyri*، M: سایز مارکر 100bp.

Figure 2- 16S rDNA-RFLP. The amplified 16S rDNA PCR fragment (1500bp) was digested by RsaI restriction enzyme. F10, F18, F19, F22 and F34: *Chryseobacterium ginsenosidimutans*. F4: *Sphingomonas koreensis*. F21: *Chryseobacterium taiwanense*. F1, F6: *Pedobacter duraquae.* F9: *Novosphingobium aromaticivorans*. F50 and F56: *Chryseobacterium piperi.* F3, F8, F9, F17, F41, F45, F46, F47 and F52: *Chryseobacterium lathyri*. M: DNA ladder 100bp



شکل ۳- تولید سیدروفور در جدایه F46

Figure 3- Siderophore productions by F46

جدول ۱- باکتری‌های شناسایی شده ریزوسفر گندم

Table 1- Identification of bacteria from the wheat rhizosphere

جدایه باکتری Bacterial isolates	شکل کلونی Whole colony	حاشیه Edge	ارتفاع Elevation	واکنش گرم Gram	رنگ Color	نام باکتری Bacterial name	شماره دخیره GenBank accession No.	مشابهت Similariy
F1	Circular	Entire	Flat	−	Cream-Yellow	*Pedobacter duraquae*	KU924006	٪99
F3	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*	KU923998	٪99
F4	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Sphingomonas koreensis*	KU924008	٪99
F6	Circular	Entire	Flat	−	Cream-Yellow	*Pedobacter duraquae*		
F8	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*		
F9	Circular	Entire	Convex	−	Orange-Yellow	*Novosphingobium aromaticivorans*	KU924009	٪99
F10	Circular	Entire	Convex	−	Orange	*Chryseobacterium ginsenosidimutans*	KU924004	٪99
F17	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*		
F18	Circular	Entire	Convex	−	Orange	*Chryseobacterium ginsenosidimutans*		
F19	Circular	Entire	Convex	−	Orange	*Chryseobacterium ginsenosidimutans*		
F21	Circular	Entire	Convex	−	Orange	*Chryseobacterium taiwanense*	KU924003	٪99
F22	Circular	Entire	Convex	−	Orange	*Chryseobacterium ginsenosidimutans*		
F34	Circular	Entire	Convex	−	Orange	*Chryseobacterium ginsenosidimutans*		
F41	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*		
F45	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*		
F46	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*		
F47	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*		
F50	Circular	Entire	Flat	−	Orange	*Chryseobacterium piperi*	KU924005	٪99
F52	Circular	Entire	Flat	−	Yellow	*Chryseobacterium lathyri*		
F56	Circular	Entire	Flat	−	Orange	*Chryseobacterium piperi*		

توان تولید اکسین

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر جدایه‌های مختلف ریزوسفر گندم بر میزان توان تولید اکسین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان توان تولید اکسین با میانگین ۲۵/۹۳ میلی‌گرم در لیتر توسط جدایه F1 تولید گردید و کمترین آن از جدایه F18 به‌دست آمد (جدول ۲). در بررسی انجام شده توسط بنت و همکاران (۸) مشخص شد که جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* توانایی تولید مقادیر اکسین را در حضور غلظت‌های مختلف تریپتوفان و عدم حضور آن داشتند. در پژوهش‌های انجام شده روی ۲۵ جدایه *Pseudomonas fluorescens* مشخص گردید که متوسط میزان تولید اکسین ۲/۴۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود و

تمامی جدایه‌ها قابلیت تولید اکسین را داشتند و دامنه آن از ۱/۳ تا ۴/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در بین جدایه‌ها متغیر بود (۳۲).

احمد و همکاران (۱) نشان دادند که جدایه‌های *Pseudomonas* در دامنه ۵/۳۴ تا ۵۳/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر قابلیت تولید اکسین را دارا می‌باشند. نتایج خاکی‌پور و همکاران (۲۲) نشان داد که مقدار اکسین تولیدی در سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* از ۰ تا ۳۱/۶ و توسط *Pseudomonas putida* از ۰ تا ۲۴/۰۸ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود.

حل کنندگی فسفات معدنی

نتایج به‌دست آمده از سنجش توان حل‌کنندگی فسفات باکتری‌ها نشان داد که تنها دو جدایه F6 (با میانگین ۴/۱۶ قطر هاله به کلنی) و F56 (با میانگین ۲/۵ قطر هاله به کلنی) دارای توانایی حل‌کنندگی فسفات بوده، اما سایر جدایه‌ها فاقد این ویژگی بودند (شکل ۴). نتایج نوری و سعود (۲۷) و مقامی و همکاران (۲۶) نشان داد که تمامی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* مورد مطالعه قادر به انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط جامد بودند.

شکل ٤- حل کنندگی فسفات معدنی و ایجاد هاله توسط جدایه F6
Figure 4- Phosphate solubilization and halo zone production by F6

تأثیر جدایه‌های باکتریایی بر صفات مربوط به جوانه‌زنی

بررسی نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های این تحقیق نشان داد که اثر جدایه‌های بومی ریزوسفر گندم بر صفات جوانه‌زنی گندم نظیر وزن تر و خشک ریشه، وزن تر گیاهچه، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، درصد، سرعت و متوسط سرعت جوانه‌زنی در سطح احتمال یک درصد و وزن خشک گیاهچه در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده‌اند). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر گیاهچه در جدایه F19 (با میانگین ۰/۴۴ گرم) به‌دست آمد که با جدایه F22 از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نداشت. همچنین کمترین وزن تر گیاهچه نیز درجدایه F41 و تیمار بدون تلقیح (با میانگین ۰/۱۰۸) مشاهده شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن خشک گیاهچه در جدایه F18 (با میانگین ۰/۰۳۳۶ گرم) به‌دست آمد (جدول ۲). بیشترین وزن تر ریشه در جدایه F18 (۰/۷۷۱ گرم) و بیشترین وزن خشک ریشه در شاهد مثبت OF (۰/۱۹۴ گرم) به‌دست آمد (جدول ۲).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین طول ساقه‌چه از جدایه F45 با میانگین ۷/۰۴ سانتی‌متر به‌دست آمد. همچنین کمترین طول ساقه‌چه نیز در تیمار بدون تلقیح با میانگین ۳/۵۸ سانتی‌متر حاصل شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین طول ریشه‌چه از جدایه شاهد مثبت R169 با میانگین ۶/۴۲ سانتی‌متر به‌دست آمد (جدول ۲). از آنجایی که باکتری‌های محرک رشد سبب افزایش طول و سطح ریشه‌چه می‌شوند، در نتیجه بدلیل دسترسی بیشتر به آب و عناصر غذایی، رشد گیاه افزایش می‌یابد (۶). جاراک و همکاران (۲۰) نشان دادند که تلقیح گیاه ذرت با باکتری‌های *Pseudomonas* sp. Q4b، *Bacillus* sp. Q5a و *Azotobacter chroococcum* strain 8 باعث افزایش معنی‌دار عملکرد گیاه می‌گردد. بذرهای ذرت تلقیح یافته با باکتری *Azospirillum* از افزایش در طول ریشه‌چه، ساقه‌چه و نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه بیشتری نسبت به عدم تلقیح برخوردار بود (۳۰).

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین درصد جوانه‌زنی در جدایه شاهد مثبت OF با میانگین ۳۳/۳۳ درصد و بعد از آن در جدایه‌های F19 و F41 با میانگین ۳۳ حاصل شد. کمترین درصد جوانه‌زنی نیز در جدایه F3 با میانگین ۲۷/۳۳ درصد مشاهده شد (جدول ۲). غلامی و همکاران (۱۷) نشان دادند تلقیح بذر ذرت با باکتری‌های محرک رشد باعث بهبود درصد جوانه‌زنی و رشد گیاهچه ذرت می‌شود. المیلیجی (۱۵) گزارش کرد پوشش‌دار کردن بذر ذرت با جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens*، باعث بهبود میزان ظهور و درصد جوانه‌زنی گیاهچه‌ها در مزرعه شد.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین سرعت جوانه‌زنی از جدایه F45 (با میانگین ۵۳/۹۹ روز بر تعداد) به‌دست آمد. همچنین کمترین سرعت جوانه‌زنی در جدایه F9 با میانگین ۳۲/۷ روز بر تعداد حاصل شد (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین متوسط سرعت جوانه‌زنی از جدایه شاهد مثبت OF با میانگین ۳/۸۵ روز بر تعداد به‌دست آمد. همچنین کمترین این صفت نیز در جدایه F9 با میانگین ۲/۷۰ روز بر تعداد حاصل شد (جدول ۲).

نتایج کاکماکسی و همکاران (۱۱) نشان داد که با تلقیح بذرهای جو با باکتری‌های محرک رشد گیاه، افزایش وزن ریشه‌های جو حاصل گردید. در مطالعه‌ای که توسط کروس و همکاران (۱۳) انجام گرفت، بذرهای گندم تلقیح شده با *Azospirillum* هیچ اختلاف معنی‌داری را در درصد جوانه‌زنی در مقایسه با شاهد تلقیح نشده نشان ندادند.

جدول ۲- میزان اکسین تولیدی در جدایه‌های مختلف باکتری‌های محرک رشد و تأثیر این جدایه‌ها بر وزن تر و خشک گیاهچه و ریشه‌چه، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و متوسط سرعت جوانه‌زنی بذر گندم

Table 2- The auxin production in different isolates of growth promoting bacteria and the effect of bacterial isolates on wheat germination traits such as radicle and plumule fresh and dry weight, radicle and plumule length, germination percentage, germination rate, and germination average rate

تیمار Treatment	میزان اکسین (اکسین جدایه‌های باکتری) Bacterial auxin	وزن تر گیاهچه (گرم) Wet weight of plants (g)	وزن خشک گیاهچه (گرم) Dry weight of plants (g)	وزن تر ریشه‌چه (گرم) Wet weight of roots (g)	وزن خشک ریشه‌چه (گرم) Drt weight of roots (g)	طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) Root lenght (cm)	طول ساقه‌چه (سانتی‌متر) Shoot lenght (cm)	درصد جوانه‌زنی (روز بر تعداد) Seed germiantion (%)	سرعت جوانه‌زنی (روز بر تعداد) Germiantion speed (per day)	متوسط سرعت جوانه‌زنی (روز بر تعداد) Mean germination speed (per day)
F1	25.93a	0.266bcd	0.0286a-g	0.522cdef	0.163b-h	5.26b-d	5.23e-h	32.66abc	49.07abc	3.666a-d
F3	21.16b	0.209cdef	0.0250f-i	0.618abc	0.167a-g	5.89abc	5.72c-g	27.33h	33.23hi	2.756ij
F4	20.26cd	0.187ef	0.0293a-f	0.367f	0.164b-h	5.31a-d	5.50c-g	32.33a-d	43.33defg	3.436c-g
F6	18.13e	0.223cdef	0.0283b-g	0.483cdef	0.155c-h	5.04cde	5.33d-h	32.66abc	45.41cde	3.560b-e
F8	20.80bc	0.244bcdef	0.0290a-f	0.507cdef	0.147f-h	3.44g	5.22e-h	30.66c-e	41.15efg	3.266fgh
F9	20.00cd	0.253bcde	0.0263d-h	0.571bc	0.153c-h	3.85fg	5.39d-h	27.66h	32.70i	2.703j
F10	10.13h	0.270bcd	0.0283b-g	0.579bc	0.149e-h	5.77abc	6.02a-f	31.66a-e	38.16gh	3.183gh
F17	15.73f	0.252bcde	0.0260e-h	0.630abc	0.153d-h	4.60def	5.22e-h	31.00b-f	46.19cde	3.443c-g
F18	1.90k	0.296b	0.0336a	0.771a	0.138h	6.27ab	6.53abc	31.00b-f	46.65cd	3.453c-g
F19	11.50g	0.440a	0.0280b-g	0.722ab	0.185ab	5.17b-e	4.86gh	33.00ab	46.05cde	3.583b-e
F21	9.8h	0.268bcd	0.0270c-h	0.590bc	0.136h	5.43a-d	5.33d-h	29.00fgh	46.69cd	3.313efg
F22	3.40j	0.373a	0.0253e-h	0.550cd	0.150e-h	5.07cde	4.87gh	32.00a-e	44.45cde	3.416d-g
F34	5.06i	0.241bcdef	0.0326ab	0.514cdef	0.169abcdef	5.84abc	5.08fgh	31.66a-e	47.75bcd	3.570b-e
F41	18.06e	0.108g	0.0276b-g	0.388ef	0.182abc	4.06efg	4.33hi	33.00ab	52.32ab	3.803ab
F45	17.83e	0.232 bcdef	0.0313abcd	0.504cdef	0.180abcd	5.59abcd	7.04a	32.66abc	53.99a	3.810ab
F46	11.70g	0.225bcdef	0.0236g-j	0.567bc	0.156b-h	5.47a-d	5.83b-g	31.00b-f	44.29cdef	3.373efg
F47	16.06f	0.243bcdef	0.0222hij	0.622abc	0.178abcde	5.03cde	4.97fgh	30.00efg	42.49defg	3.240fgh
F50	20.73bc	0.278bc	0.0320abc	0.601bc	0.176abcdef	5.81abc	6.50abc	32.00a-e	53.03ab	3.703abc
F52	4.06j	0.174fg	0.0200ij	0.540cde	0.171abcdef	5.10cde	5.54c-g	31.66a-e	46.76cd	3.510c-f
F56	19.76d	0.270bcd	0.0316abc	0.585bc	0.169a-g	5.32a-d	6.39a-d	30.33def	44.39cdef	3.360efg
OF	-	0.202def	0.0293a-f	0.469cdef	0.194a	5.97abc	6.30a-e	33.33a	53.53a	3.856a
R169	-	0.229bcdef	0.0303abcde	0.480cdef	0.152d-h	6.42a	6.89ab	31.00b-f	44.48cde	3.336efg
Blank	-	0.108g	0.0196j	0.400def	0.140gh	3.41g	3.58i	28.00gh	39.04fg	3.016hi

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P<0.05$)

این مسئله ممکن است به‌دلیل محدودیت‌های تحمیل شده توسط ممانعت‌های باکتری در زمین مانند بقاء، تحرک، جذب به ذرات خاک و رقابت با میکروارگانیسم‌های بومی باشد. از دلایل دیگر عدم جوانه زنی دانه‌های غلات و حبوبات، دورمانسی[1] می‌باشد. دورمانسی خارجی دانه، زمانی رخ می‌دهد که آب و هوا اجازه ورود به دانه را نداشته و دانه موفق به جذب آب نشده و نهایتا باعث کاهش جوانه‌زنی دانه می‌شود. از آن‌جایی که یک دانه دورمانت ممکن است به‌طور بالقوه به تمام مراحل متابولیکی مورد نیاز جهت تکمیل جوانه‌زنی دست یابد ولی هنوز به‌دلیل برخی موارد ناشناخته، محور طولی ریشه‌چه برای توسعه و امتداد یافتن با شکست مواجه می‌شود (۹). احتمال بر این است که افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی مشاهده شده در پژوهش حاضر، به دلیل شکسته شدن یا کوتاه شدن دوره دورمانسی تحت تأثیر تیمار با جدایه‌های باکتریایی باشد.

نتیجه‌گیری کلی

باکتری‌های محرک رشد گیاهی با روش‌های متعددی موجب افزایش رشد و نمو گیاهان مختلف می‌شوند. این باکتری‌ها علاوه بر محلول کردن فسفر خاک، تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن، با تولید هورمون‌هایی مانند انواع اکسین، جیبرلین و سیتوکنین، رشد و نمو گیاهان زراعی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. با توجه به نتایج حاصله، داشتن خصوصیات محرک رشدی مختلف از قبیل تولید سیدروفور، اکسین و انحلال ترکیبات نامحلول فسفر این جدایه‌ها و بهبود صفات جوانه‌زنی گندم، می توان از این جدایه‌ها برای تهیه مایه تلقیح مناسب پس از انجام آزمون‌های مزرعه‌ای در راستای افزایش فراهمی عناصر غذایی و بهبود رشد گیاهان مختلف از جمله غلات استفاده کرد.

منابع

1- Ahmad F., Ahmad L., and Saghir M. 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, 29:29-34.

2- 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.

3- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25(17): 3389-3402.

4- Asadi Rahmani H., and Rafiei S. 2013. Survey the ability of flavobacterium sp. bacteria in solubilization of insoluble phosphate. Journal of Cellular and Molecular Researches (Iranian Journal of Biology), 26(4): 472-479. (in Persian with English abstract)

5- Asghar H.N., Zahir Z.A., and Arshad M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). Australian Journal of Agricultural Research 55:187-194.

6- Banerjee M., Yesmin R.L., and Vessey J.L. 2006. Plant-growth- promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. P. 137-181. In: Handbook of microbial biofertilizers. Ed., Rai, M., K., Food Production Press. U.S.A.

7- Benizri E., Baudoin E., and Guckert A. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. Biocontrol Science and Technology, 11(5):557-574.

8- Bent E., Tvzun S., Chanway C.P., and Enebak S. 2001. Alterations in plant growth and root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 47:793-800.

9- Bradford K.J. 1996. Population-based models describing seed dormancy behaviour: lmplications for experimental design and interpretation. In Plant Dormancy, Lang, G.A. (ed). Oxford, UK: CAB International. P. 313-339.

10- Cakmakci R.I., Donmez M.F., and Erdogan U. 2007. The effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria on barely seedling growth, nutrient uptake, some soil properties, and bacterial counts. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 31:189-199.

11- Cassán F., Vanderleyden J., and Spaepen S. 2014. Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus Azospirillum. Journal of Plant Growth Regulation, 33(2):440-459.

12- Chen Y., Jurkevitch E., Bar-Ness E., and Hadar Y. 1994. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. Soil Science Society of America Journal, 58:390-396.

13- Creus C.M., Sueldo R.J. and Barass C.A. 1996. Azospirillum inoculation in pregerminating wheat seeds. Canadian Journal of Microbiology, 42:83-86.

14- Doyle J.J., and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19:11-15.

15- El-Meleigi M.A. 1998. Effect of Pseudomonas isolates applied to corn, sorghum and wheat seeds on seedling

1- Dormancy

growth and corn yield. Canadian Journal of Plant Sciences, 69: 101-108.
16- Forouzi M., Ehteshami S.M.R., Esfahani M., and Rabiee M. 2015. Effect of seed size on emergence rate, germination indices, seedling growth and yield of four bread wheat cultivars (*Triticum aestivum* L.). Cereal Research, 5(1):67-82. (in Persian with English abstract)
17- Gholami A., Shahsavani S., and Nezarat S. 2009. The Effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. Proceedings of Word Academy of Science, Engineering and Technology, 37: 2070-3740.
18- Glick B.R., Jacobson C.B., Schwarze M.M.K., and Pasternak J.J. 1994. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium Pseudomonas putida GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Canadian Journal of Microbiology, 40:911-915.
19- International Seed Testing Association (ISTA). 2008. Handbook of vigor test methods (2nd ed.). International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland.
20- Jarak M., Mrkovački N., Bjelić D., Jošić D., Hajnal-Jafari T., and Stamenov D. 2012. Effects of plant growth promoting rhizobacteria on maize in greenhouse and field trial. African Journal of Microbiology Research 6(27):5683-5690.
21- Jiang H., Dong H., Zhang G., Yu B., Chapman L.R., and Fields M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. Applied and Environmental Microbiology, 72(6):3832-3845.
22- Khakipour N., Khavazi K., Mojallali H., Pazira E., and Asadi Rahmani H. 2008. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 4:687-692.
23- Khalid A., Arshad M., and Zahir Z.A. 2004. Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield wheat. Journal of Applied Microbiology, 96:473-480.
24- Kloepper J.W., and Schroth M.N. 1978. Plant growth−promoting rhizobacteria on radish. Proceeding of 4th International Conference of Plant Pathological Bacteriology, 879-882. Angeres.
25- Kloepper J.W., Lifshitz R., and Zablotowicz R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology, 7(2):39-44.
26- Maghami M., Olamaee M., Rasuli Sadaghiani M.H., and Dordipour E. 2013. Isolation and identification of Pseudomonas fluorescens and evaluation of their plant growth promoting properties in soils Golestan province. Journal of Soil Management and Sustainable Production, 3(2):251-264. (in Persian with English abstract)
27- Noori M.S.Sh., and Saud H.M. 2012. Potential plant growth-promoting activity of Pseudomonas sp. isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. Plant Pathology and Microbiology, 3:1-4.
Patten C., and Glick B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology, 42:207-220
28- Rashid M., Khalil S., Ayub N., Alam S., and Latif F. 2004. Organic Acids productions solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences, 7:187-196.
29- Seyed Sharifi R., and Khavazi K. 2012. Effect of seed inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination components and seedling growth of corn (*Zea mays* L.). Journal of Agroecology, 3(4):506-513. (in Persian with English abstract)
30- Shaukat K., Affrasayab S., and Hasnain S. 2006. Growth responses of (*Helianthus annus*) to plant growth-promoting rhizobacteria used as a biofertilizer. Journal of Agriculture Research, 1(6):573-581.
31- Soltani Tolarood A., Salehrastin N., Khavazi K., Asadi H., and Abaszadeh P. 2008. Isolation and study plant growth promoting properties of Pseudomonas fluorescens species in soils of Iran. Iranian Journal of Soil and Water Science, 21:187-199. (In Persian)
32- Srivastava N.H., Bhandari V., and Bhatt A.B. 2014. PGPR Isolated from rhizospheric soil of Zanthoxylum armatum DC. in Garhwal Himalaya. International Journal of Herbal Medicine, 2(1):100-108.
33- Thomashow L.S., and Waller D.M. 1994. Role of a phenazine antibiotic from Pseudomonas fluorescens in biological control of Gaeumannomyces graminis var. tritici. Journal of Bacteriology, 170:3499-3508.
34- Wu S.C., Cao Z.H., Li Z.G., and Cheung K.C. 2005. Effect of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. Geoderma, 125:155-166.

Journal of Water and Soil
Vol. 31, No. 6, Jan.-Feb. 2018, p. 1712-1723

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۱، شماره ۶، بهمن – اسفند ۱۳۹۶، ص. ۱۷۲۳-۱۷۱۲

Identification and Evaluation of PGP Traits in Some Bacterial Strains Isolated from Wheat Rhizosphere

V. Hemati[1]- H. Asadi Rahmani[2*] - Sh. Rezaei[3]

Received: 30-07-2017
Accepted: 18-12-2017

Introduction: Wheat is one of the most important food crops. In modern agriculture, due to the increase in human population and the detrimental effects of pesticides such as environmental pollution, concerns about human and animal health, adapting suitable alternatives which have none of these dangerous effects would be necessary. This is possible by increasing the production of bio-fertilizers. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are the beneficial rhizosphere bacteria that can enhance plant growth directly or indirectly through a wide variety of mechanisms. PGPR can stimulate plant growth directly by supplying nutrients such as phosphorous and nitrogen or by the production of phytohormones such as auxins, cytokinins (CK), gibberellins (GAs) or ACC deaminase synthesis. They can also promote plant development indirectly by the suppression of pathogens by different mechanisms such as biosynthesis of antimicrobial molecules or antibiosis induced systemic resistance (ISR), rhizosphere competition, cell wall degrading enzymes like chitinase and HCN production. In this study, amplified ribosomal DNA restriction analysis was performed for screening the bacterial isolates. Then phosphate solubilization, siderophore and auxin release activities and effect of bacterial isolates on wheat seed germination traits were studied.

Materials and Methods: In order to isolate wheat rhizosphere bacteria, soil samples were taken from the wheat rhizosphere of Tehran, Qazvin, Zanjan, West and East Azerbaijan, Kurdistan and Hamadan provinces. Genomic DNA of each isolate was extracted by using a modified cetyl trimethylammonium bromide (CTAB) method. Amplified ribosomal DNA restriction analysis with HpaII and RsaI restriction enzymes was done for genetic screening. Growth stimulating factors were evaluated by auxin production, siderophore production, and inorganic phosphate solubilizing activity. Siderophore production was determined by measuring the diameters of the colony (mm) and of any orange halo (mm) formed from the blue medium surrounding bacterial growth on CAS Blue Agar medium. To examine P_i solubilization capability, 2µ bacteria suspension was placed on the plates containing Sperber's medium. Cultures were incubated at 25 ± 2 °, when the diameters of the colony and of the halo zone surrounding it were measured and the mean ± SE of the ratios of halo (mm)/colony (mm) calculated. In order to evaluate the production of auxin, isolates were grown in 100ml flasks containing 25ml TSB medium for 48h on a rotary shaker. 1 ml supernatant was mixed with 2ml of Salkowsky reagent after centrifugation at 10000g for 15min. The absorbance of the complex was read at 535nm in a Spectrophotometer. To investigate the effect of bacterial isolates on germination traits, radicle and plumule fresh and dry weight, radicle and plumule length, germination percentage, germination rate, and germination average rate were measured. The data were analyzed with using SAS 9.1. Mean comparisons were performed by LSD and main effective interaction was found significant at $P < 0.05$.

Results and Discussion: 20 isolates of wheat rhizosphere bacteria were subjected to amplified ribosomal DNA restriction analysis. The 16S rDNA region was amplified by polymerase chain reaction and PCR products were digested by HpaII and RsaI restriction enzymes. From each pattern, one sample was sent to sequencing. Different species including; *Chryseobacterium ginsenosidimutans*, *C. lathyri*, *C. piperi*, *C. taiwanense*, *Novosphingobium aromaticivorans*, *Pedobacter duraquae*, and *Sphingomonas koreensis* were identified from the wheat rhizosphere. Bacteria were tested for their plant growth promoting qualities. All of the strains produced auxin from 1.90 to 25.93. Mean comparison of the data showed that the highest level of auxin was produced with F1 and the lowest amount was observed by F18. Phosphate solubilization measured as a halo zone on Sperber's medium was observed with F6 and F56 isolates. The ratio of the diameter of the halo zone to the colony diameter was 2.86 with F6. The highest level of siderophore production by wheat rhizosphere bacteria, observed as halo formation around colonies on CAS Blue Agar medium, was obtained with F46, followed by F45 and F3. The ratio of the diameter of the orange halo surrounding bacterial growth to the colony diameter was 2.86 with F46. The result showed that the effect of wheat

1 and 3- M.Sc. Student and Assistant Professor of Islamic Azad University, Karaj Branch, Iran
2- Associate Professor of Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Educattion and Extention Organization
(*- Corresponding Author Email: asadi_1999@yahoo.com)

rhizosphere bacteria on germination traits such as radicle fresh and dry weight, plumule fresh weight, radicle and plumule length, germination percentage, germination rate, and germination average rate was significant at the one percent level and the effect of wheat rhizosphere bacteria on plumule fresh weight was significant at the five percent level.

Conclusion: Plant growth promoting bacteria enhance the growth and development of plants with different ways. These bacteria affect the growth and development of crops by phosphate solubilization, production of hydrogen cyanide, siderophore, and hormones such as auxin, gibberellic acid and cytokinins. According to the result, due to growth promoting characteristics such as siderophore and auxin production, phosphate solubilization, and the improvement of the seed germination traits, it can be possible to prepare bacterial inoculant for the field experiment in order to increase the availability of nutrients and improve the growth of plants.

Keywords: Auxin, PGPR, Siderophore, Wheat