Screening *Pseudomonas fluorescens* strains for plant growth promoting properties and salinity tolerance

Mitra Azadikhah
M. Sc. of Plant Breeding, Persian Gulf University, Bushehr, Iran, mitra.azadi66@gmail.com
Fatemeh Jamali *
Assistant Professor of Plant Pathology, Plant Protection Department, Persian Gulf University, Bushehr, Iran, jamali@pgu.ac.ir
Hamid-reza Nooryazdan
Assistant Professor of Genetics and Plant Breeding, Plant Breeding Department, Persian Gulf University, Bushehr, Iran, hrnooryazdan@pgu.ac.ir
Fereshteh Bayat
Assistant Professor of Plant Breeding, Plant Breeding Department, Persian Gulf University, Bushehr, Iran, hrnooryazdan@pgu.ac.ir

Abstract

Introduction: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are a group of plant rhizosphere inhabitants bacteria which stimulate plant growth and increase host tolerance to environmental stresses using several mechanisms. Fluorescent pseudomonads are considered as the most important plant growth promoting rhizobacteria. The aim of this study is screening Pseudomonas fluorescens strains isolated from barley rhizosphere in Bushehr province for growth stimulating properties and tolerace to salt stre.

Materials and methods: 25 *P. fluorscens* strains were evaluated for growth stimulating properties including siderophore, indole-3-acetic acid (IAA) and hydrogen cyanide (HCN) production, inorganic phosphate solubilization and the ability to tolerate salinity levels (0, 200, 400 and 600 mM of sodium chloride) under *in vitro* conditions.

Results: The results revealed that among the 25 strains studied, all were siderophore-producers (1.34-8.48 µM/ml) and 88% were able to produce HCN. The ability to solubilize mineral phosphate was observed in 88% of strains. Superior strains with PGP traits (B2-10, B4-6, B10, P68 and CHA0) were able to produce IAA (1.78-2.29 mg/ml). All strains were able to tolerate NaCl concentrations of 200-600 mM, however, their colony diameter decreased with increase in salinity levels.

Discussion and conclusion: The current study showed that some *P. fluorescens* strains isolated from barley rhizosphere like B2-10, B4-6, B2-11 and B10, had plant growth-promoting characteristics and salt tolerance ability, so it can be concluded that these strains have the potential to be applied as useful microorganisms in bifertilizers to enhance plant growth under salt stress conditions.

Key words: Hydrogen cyanide, Fluorescens pseudomonads, Siderophore, Salinity

* Corresponding author
Received: May 11, 2016 / **Accepted:** March 8, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۱۰۷- ۹۵
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۲۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۱۸

غربالگری سویه‌های *Pseudomonas flurescens* از نظر ویژگی‌های محرک رشد گیاه و تحمل به شوری

میترا آزادیخواه: کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران ، mitra.azadi66@gmail.com
فاطمه جمالی*: استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، jamali@pgu.ac.ir
حمیدرضا نوریزدان: استادیار ژنتیک و اصلاح نباتات، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، hrnooryazdan@pgu.ac.ir
فرشته بیات: استادیار اصلاح نباتات، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران، bayat@pgu.ac.ir

چکیده

مقدمه: ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) گروهی از باکتری‌های ساکن ریزوسفر گیاهان هستند که با استفاده از مکانیسم‌های مختلف موجب تحریک رشد میزبان و افزایش تحمل نسبت به تنش‌های محیطی می‌شوند. سودوموناس های فلورسنت ازجمله مهم‌ترین باکتری‌های محرک رشد گیاه هستند. هدف مطالعه حاضر، غربال سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* جداسازی‌شده از ریزوسفر جو در استان بوشهر از نظر ویژگی‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه و تحمل به تنش شوری است.

مواد و روش‌ها: ۲۵ سویه *P. fluorscens* از نظر ویژگی‌های محرک رشدی نظیر تولید سیدروفور، سیانیدهیدروژن (HCN) و ایندول-۳-استیک‌اسید (IAA)، توانایی محلول‌سازی فسفات معدنی و تحمل سطوح مختلف شوری (صفر، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار کلریدسدیم) در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شدند.

نتایج: نتایج، مولد سیدروفور (۸/۴۸ تا ۱/۳۴میکرومول در میلی‌لیتر) بودن تمام سویه‌های مطالعه‌شده را نشان دادند. توانایی انحلال فسفات معدنی به‌شکل کیفی و تولید سیانیدهیدروژن در ۸۸ درصد سویه‌ها مشاهده شد. سویه‌های برتر از نظر ویژگی‌های افزایش‌دهندگی رشد گیاه (B10، B2-11، B2-10، P68 و CHA0)، همگی قادر به تولید IAA بودند (۱/۷۸ تا ۲/۲۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر). تمامی سویه‌ها قادر به تحمل غلظت‌های کلریدسدیم بودند و غلظت‌های ۲۰۰تا ۶۰۰ میلی‌مولار نمک کلریدسدیم را تحمل کردند، هرچند قطر کلنی با افزایش سطح شوری کاهش یافت.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که برخی سویه‌های *P. fluorescens* جداسازی‌شده از ریزوسفر جو نظیر B10، B2-10، B4-6 و B2-11 دارای ویژگی‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه و تحمل به شوری هستند. در نتیجه، این سویه‌ها پتانسیل استفاده‌شدن به‌عنوان ریزموجودات مفید در کودهای زیستی برای افزایش رشد گیاه در شرایط تنش شوری را دارند.

واژه‌های کلیدی: سیانیدهیدروژن، سودوموناس‌های فلورسنت، سیدروفور، شوری

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه[1] (PGPR) ساکن در ناحیه فراریشه[2] گیاهان میزبان، گروه متنوعی از ریزموجودات هستند که با مکانیسم‌های متعددی بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارند (۱). PGPR با افزایش انحلال عناصر غذایی نظیر فسفر، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور به‌طور مستقیم در افزایش رشد گیاهان نقش ایفا می‌کنند (۲). همچنین، این باکتری‌ها با مکانیسم‌هایی نظیر رقابت برای جذب مواد غذایی و اشغال جایگاه‌های مناسب برای فعالیت عوامل بیماری‌زا، تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و نیز تولید سیانیدهیدروژن، بیمارگرهای گیاهی را کنترل می‌کنند و به‌طور غیرمستقیم موجب افزایش رشد گیاه میزبان می‌شوند (۳). در میان باکتری‌های محرک رشد ساکن فراریشه، گونه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* به دلیل داشتن مکانیسم‌های متعدد برای تحریک رشد گیاه و مهار بیمارگرهای گیاهی اهمیت بسیار زیادی دارند (۳).

ریزموجودات مختلف خاک، سیدروفورها را تولید می‌کنند و جنس *Pseudomonas* ازجمله مهم‌ترین تولیدکنندگان سیدروفور است (۴). در شرایط کمبود آهن، باکتری‌های ساکن فراریشه با تولید سیدروفور، آهن موجود در ریزوسفر را جذب می‌کنند. تولید سیدروفور علاوه بر تأمین آهن و اثر غیرمستقیم بر رشد گیاه، موجب کاهش دسترسی عوامل بیماری‌زای گیاهی به آهن و مهار رشد آنها می‌شود (۵).

فسفر از جمله عناصر ضروری برای رشد گیاهان است و نامحلول‌بودن بخش بزرگی از فسفر خاک، دسترسی به آن را برای گیاهان مشکل می‌کند. ریزوباکتری‌های حل‌کننده فسفات قادرند فسفر آلی و معدنی را از طریق ترشح اسیدهای آلی نظیر گلوکونیک‌اسید و اگزالیک‌اسید و آنزیم‌های حل‌کننده فسفات نظیر فسفاتاز، فسفوناتاز و فیتاز حل کنند و سبب افزایش رشد و عملکرد گیاهان شوند (۶). همچنین، ریزوباکتری‌ها قادرند با بیوسنتز هورمون اکسین، مورفولوژی ریشه را تغییر دهند و موجب افزایش رشد و عملکرد گیاهان شوند (۷).

سیانیدهیدروژن[3](HCN) یکی دیگر از متابولیت‌های ثانویه است که برخی باکتری‌های محرک رشد ازجمله سودوموناس‌های فلورسنت آن را تولید می‌کنند (۸). HCN ماده‌ای سمی برای قارچ‌های بیمارگر گیاهی است و از سوی دیگر، باکتری‌های تولیدکننده HCN بر متابولیسم گیاه تاثیر می‌گذارند و موجب افزایش تشکیل ریشه‌های مویین می‌شوند (۹).

شوری زیاد خاک ازجمله عوامل محدودکننده تولید محصولات کشورزی در سراسر جهان به‌ویژه مناطق خشک است (۱۰). تلقیح گیاهان با انواع باکتری‌های مفید ازجمله سودوموناس‌های فلورسنت از اقدامات مهم برای مقابله با شوری است که آثار نامطلوب تنش بر رشد گیاه را کاهش می‌دهد (۱۱). باکتری پس از کلنیزه‌کردن ناحیه فراریشه گیاه، HCN، سیدروفورها، آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC)دآمیناز و هورمون‌های گیاهی را تولید می‌کند و با تولید این متابولیت‌ها، موجب کاهش آثار منفی تنش‌های محیطی و افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (۳ و ۱۱).

نظر به آثار مفید باکتری‌های محرک رشد بر افزایش رشد گیاهان و نیز تحمل تنش‌های غیرزنده، هدف پژوهش حاضر غربالگری سویه‌های *P. fluorescens* از نظر ویژگی‌های محرک رشدی گیاه و تعیین میزان تحمل این باکتری‌ها به تنش شوری در شرایط آزمایشگاه است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتریایی: تعداد ۲۴ سویه *P. fluorescens* که از فراریشه گیاهان جو در مزارع مختلف استان بوشهر جداسازی شده بودند، از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه خلیج فارس بوشهر تهیه شدند. سویه CHA0 که دارای صفات تحریک‌کنندگی رشد گیاه است، از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دانشگاه ETH زوریخ، سوئیس دریافت و در آزمایش‌ها به‌عنوان استاندارد استفاده شد.

نگهداری سویه‌های *سودوموناس فلورسنت*: برای نگهداری طولانی‌مدت سویه‌های *Pseudomonas fluorescens*، ابتدا پرگنه رشدیافته باکتری بر محیط کینگ ب آگار[۴] (KB) (۱۲) با استفاده از سوزن کشت به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کینگ ب براث سترون در شیشه‌های مک کارتنی منتقل و ۱۶ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس روی دستگاه شیکرانکوباتور (مدل BINDER ساخت شرکت Service Hotlirce ,USA) با تکان ۱۶۰ دور در دقیقه[۵] قرار داده شد. باکتری رشدیافته در محیط‌کشت به نسبت مساوی با گلیسرول ۸۷ درصد استریل مخلوط و دو ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط به لوله‌های اپندورف سترون منتقل و در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

اندازه‌گیری توان حل‌کنندگی فسفات معدنی: آزمون حل‌کنندگی فسفات معدنی تمام سویه‌ها روی محیط کشت اسپربر[۶] جامد (۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلریدکلسیم، ۲/۵ گرم تری فسفات کلسیم، ۰/۲۵ گرم سولفات‌منیزیم، ۱۵گرم آگار در ۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر) انجام شد. باکتری‌ها روی تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت اسپربر به‌شکل لکه‌ای کشت داده شدند و پتری‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. هاله شفاف اطراف پرگنه باکتری‌ها به‌عنوان فعالیت مثبت باکتری در حل فسفات معدنی محسوب و قطر هاله پس از یک هفته اندازه‌گیری شد. این آزمون در سه تکرار برای هر سویه باکتری انجام شد (۱۳).

توانایی تولید سیدروفور نوع پایووردین: از روش اسپکترومتری برای اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور پایووردین[۷] استفاده شد؛ به این شکل که مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۱۶ ساعته باکتری‌ها در محیط سوکسینات (۳ گرم فسفات‌دی‌هیدروژن‌کلسیم، ۶ گرم فسفات‌هیدروژن‌دی‌پتاسیم، ۴ گرم سوکسینیک اسید، ۱ گرم سولفات‌آمونیوم، ۰/۲ گرم سولفات‌منیزیم آبدار و اسیدیته ۷) به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت تازه سوکسینات منتقل شد. محیط‌ها ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و درون دستگاه شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. پس از حذف رسوب باکتری، میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV/VIS2100 ساخت شرکت Unico) اندازه‌گیری شد (۱۴). در نهایت، داده‌ها با رابطه $A=\varepsilon BC$ به مول در لیتر تبدیل شدند؛ A= میزان جذب، ε= ضریب جذب مولی، B= قطر کوت و C= غلظت ماده (بر حسب میکرومول در میلی‌لیتر)

تولید سیانید هیدروژن (HCN): این آزمون بر اساس روش آلستروم و برنز[۸] (۱۵) انجام شد. برای بررسی تولید سیانیدهیدروژن، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری (کشت ۱۶ ساعته) رشدیافته در محیط لوریا برتانی براث[۹] (LB) شامل ۱۰ گرم باکتوتریپتون، ۵ گرم

عصاره مخمر، ۵ گرم کلریدسدیم و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در هر تشتک حاوی محیط NA پخش شد. کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۰/۰۲ گرم کربنات‌سدیم و ۰/۰۵ گرم پیکریک‌اسید) در قسمت درب پتری قرار گرفت و درب پتری با نوار پارافیلم مسدود شد تا از خروج هر گونه متابولیت گازی ازجمله سیانیدهیدروژن HCN جلوگیری شود. پتری‌ها یک هفته به حالت واژگون در دمای ۲۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. چنانچه باکتری رشدیافته روی سطح محیط کشت، HCN تولید کند، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره تا آجری‌رنگ دیده می‌شود که نشانه تفاوت در میزان HCN تولیدی است. رنگ کرم، کمترین مقدار تولید HCN (ارزش صفر) و رنگ آجری، بیشترین تولید HCN (ارزش ۳) را نشان می‌دهد. برای هر باکتری سه تکرار در نظر گرفته شد (۱۵).

بررسی سودوموناس‌های فلورسنت از نظر مقاومت به غلظت‌های مختلف شوری در شرایط آزمایشگاه: سنجش مقاومت به شوری سویه‌های *سودوموناس* به روش سرچشمه‌پور و همکاران (۱۶) انجام شد. برای بررسی میزان تحمل سویه‌ها به شوری، از محیط کشت NA با غلظت‌های متفاوت (صفر، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میلی‌مولار) کلریدسدیم استفاده شد. به این منظور، ابتدا محیط‌های کشت حاوی نمک در شرایط سترون در ظرف پتری توزیع و سپس هر ظرف پتری به ۹ قسمت مساوی تقسیم و کشت تازه هر سویه با روش قطره‌گذاری به آنها تلقیح شد. کشت سویه‌ها به شکلی بود که درون هر ظرف پتری، ۹ سویه مختلف قرار گرفت و برای هر سویه ۳ تکرار در ۳ ظرف پتری در نظر گرفته شد. ظروف پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و تغییر قطر، حالت و ظاهر پرگنه‌ها پس از ۲۴ و همچنین برای مطالعه دقیق‌تر رفتار و واکنش باکتری، پس از ۱۲۰ ساعت بررسی و مقایسه شدند. سرعت نسبی رشد با مشاهده کیفی پرگنه سویه‌ها و مقایسه میزان افزایش قطر پرگنه هر سویه در سطوح مختلف شوری و همچنین مقایسه با دیگر سویه‌ها به‌ترتیب با درجه‌ها و اعداد بسیار ضعیف ۱، ضعیف ۲، به‌نسبت ضعیف ۳، به‌نسبت متوسط ۴، متوسط ۵، به‌نسبت شدید ۶، شدید ۷ و بسیار شدید ۸ ثبت شد (۱۶).

توانایی تولید ایندول‌استیک‌اسید (IAA) به‌شکل نیمه‌کمی: سنجش نیمه‌کمی توانایی تولید IAA در پنج سویه که از نظر ویژگی‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه نسبت به سایر سویه‌ها برتری داشتند، بر اساس روش پیشنهادی بریک و همکاران[10] انجام شد (۱۷). در این روش، از ظروف پلیت یک‌بار مصرف استریل ۹ سانتی‌متری استفاده و هر پلیت با رسم خطوط مناسب در زیر آن به ۹ مربع کوچک با ابعاد ۲×۲ سانتی‌متر تقسیم شد. درون هر ظرف پلیت، ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت سترون LB-آگاری ریخته شد که به آن معادل ۵ میلی‌مولار (۱/۲۱۱۵ g/l) ماده ال-تریپتوفان افزوده شده بود (LBT). سپس با چوب‌های خلال استریل‌شده، نقطه مرکزی سطح محیط کشت هر یک از مربع‌ها با هر سویه مایه‌زنی و یک برگ غشای نیتروسلولزی روی محیط کشت LB مایه‌زنی شده قرار داده شد. پلیت‌ها واژگون به مدت ۱ تا ۲ روز درون انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری و روزانه از نظر رشد باکتری بررسی شدند. زمانی که قطر پرگنه‌های ظاهرشده روی LB به حدود ۲ میلی‌متر رسید، برگ‌های غشای نیتروسلولزی حاوی پرگنه باکتری‌ها درون ظروف پلیت دیگر حاوی یک برگ کاغذ صافی واتمن شماره ۲ اشباع‌شده با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول معرف سالکوفسکی قرار داده شدند (۱۷). برای تهیه محلول سالکوفسکی،

مقدار ۹۸/۶ میلی‌لیتر از پرکلریک‌اسید (۷۱ درصد) با ۴ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ مولار کلرورآهن درون بالن ژوژه ۲۰۰ میلی‌لیتری مخلوط و با آب مقطر به حجم نهایی ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برگ‌های غشای نیتروسلولزی به مدت ۰/۵ تا ۲ ساعت با محلول سالکوفسکی تیمار شدند و در طول این زمان، اطراف پرگنه‌های باکتری‌هایی که توان تولید IAA را داشتند، هاله قرمزرنگی تشکیل شد که رنگ و اندازه هاله‌ها بسته به مقدار IAA تولیدی سویه‌ها متفاوت بود. در این زمان، قطر هاله (HD) و قطر پرگنه (CD) اندازه‌گیری و متوسط نسبت قطر هاله به قطر پرگنه (HD/CD) برای هر سویه محاسبه شد و مبنای درجه‌بندی نیمه‌کمی توان تولید IAA قرار گرفت (۱۷).

آزمون کمی تولید IAA: سویه ها در محیط LBT فاقد آگار، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس روی شیکر دورانی با چرخش معادل ۹۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. سپس مقدار ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشته شد و پس از سانتریفیوژ کردن آن در ۵۰۰۰ rpm به مدت ۲۵ دقیقه، محلول صاف رویی هر سوسپانسیون جدا شد. عصاره صاف‌شده هر سوسپانسیون باکتری با محلول سالکوفسکی به نسبت ۲ به ۱ ترکیب و پس از ۲۰ دقیقه نگهداری در اتاق، میزان جذب نور با اسپکتوفتومتر در ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. میزان تولید اکسین سویه‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد حاصل از مقدار جذب نور غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ایندول‌استیک‌اسید محاسبه شد (۱۸ و ۱۹).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه واریانس داده‌ها با نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام شد. سپس میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن مقایسه و نمودارها با نرم‌افزار EXCEL 2007 رسم شدند.

نتایج

در پژوهش حاضر، تولید HCN، سیدروفور، انحلال فسفات معدنی و تحمل به شوری ۲۵ سویه باکتری *P. fluorescens* جداسازی شده از فراریشه جو انجام و سپس، پنج سویه برتر، انتخاب و آزمون تولید IAA روی آنها انجام شد.

تولید سیدروفور پایووردین: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند که سویه های باکتریایی از نظر تولید سیدروفور پایووردین در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنادار داشتند (جدول ۱). مقایسه میانگین سیدروفور تولیدی سویه‌ها نشان داد که مقادیر تولید آن از ۱/۳۴تا ۸/۴۸ میکرومول در میلی‌لیتر متغیر است (جدول ۲). سویه‌های BT9، B2-10، B4-6 و WBO3-3 بیشترین مقدار سیدروفور (به‌ترتیب ۸/۴۸، ۵/۶۷، ۵/۵۵ و ۸/۳۶ میکرومول در میلی‌لیتر) را تولید کردند و سویه‌های B14، WKZ1-17، B2-12، P68 و WH-M1 با تولید سیدروفور به میزان ۱/۰۱، ۱/۳۱، ۲/۵۴، ۱/۴۴ و ۱/۵۶ میکرومول بر میلی‌لیتر به‌ترتیب توانایی کمتری در تولید سیدروفور داشتند.

ارزیابی تولید سیانیدهیدروژن: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند که سویه‌های باکتریایی از نظر تولید سیانیدهیدروژن در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنادار داشتند. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن حاکی از این بود که اغلب سویه‌ها توانایی تولید HCN را داشتند، هرچند مقدار تولید این متابولیت در سویه‌های مختلف متفاوت بود. از ۲۵ سویه بررسی‌شده، سویه‌های WB1-14، WH-M1، B10، B2-10، B2-11، WH-jkmh و B13 دارای بیشترین مقدار تولید سیانیدهیدروژن و سویه‌های B2-14، UTPF68، WB1-1، B14، B2-7، WBO3-3، WB1-9، WBO2-10، WT1-53 و B3-6 فاقد این توانایی بودند (جدول ۱).

توانایی انحلال فسفات معدنی: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان دادند که سویه‌های باکتریایی از نظر انحلال فسفات معدنی در سطح ۱ درصد با یکدیگر اختلاف معنادار داشتند (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن نشان داد که سویه‌های WB0-3، BT9 و WT1-53 دارای بیشترین توانایی مصرف تری‌فسفات‌کلسیم (قطر هاله به‌ترتیب ۲۵/۶۷، ۱۹/۵۰ و ۱۸ میلی‌متر) و سویه‌های WH-M1، WB1-14 و UTPF68 فاقد این توانایی بودند (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس سویه‌های *P. fluorscens* از نظر تولید سیدروفور، HCN و قدرت انحلال فسفات معدنی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		سیدروفور	سیانیدهیدروژن	انحلال فسفات
سویه‌های باکتری	۲۴	۱۳/۲۰۹**	۳/۳۸**	۱۳۵/۹۷**
خطا	۵۰	۰/۶۱۱	۰/۴۶۶	۱۳/۱۷
کل	۷۴			
ضریب تغییرات		۲۰/۶۷	۴۷/۴۳	۳۰/۲۵

** معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول۲- مقایسه میانگین تولید سیدروفور، HCN و قدرت حل‌کنندگی فسفات معدنی سویه‌های *P. fluorscens*

ردیف	باکتری	سیدروفور (میکرومول بر میلی‌لیتر)	تولید HCN (ارزش ۰ تا ۳)	انحلال فسفات معدنی (قطر هاله به میلی‌متر)
۱	B13	۳/۳۹defgh	۲/۶۶ a	۱۹/۳۳b
۲	B14	۱/۵۱j	۰/۳۳۳f	۱۵/۳۳bcdefg
۳	B3-6	۳/۰۸۰efghi	۳f	۱۶/۶۷bcdef
۴	B10	۴/۵۹cd	۳a	۱۲/۶۷bcdefgh
۵	WKZ1-17	۲/۳۱ghij	۲/۳۳abc	۱۴ efcd
۶	B2-14	۳/۹۹def	۱/۳۳cdef	۱۰/۶۷efgh
۷	B4-6	۵/۵۵bc	۱/۶۶cdef	۱۵bcdefg
۸	BT9	۸/۴۸a	۲ abcd	۱۹/۵۰b
۹	B2-10	۵/۶۷bc	۱/۳۳cdef	۱۱/۸۳cdefgh
۱۰	B2-7	۴/۷۰cd	۱/۳۳cdef	۱۰/۳۳efgh
۱۱	B1-10	۳/۵۳defg	۲/۶۶ ab	۷/۶۷h
۱۲	B2-11	۶/۳۴b	۲abcd	۱۰/۳۳efgh
۱۳	B-10	۶/۲۵b	۱/۶۶bcde	۱۷bcde
۱۴	B2-12	۲/۵۴ghij	۰/۶۶۶ef	۱۱defgh
۱۵	WBO3-3	۸/۳۶a	۰f	۲۵/۶۷a
۱۶	WB1-9	۲/۷۳fghij	۰/۶۶۶ef	۱۲ cdefgh
۱۷	WH-M10	۴/۸۰cd	۱def	۸/۵۰gh
۱۸	WT1-53	۱/۳۴j	۰f	۱۸bcd
۱۹	WBO2-10	۱/۷۷j	۰f	۹/۶۷fgh
۲۰	WH-M1	۱/۵۶j	۳a	۰i
۲۱	WB1-14	۲/۰۱hij	۳a	۰i
۲۲	WB1-1	۱/۹۱ij	۰/۳۳۳f	۱۳/۶۷bcdefgh
۲۳	UTPF68	۱/۴۴j	۰/۳۳۳f	۰i
۲۴	Wh-jkmh	۲/۱۹ghij	۲/۶۶ab	۱۶/۳۳cde
۲۵	CHA0	۴/۴۱cd	۲abcd	۱۸/۵۰ bc

*در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معناداری ندارند.

تحمل به شوری: نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، اختلاف معنادار سویه‌های باکتریایی با یکدیگر از نظر تحمل به شوری در سطح ۱ درصد را نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس تحمل به شوری در سویه‌های *P. fluorescens*

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
شوری	۳	۲۳۳/۸۴**
باکتری	۲۴	۵۰/۱۹**
شوری×باکتری	۷۲	۱۰/۷۳**
خطا	۲۰۰	۲/۴
کل	۲۹۹	
ضریب تغییرات		۱۹/۸

**معنادار در سطح احتمال ۱ درصد

نتایج مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف شوری بر رشد کلنی باکتری‌ها نشان دادند که با افزایش سطح شوری، قطر کلنی باکتری‌ها در مقایسه با شاهد (بدون کاربرد نمک) کاهش یافته است. بیشترین قطر کلنی به سویه WKZ1-17 در سطح شوری صفر (بدون کاربرد نمک) متعلق بود که تفاوت معناداری با سویه WB1-1 در همین سطح شوری نداشت. کمترین قطر کلنی در سویه WH-M1 و در شوری ۶۰۰ میلی‌مولار مشاهده شد که تفاوت معناداری با سویه‌های B13، B4-6، B2-7، B10، B2-12، WT1-53، WBO2-10، WH-M1، WB1-14، Whjkmh و CHAO در همین سطح شوری نداشت (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر سطوح مختلف شوری بر رشد سویه‌های *P. fluorescens*

ردیف	شوری / باکتری	شاهد	۲۰۰ میلی‌مولار	۴۰۰ میلی‌مولار	۶۰۰ میلی‌مولار
۱	B13	۷/۶۷ nopqr	۶ stuvw	۴/۶۷ wxyz	۴/۶۷ wxyz
۲	B14	۱۵/۳۳ cde	۱۰/۶۷ ghi	۸/۶۷ lmno	۷ pqrst
۳	B3-6	۱۲/۳۳ fg	۱۶/۵ cd	۸/۳۳ mnop	۸/۳۳ mnop
۴	B10	۱۶/۳۳abc	۱۲/۳۳ fg	۸ mnopq	۸/۳۳ mnop
۵	WKZ1-17	۱۷/۳۳a	۶ stuvw	۵ vwxyz	۶ stuvw
۶	B2-14	۱۰ jkl	۸/۶۷ lmno	۱۱ ghij	۷/۶۷ nopqr
۷	B4-6	۱۲ fgh	۶ stuvw	۵/۶۷ tuvwx	۴/۶۷ wxyz
۸	BT9	۸/۳۳ mnop	۷/۳۳ opqrs	۶ stuvw	۶ stuvw
۹	B2-10	۷ pqrst	۶ stuvw	۵ vwxyz	۵/۶۷ tuvwx
۱۰	B2-7	۵ vwxyz	۵/۶۷ tuvwx	۵ vwxyz	۴/۶۷ wxyz
۱۱	B1-10	۱۱ hgij	۱۱/۶۷ fghi	۸/۶۷ lmno	۷/۶۷ nopqr
۱۲	B2-11	۱۱/۶۷ fghi	۸/۳۳mnop	۸ mnopq	۶/۶۷ qrstu
۱۳	B-10	۱۲ fgh	۵/۳۳ uvwxyz	۶ stuvw	۵ vwxyz
۱۴	B2-12	۹ klmn	۵/۳۳ uvwxyz	۶/۶۷ qrstu	۴/۶۷ wxyz
۱۵	WBO3-3	۹ klmn	۱۴/۶۷ e	۱۰/۳۳ a	۷ pqrst
۱۶	WB1-9	۱۴/۳۳ e	۱۳ f	۶/۳۳ rstuv	۶/۳۳ rstuv
۱۷	WH-M10	۹/۳۳ kml	۷/۳۳ opqrs	۶ stuvw	۶ stuvw
۱۸	WT1-53	۵/۶۷ tuvwx	۹ klmn	۴yz	۵/۳۳ uvwxyz
۱۹	WBO2-10	۶/۳۳rstuv	۶ stuvw	۶/۶۷ qrstu	۴/۶۷ wxyz
۲۰	WH-M1	۱۵ e	۵/۳۳ uvwxyz	۴/۳۳ xyz	۳/۶۷ z
۲۱	WB1-14	۶/۶۷ qrstu	۵/۶۷ tuvwx	۵/۳۳ uvwxyz	۴/۶۷ wxyz
۲۲	WB1-1	۱۷ab	۱۱/۳۳ ghij	۷/۶۷ nopqr	۶/۳۳ rstuv
۲۳	P68	۸ mnopq	۶/۳۳ rstuv	۷ pqrst	۶/۶۷ qrstu
۲۴	Whjkmh	۶ stuvw	۵/۳۳ uvwxyz	۵/۳۳ uvwxyz	۵ vwxyz
۲۵	CHA0	۷/۶۷ nopqr	۵/۶۷ tuvwx	۵/۶۷ tuvwx	۵ vwxyz

*در جدول، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن با یکدیگر تفاوت معناداری ندارند.

**اعداد جدول، میانگین قطر کلنی باکتری‌ها بر حسب میلی‌متر هستند.

در آزمون تحمل به شوری، ۲۵ سویه مطالعه‌شده با توجه به میزان رشد در سطوح مختلف شوری به پنج گروه حساس، نیمه‌حساس، نیمه‌متحمل، متحمل و بسیار متحمل تفکیک شدند. گروه‌بندی بر مبنای میزان رشد سویه‌ها در مقایسه با محیط غذایی بدون نمک که همه جدایه‌ها در آن رشد کردند و همچنین مقایسه سویه‌ها با یکدیگر انجام شد. مبنای گروه‌بندی، تعداد سویه‌های مربوط به هر گروه و نام سویه‌های برتر انتخاب‌شده از هر گروه در جدول ۵ دیده می‌شود.

جدول ۵- گروه‌بندی سویه‌های *P. fluorescens* از نظر تحمل به شوری

درجه تحمل	وضعیت رشد*	تعداد از ۲۵ سویه	سویه‌های برتر
حساس	رشد ضعیف تا به‌نسبت کم در سطح ۲۰۰mM	۱۹	CHA0
نیمه‌حساس	رشد متوسط تا شدید در سطح ۲۰۰mM	۶	B10
نیمه‌متحمل	رشد ضعیف تا به‌نسبت کم در سطح ۴۰۰mM	۲۴	B2-10
متحمل	رشد متوسط تا شدید در سطح ۴۰۰mM و رشد ضعیف تا به‌نسبت کم در سطح ۶۰۰mM	۲۵	B4-6 و B2-11
بسیار متحمل	رشد متوسط تا شدید در سطح ۶۰۰mM	۱	UTPF68

*مبنای مقایسه، میزان رشد هاله هر سویه در محیط NA بدون شوری است.

ارزیابی توان تولید IAA به‌شکل نیمه‌کمی: سویه‌ها در آزمون نیمه‌کمی از نظر توانایی تولید IAA به پنج گروه با توانایی‌های مختلف تقسیم شدند: گروه ۱ با توانایی تولید بسیار زیاد (HD/CD بیش از ۳)، گروه ۲ با توانایی تولید زیاد (HD/CD بین ۲/۵ تا ۳)، گروه ۳ با توانایی تولید متوسط (HD/CD بین ۲ تا ۲/۵)، گروه ۴ با توانایی تولید کم (HD/CD بین ۱/۵ تا ۲) و گروه ۵ با توانایی تولید بسیار کم (HD/CD بین ۱ تا ۱/۵) (جدول ۶).

ارزیابی توان تولید IAA به‌شکل کمی: تجزیه واریانس داده‌های تولید IAA به‌شکل کمی، اختلاف معنادار سویه‌های باکتریایی با یکدیگر را از نظر تولید IAA در سطح ۱ درصد نشان داد (جدول ۷). مقایسه میانگین داده‌ها حاکی از این بود که سویه‌های B4-6 و B2-10 بیشترین (به‌ترتیب ۲/۲۹ و ۲/۲۷ میلی‌گرم در لیتر) و سویه B2-11 کمترین (۱/۷۸ میلی‌گرم در لیتر) مقدار IAA را تولید کردند (شکل ۱).

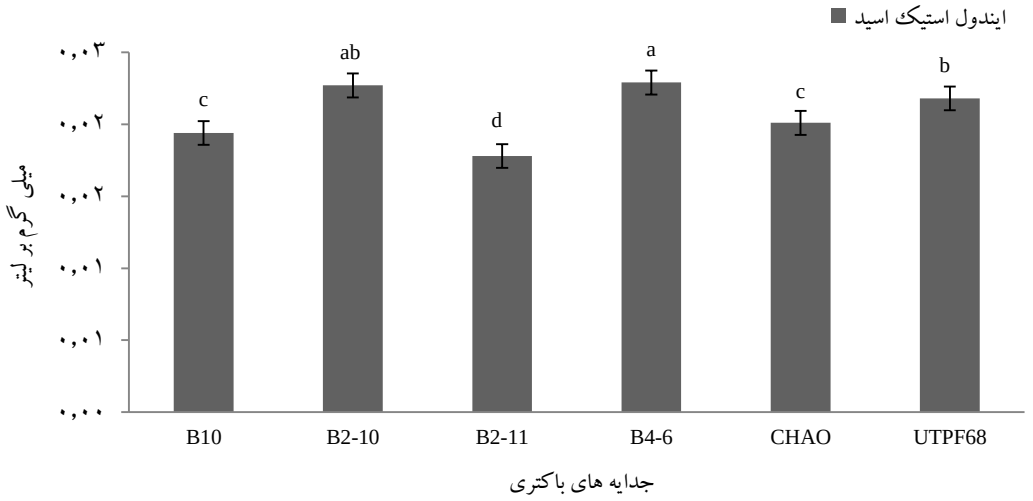
جدول ۶- گروه‌بندی سویه‌های *P. fluorescens* از نظر توان تولید IAA در روش نیمه‌کمی

متوسط نسبت قطر هاله به قطر پرگنه (HD/CD)				
۱-۱/۵	۱/۵-۲	۲-۲/۵	۲/۵-۳	>۳
-	UTPF68	B2-11	-	B4-6
-	CHA0	B2-10	-	-
-	B10	-	-	-

جدول ۷- تجزیه واریانس سویه‌های *P. fluorescens* از نظر تولید IAA به روش کمی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
سویه‌های باکتری	۵	۲/۱۷۴**
خطا	۱۲	۰/۰۶
کل	۷	
ضریب تغییرات		۱۴/۷۶

**معنادار در سطح احتمال ۱ درصد



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان تولید IAA در روش کمی بر حسب میلی‌گرم بر لیتر

بحث و نتیجه‌گیری

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه به‌ویژه گونه *P. fluorescens* با استقرار در مکان‌های مختلف ریشه و کلنیزاسیون مؤثر، رشد گیاهان را با مکانیسم‌های مختلف تحریک می‌کنند. مطالعه بیشتر این گونه‌ها از نظر تولید مواد محرک رشد گیاهی، دورنمای روشنی را در افزایش رشد گیاهان نوید می‌دهد (۲۰).

همه سویه‌های بررسی‌شده در پژوهش حاضر توانایی تولید سیدروفور را داشتند که این توانایی بر حسب سویه باکتری از ۱/۳۴ تا ۸/۴۸ میکرومول در میلی‌لیتر متغیر بود. سوزا و همکاران[11] در مطالعه‌ای درباره تنوع تولید سیدروفور در باکتری‌های مرتبط با برنج (*Oriza sativa L.*) دریافتند که از ۳۳۶ باکتری کشت‌شده، ۸۴ درصد سویه‌ها توانایی تولید سیدروفور را دارند (۲۱). نتایج حاصل از پژوهش آندرس و همکاران[12] نشان دادند که ۷۵ درصد سویه‌های *P. fluorescens* قادر به تولید سیدروفور در محیط‌کشت مایع بودند (۲۲). سیدروفورهایی که باکتری‌ها تولید می‌کنند با افزایش فراهم‌سازی آهن در خاک اطراف ریشه، جذب آهن توسط گیاه و رشد ریشه را افزایش می‌دهند. این مکانیسم علاوه بر تأمین آهن گیاه، اثر غیرمستقیمی بر رشد گیاهان می‌گذارد که باعث کاهش رشد عوامل بیماری‌زای گیاهی و کاهش دسترسی آنها به آهن می‌شود (۴).

در مطالعه حاضر مشخص شد که ۹۲ درصد سویه‌های *P. fluorescens* بررسی‌شده، توانایی انحلال فسفات معدنی در شرایط آزمایشگاهی را دارند. فسفر موجود در خاک به‌شکل ترکیبات فسفات‌های آلی و ترکیبات فسفات معدنی و به‌طور عمده در قالب مواد معدنی نامحلول در دسترس است (۲۳). احمد و همکاران نیز ۷۲ جدایه از باکتری‌های مختلف را بررسی کردند که در بین آنها، بیش از ۸۰ درصد باسیلوس و ۵۵/۵ درصد سودوموناس‌ها حل‌کننده فسفات بودند (۲۴). سرچشمه‌پور و همکاران گزارش کردند که جدایه‌های برتر حل‌کننده فسفات همگی به جنس *Pseudomonas* تعلق دارند و کارایی زیادی به واسطه توانایی در کاهش اسیدیته دارند (۲۵). فسفر موجود در خاک به‌شکل ترکیبات فسفات آلی و معدنی نامحلول

در دسترس است. باکتری‌های حل‌کننده فسفات با تولید انواع اسیدهای آلی قادر به انحلال ترکیبات معدنی فسفات نظیر تری‌فسفات‌کلسیم هستند (۲۶). باکتری‌های حل‌کننده فسفات از جمله *Pseudomonas* spp. با کمک آنزیم‌هایی نظیر فسفاتاز، فسفوناتاز و اسیدهای آلی مانند گلوکونیک‌اسید و سیتریک‌اسید، فسفر را از ترکیبات آلی و معدنی خاک آزاد می‌کنند. گلوکونیک‌اسید و ۲-کتوگلوکانات، نقش مهمی در محلول‌سازی فسفات و توانایی بیوکنترل سودوموناس‌های فلورسنت ایفا می‌کنند (۱ و ۲۷).

نتایج تولید HCN توسط سویه‌های *سودوموناس* بررسی‌شده در پژوهش حاضر نشان دادند که ۶۸ درصد سویه‌ها توانایی تولید سیانیدهیدروژن را دارند و میزان تولید از درجه به‌نسبت کم تا زیاد متغیر است. نتایج پژوهش کرمر و سویسی[13] نیز نشان دادند که تقریباً ۳۲ درصد مجموعه ای شامل ۲۰۰۰ سویه باکتری، توانایی تولید HCN را داشتند (۲۸). HCN ازجمله مهم‌ترین متابولیت‌های ثانویه‌ای است که بسیاری از ریزجانداران تولید می‌کنند و به طور مستقیم از پرولین، گلایسین و یا گلیکوزیدهای سیانوژنیک ساخته می‌شود. تولید HCN توسط *سودوموناس‌ها* به مقدار آهن سه ظرفیتی جذب‌شدنی بستگی دارد. این ترکیب از سویی برای قارچ‌ها سمی و از سوی دیگر تولید آن توسط باکتری‌ها موجب تشکیل ریشه‌های مویین می‌شود (۹).

در پژوهش حاضر، بیشتر سویه‌های *P. fluorescens* جداشده از ریزوسفر جو، بیشترین سطح شوری آزمایش‌شده را تحمل کردند. افزایش سطوح شوری باعث کاهش توده کلنی جدایه‌ها شد، به‌طوری که در بعضی جدایه‌ها، میزان رشد در سطوح بالای شوری طی ۲۴ ساعت اولیه بسیار کم بود و این نتیجه با نتایج سرچشمه‌پور و همکاران مطابقت داشت (۲۵). مطالعه‌های کوردویلا[14] نشان داده‌اند که سازگاری باکتری‌ها به سطوح بالای شوری ممکن است از طریق افزایش سطوح پتاسیم بین سلولی و گلوتامات باشد (۲۹). افزایش غلظت نمک در خارج از غشای سلولی باکتری موجب افزایش پتانسیل اسمزی شده و این، یکی از دلایل مهم کاهش رشد باکتری‌ها است (۳۰).

نتایج روش نیمه‌کمی تولید اکسین در پژوهش حاضر نشان دادند که هر شش سویه باکتری قادر به تولید این متابولیت هستند و بسته به میزان تولید، طیفی رنگی از صورتی کمرنگ تا پررنگ ایجاد می‌کنند. با توجه به اینکه نسبت قطر هاله به پرگنه و همچنین شدت رنگ ایجادشده بین سویه‌های مختلف *P. fluorescens* متفاوت بود، استنباط می‌شود که توانایی تولید اکسین بین آنها یکسان نیست و این نتیجه با نتایج عرب و همکاران مطابقت داشت (۳۱). نتایج تولید کمی IAA نشان دادند که سویه‌های B4-6 و B2-10 بیشترین مقدار (به‌ترتیب ۲/۲۹ و ۲/۲۷ میلی‌گرم در لیتر) تولید کردند. احمد و همکاران نیز در بررسی تولید اکسین توسط ۱۱ سویه *P. fluorescens* دریافتند که میزان تولید اکسین از ۵/۳۴ تا ۲/۴۴ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر است (۳۲). طبق مطالعات پیشین، حدود ۸۰ درصد باکتری‌های جداشده از ریزوسفر خاک قادر به تولید ایندول-۳-استیک‌اسید یا اکسین هستند (۳۳). تولید غلظت زیاد اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت، ویژگی بارز بیشتر آنها است (۳۴). این هورمون موجب افزایش سطح ریشه و تعداد ریشه‌های مویین ریشه می‌شود و به این ترتیب، جذب مواد غذایی و استقرار بیشتر گیاه در خاک را افزایش می‌دهد (۳۵).

با توجه به سازگاری سودوموناس‌های فلورسنت

محرک رشد گیاه با شرایط محیطی زیستگاه خود، در مطالعه حاضرسویه‌های *P. fluorescens* محرک رشد گیاه جداسازی‌شده از ریزوسفر جو در استان بوشهر مطالعه شدند. این سویه‌ها علاوه بر داشتن ویژگی‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه مانند انحلال فسفات معدنی و تولید سیدروفور، HCN و IAA، دارای ویژگی‌های تحمل به شوری نیز بودند. با توجه به گستردگی اراضی شور در کشور که موجب کاهش رشد گیاهان می‌شوند، استفاده از باکتری‌های محرک رشد قادر به تحمل تنش شوری نسبت به سایر سویه‌های غیرمتحمل بر رشد و عملکرد گیاهان در شرایط تنش شوری بسیار تاثیرگذار است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از همکاری صمیمانه مسئولان دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر در اجرای این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

References

(1) Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and soil* 2003; 255(2): 571-586.

(2) Ping L., Boland W. Signals from the underground: Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in plant science* 2004; 9: 263-266.

(3) Haas D., Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews in microbiology* 2005; 3(4): 307-319.

(4) Nelson LM. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online *Crop Management* 2004; 3(1): doi: 10.1094/CM-2004-0301-05-RV

(5) Guerinot ML. Iron Uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. *Plant and soil* 1991; 130: 199-209.

(6) Richardson AE., Barea JM., McNeill AM., Prigent-Combaret C. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil* 2009; 321: 305-339.

(7) Kloepper JW., Gutierrez-Estrada A., Mclnroy JA. Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiology* 2007; 53(2): 159-167.

(8) Nadine J., Coste De V., Gadkar J., Filion M. *Verticillium dahliae* alters *Pseudomonas* spp. populations and HCN gene expression in the rhizosphere of strawberry. *Journal of microbiology* 2010; 56: 906-915.

(9) Schippers B., Bakker AW., Bakker PAHM., Van Peer R. Beneficial and deleterious effects of HCN-production pseudomonads on rhizosphere interaction. *Plant and soil* 1990; 129: 75-83.

(10) Munns R., Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual review of plant biology* 2008; 59: 651-681.

(11) Glick BR. The enhancement of plant growth by free living bacteria. *Canadian journal of microbiology* 1995; 41: 109-114.

(12) King EO., Ward MK., Rainey DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 1954; 44: 301-307.

(13) Sperber JI. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Crop and pasture science* 1958; 9: 778-781.

(14) Castañeda G., Muñoz JJ., Peralta-Videa JR. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent Pseudomonas in the presence of copper and iron. *Microchemical journal* 2005; 81(1): 35-40.

(15) Alstrom S. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and soil* 1989; 102: 3-9.

(16) Sarcheshmepour M., Savaghebi Gh., Saleh Rastin N., Alikhani H., Pour-Babaei A. Isolation, screening, identification and determination of relative tolerance to salinity and drought superior strains of bacteria in the rhizosphere growth (PGPR) of pistachio trees. *Iranian journal of soil and water research* 2010; 2(40): 177-190.

(17) Bric JM., Bostok R., Silverstone SA. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and environmental Microbiology* 1991; 57(2): 535-538.

(18) Patten CL., Glick BR. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and environmental microbiology* 2002; 68(8): 3795-3801.

(19) Bent E., Tuzan S., Chanway CP., Enebak S. Alteration in plant growth and in root hormone levels of Lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian journal of microbiology* 2001; 47(9): 793-800.

(20) Germida JJ., Walley FL. Plant growth-promoting rhizobacteria alter rooting patterns and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field-grown spring wheat. *Biology and fertility of soils* 1996; 23(2): 113-120.

(21) Souza R., Beneduzi A., AmbrosinI A., Costa PB., Meyer J., Vargas, LK., Schoenfeld R., Passaglia LMP. The effect of plant growth-promoting rhizobacteria on the growth of rice (*Oryza sativa* L.) cropped in southern Brazilian fields. *Plant and Soil* 2013; 366: 585-603.

(22) Pontes AP., Souza RD., Granada CE., Passaglia LM. Screening of plant growth promoting bacteria associated with barley plants (*Hordeum vulgare* L.) cultivated in South Brazil. *Biota Neotropica* 2015; 15(2): 1-6.

(23) Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil* 2006; 287: 15-21.

(24) Ahmad F., Ahmad I., Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological research* 2006; 36: 1-9.

(25) Sarcheshmepor M., Tavaghebi G., Salehi N., Alikhani H., Porbabaie A. Isolation, screening, identification and determination of relative tolerance to drought and salinity superior strains of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR*). Journal of Soil and Water* 2009; 2(40): 177-190.

(26) Chen YP., Rekha PD., Arun AB., Shen FT., Lai WA., Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 2006; 34: 33-41.

(27) De Werra P., Péchy-Tarr M., Keel C., Maurhofer M. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75(12): 4162-4174.

(28) Kremer RJ., Souissi T. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. *Current Microbiology* 2001; 43: 182-186.

(29) Cordovilla MD., Ligero F., Lluch C. Effects of NaCl on growth and nitrogen fixation and assimilation of inoculated and KNO_3 fertilized *Vicia faba* L. and *Pisum sativum* L. plants. *Plant science* 1999; 140(2): 127-136.

(30) Tank ND., Saraf MS. Salinity resistant PGPR ameliorates NaCl stress on tomato plants. *Journal of Plant Interactions* 2010; 5: 51-58.

(31) Arab CM., Akbari S., Alikhani H., Arzanesh M., AllahDadi H. Auxin production ability by isolated indigenous bacteria *Azospirillum* and evaluate the effects of sex drive superior growth sweet corn. *Journal of Iran crops* 2009; 6(2): 217-225.

(32) Ahmad F., Ahmad I., Khan MS. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan. *Turkish Journal of Biology* 2005; 28(1): 29-34.

(33) Spaepen S., Vanderleyden J., Remans R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology reviews* 2007; 31: 425-48.

(34) Ahmad F., Ahmad I., Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiologycal Research* 2008; 163: 173-181.

(35) Han HS., Lee KD. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Research journal of agriculture and biological sciences* 2005; 1: 210-215.

---

[1]- Plant growth-promoting rhizobacteria
[2]- Rhizosphere
[3]- Hydrogen Cyanide
[4]- King’S Medium B Agar
[5]- Round per minute (rpm)
[6]- Sperber
[7]- Pyoverdin
[8]- Alstrom and Burns
[9]- Luria Bertani Broth
[10]- Bric et al
[11]- Souza et al
[12]- Andress et al
[13]- Kremer and Souissi
[14]- Cordovilla