Nova Biologica Reperta 6(4): 435-445 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.6.4.435

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۴۳۵ الی ۴۴۵ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد از ریشه سپهر گیاه اسپندک

الهه زاده حسینقلی ، نادر چاپارزاده و سمیرا محمودی اقدم
گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
مسئول مکاتبات: نادر چاپارزاده، nchapar@azaruniv.ac.ir

چکیده. برخی از ریزوباکتری‌ها اثرات مفید بر رشد گیاهان دارند. اسپندک (*Zygophyllum fabago*) یک علف هرز با ارزش دارویی است. در تحقیق حاضر باکتری‌های ریشه سپهر این گیاه جداسازی و شناسایی شدند. خصوصیات مرتبط با تحریک رشد گیاه مانند انحلال فسفات و روی، تولید ایندول استیک اسید و فعالیت ضد قارچی جدایه‌ها مورد برر سی قرار گرفت. سپس جدایه‌ها جداگانه به گیاه تلقیح شده و پس از حصول اطمینان از استقرار آن‌ها در ریشه، کارایی آن‌ها در افزایش رشد گیاه در شرایط گلخانه‌ای سنجیده شد. نتایج شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی نشان داد که ۵ جدایه حاصل متعلق به جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Pantoea* و *Brevibacterium* بودند. همه ۵ جدایه درجاتی از توانایی در تحریک رشد گیاه را نشان دادند. از میان جدایه‌ها، فقط جدایه متعلق به جنس *Bacillus* توانست وزن خشک گیاهان را به طور معنی‌داری افزایش دهد. میزان انحلال فسفات این جدایه برابر با ۴۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و میزان تولید اسید آن در محیط کشت بیش از سایر جدایه‌ها بود. جدایه فوق با داشتن قدرت انحلال عنصر روی، ایندول استیک اسید را به مقدار ۳/۸۹ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تولید کرد. با این وجود این جدایه فعالیت ضد قارچی بر علیه دو قارچ بیماری‌زای گیاهی *Aspergillus niger* و *Botrytis cinerea* را نشان نداد.

واژه‌های کلیدی. انحلال فسفات، ایندول استیک اسید، باکتری، ریشه، ضد قارچ

Isolation and characterization of plant growth-promoting bacteria from Syrian bean caper (*Zygophyllum fabago*) rhizosphere

Elaheh Zadeh Hosseingholi, Nader Chaparzadeh & Samira Mahmudi Aghdam
Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
Correspondent author: Nader Chaparzadeh, nchapar@azaruniv.ac.ir

Abstract. Some rhizobacteria have positive effects on plants growth. Syrian bean-caper (*Zygophyllum fabago*) is a weed plant with medicinal value. This study was conducted to isolate and identify bacteria from Syrian bean-caper rhizosphere. Characteristics associated with plant growth stimulation, such as phosphate and zinc dissolution, production of Indole acetic acid and antifungal activity, were investigated. The isolates were separately inoculated to the plant and after plant root establishment was ensured, their effectiveness in increasing plant growth in greenhouse conditions was measured. Biochemical and molecular identification results showed that five isolates belonged to the genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Pantoea*, and *Brevibacterium*. All five isolates showed some degree of plant growth promotion capabilities. Among the isolates, only the genus *Bacillus* increased the dry weights of plants significantly. The amount of phosphate solubilization for this isolate was 440 µg ml^{-1} and its acid production in the culture medium was higher than that in other isolates. The isolate had zinc solubilisation capability and produced 3.89 mg ml^{-1} indole acetic acid. However, this isolate did not show antifungal activity against two fungal pathogens of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea.*

Keywords. antifungal activity, bacteria, indole-acetic acid, phosphate solubilization, root

Received 07.01.2018/ Revised 07.06.2018/ Accepted 27.06.2018/ Published 10.01.2020
دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۷/ اصلاح: ۱۳۹۷/۰۳/۱۷/ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۰۶/ انتشار: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

مقدمه

برای تامین عناصر ضروری گیاه عموما از کودهای شیمیایی استفاده می‌شود. با این وجود، به غیر از مسایل اقتصادی، انتقال باقیمانده کودها به آب‌های زیر زمینی و مسایل زیست محیطی موضوعات جدی هستند که استفاده از آن‌ها را محدود و لزوم استفاده از روش‌های جایگزین برای افزایش تولیدات گیاهی را پررنگ‌تر می‌کند. روش‌های جایگزین باید علاوه بر توان افزایش محصول، امنیت زیست محیطی و تعادل اکولوژیکی دراز مدت در اکوسیستم را فراهم کنند (Majeed *et al*., 2015). در زراعی سازی گیاهان دارویی نیز افزایش حاصل‌خیزی خاک از طریق این روش‌ها و تولید محصول ارگانیک اهمیت زیادی دارد. در ریشه-سپهر تراکم مواد ترشحی از ریشه گیاهان مانند اسیدهای آمینه و قندها در مقایسه با بقیه قسمت‌های خاک زیاد است. این عامل زمینه رشد ریزاندامگان بسیاری را در آن فراهم می‌کند (Dobbelaere *et al*., 2003). باکتری‌ها فراوان‌ترین ریزاندامگان خاک هستند. از طرف دیگر، ریزاندامگان‌های خاک برای جذب عناصر غذایی با گیاهان نیز رقابت دارند. میان‌کنش بین باکتری و گیاه می‌تواند برای گیاه سه حالت مفید، خنثی و مضر باشد. ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (promoting Plant growth bacteria or PGPR) زیر مجموعه‌ای از باکتری‌های سودمند آزادزی بوده و افزایش بهره‌وری محصولات کشاورزی را از طریق افزایش توده زیستی، رشد ریشه و افزایش وزن محصولات باعث می‌شوند. تاثیرات مثبت این باکتری‌ها عمدتا به دلیل دخالت مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها در سازوکارهای مختلفی نظیر تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی، افزایش جذب عناصر ضروری برای رشد گیاه نظیر آهن و فسفات، و کاهش یا حذف آثار زیانبار باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی است. PGPRها می‌توانند به صورت خارج سلولی در ریشه‌سپهر و روی سطح ریشه و به صورت داخل سلولی در فضاهای میان سلول‌های ناحیه پوست ریشه مستقر شوند. تنها درصد کمی از باکتری‌ها رشد گیاه را در ریشه‌سپهر افزایش می‌دهند. باکتری‌های متعلق به سرده‌های *Azetobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Agrobacterium* از مهم‌ترین PGPRهای خارج سلولی هستند (Antoun, 2013; Bhattacharyya & Jha, 2012).

اسپندک (*Zygophyllum fabago* L.) گیاهی علفی و دولپه متعلق به تیره قیچیان است. در بیش‌تر مناطق دنیا اسپندک علف هرز با قدرت تهاجمی بالا محسوب می‌گردد. تحقیقات اخیر حاکی از ارزش غذایی و دارویی بالای این گیاه است (Abdel-Hamid *et al*., 2013). اسپندک یکی از گیاهان مهم با خصوصیات ضد روماتیسم، ضد کرم و ضد تنگی نفس، ضد نقرس بوده و به صورت پماد برای بهبود بیماری‌های پوستی و زخم‌های خارجی استفاده می‌شود (Khan *et al*., 2014).

با توجه به اهمیت PGPRها به عنوان کود زیستی در کشت گیاهان دارویی، هدف این تحقیق جداسازی باکتری‌ها از ریشه سپهر اسپندک و شناسایی جدایه‌های PGPR با انجام برخی بررسی‌های مولکولی و فیزیولوژیکی نظیر توانایی تولید اکسین و محلول سازی فسفات و بررسی توانایی آن‌ها در افزایش رشد گیاه مذکور در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

محل و روش گردآوری نمونه خاک ریشه‌سپهر

نمونه برداری اسپندک از رویشگاه طبیعی گیاه در منطقه آذرشهر (آذربایجان شرقی)، با عرض جغرافیایی ۳۷/۸۱ و طول جغرافیایی ۴۵/۹۴، با ارتفاع ۱۳۴۰ متر از سطح دریا انجام شد. نمونه‌های گیاهی به همراه ریشه در کیسه استریل به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی باکتری‌ها

ریشه گیاه با رعایت شرایط استریل به قطعات کوچک بریده شده و سپس به ارلن‌های حاوی سرم فیزیولوژی استریل منتقل شد. نمونه‌ها حدود نیم ساعت روی همزن با دور ۱۸۰ بر دقیقه قرار گرفتند. پس از تهیه سری‌های رقت ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات لوله‌ها در پلیت‌های حاوی محیط LB (Luria Burtani Agar) کشت سطحی داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. خالص سازی کلنی‌های رشد یافته باکتریایی روی پلیت‌ها از طریق کشت چهار منطقه‌ای در محیط کشت LB و گرماگذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جدایه‌های خالص شده درگلیسرول ۲۰ درصد و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شناسایی ویژگی‌های ریخت شناسی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

بعد از خالص سازی باکتری‌ها، شناسایی هر یک از آن‌ها برروی محیط کشت جداسازی شده، بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی شامل اندازه، شکل ظاهری، رنگ، نوع سطح و حاشیه کلنی انجام گرفت. در مرحله بعد، شناسایی بر اساس ویژگی‌های میکروسکوپی شامل شکل باکتری (میله‌ای، کروی، مارپیچی)، اندازه، نوع واکنش به رنگ آمیزی گرم و داشتن هاگ (Bartholomew & Mittwer, 1950) انجام شد. آزمون حرکت از طریق استفاده از محیط کشت نیمه جامد SIM (Sulfide Indole Motility Medium) (Twedt *et al*., 1969)، آزمون کاتالاز از طریق اضافه کردن قطرات H_2O_2 ٪۳۰ بر روی کلنی‌های باکتریایی (Taylor & Achanzar, 1972) و آزمون اکسیداز از

طریق انتقال کلنی‌های باکتریایی به کاغذ صافی حاوی معرف تترامتیل-p-پارافنیلین دی آمین کلراید (Faller & Schleifer, 1981) به منظور تعیین برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی اولیه انجام شد و جدایه‌های مشابه کنار گذاشته شدند.

شناسایی مولکولی و آنالیز فیلوژنتیکی جدایه‌های منتخب

شناسایی تکمیلی جدایه‌های منتخب با تکثیر و تعیین توالی 16S rDNA انجام گرفت. بدین منظور ابتدا از باکتری‌های منتخب، توده زیستی تهیه و استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها با روش جوشاندن (Queipo-Ortuo *et al*., 2008) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از آغازگر رفت 27F و آغازگر برگشت 1492R (Frank *et al*., 2008) انجام شد. چرخه حرارتی با برنامه مرحله آغاز ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی-گراد، مرحله واسرشتی ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله طویل شدن ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، انجام گرفت. تکثیر 16S rDNA با الکتروفورز و بارگذاری محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد تایید شد. محصول PCR پس از تخلیص تعیین ترادف و توسط نرم افزار ChromasPro version 2.1. (Technelysium Pty Ltd) بازخوانی و ویرایش شد. با استفاده از برنامه BLAST با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده اطلاعات ژنومی Eztaxon (http://www.ezbiocloud.net) (Yoon *et al*., 2017) مقایسه و میزان شباهت آن با باکتری‌های مختلف ثبت شده، تعیین و ذخیره شد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی جدایه‌ها پس از یافتن توالی‌های مشابه و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم افزار MEGA 5 (Tamura *et al*., 2011) و با الگوریتم Neighbor-joining انجام شد. بررسی شاخه‌های درخت با استفاده از الگوریتم Bootstrap با ۱۰۰۰ بار نمونه-گیری انجام شد (Felsenstein, 1985).

سنجش کیفی و کمی انحلال فسفات معدنی توسط جدایه‌ها

به منظور سنجش کیفی انحلال جدایه‌ها در محیط کشت LB مایع کشت داده شدند. سلول‌های باکتریایی با سانتریفیوژ (۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) جدا و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل مجددا سانتریفیوژ شدند. ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (۰/۲ = ۶۰۰ OD) به صورت نقطه‌ای در روی پلیت حاوی محیط PVK (Pikovskaya) agar (Pikovskaya, 1948) متشکل از گلوکز ۱۰ گرم، $(NH_4)_2SO_4$ ۰/۵ گرم، NaCl ۰/۲ گرم، $MgSO_4\ 7H_2O$ ۰/۱ گرم، KCl ۰/۲ گرم، yeast extract ۰/۵ گرم، $MnSO_4\ H_2O$ ۰/۰۰۲ گرم، $FeSO_4\ 7H_2O$ ۰/۰۰۲ گرم، $Ca_3(PO_4)_2$ ۵ گرم، آگار ۱۵ گرم بر لیتر با pH برابر با ۷/۲ ±۰/۲ قرار داده شد. برای پلیت شاهد نیز به همان میزان از محیط مایع تلقیح نشده برای لکه‌گذاری استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. سپس هاله اطراف کلنی‌ها مورد بازبینی قرار گرفت. نتایج به صورت درصد کارایی انحلال، که حاصل تقسیم قطر حلالیت بر قطر رشد است، گزارش شد (Dawwam *et al*., 2013; Felsenstein, 1985). برای سنجش کمی انحلال نیز جدایه‌ها در محیط‌های جداگانه LB مایع کشت داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از آن‌ها به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط PVK مایع تلقیح و در انکوباتور شیکردار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۵۰ در دقیقه به مدت ۱۲۰ ساعت گذاشته شد. جداسازی مایع رویی باکتری‌ها از طریق سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه) انجام شد. pH مایعات رویی اندازه گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی با ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد مخلوط و ۴ میلی‌لیتر از محلول رنگی $(NH_4)_6Mg_7O_{24}.4H_2O$ ۱۰ درصد، H_2SO_4 ۲/۵٪، ال- اسکوربیک اسید و آب مقطر با نسبت‌های (۱:۱:۱:۲) به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. میزان جذب در طول موج ۸۲۰ نانومتر تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد KH_2PO_4 مقدار انحلال فسفات بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد (Gusain *et al*., 2015).

سنجش انحلال کیفی عنصر روی توسط جدایه‌ها

آزمون مطابق روش توضیح داده شده در مورد انحلال کیفی فسفر صورت گرفت. با این تفاوت که ZnO ۰/۱۲ درصد به جای $Ca_3(PO_4)_2$، مورد استفاده قرار گرفت (Dobbelaere *et al*., 2003).

سنجش تولید اکسین یا ایندول استیک اسید (IAA) توسط جدایه‌ها

جدایه‌ها به محیط کشت LB مایع تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت DF مایع (Dworkin & Foster, 1958) حاوی ۵۰۰ میکروگرم در لیتر از ال-تریپتوفان انتقال داده شد. ارلن‌ها به انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل و بعد از ۴۲ ساعت سلول‌های باکتریایی با سانتریفیوژ (۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه) جدا شدند. ۰/۵میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر معرف Salkowski (۱۵۰ میلی‌لیتر H_2SO_4 ۱۸ مولار، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۵ میلی‌لیتر $FeCl_3\ 6H_2O$ ۰/۵ مولار) مخلوط شد. پس از ۲۰ دقیقه، میزان جذب نوری مخلوط در طول موج ۵۳۵ نانومتر تعیین و با استفاده از منحنی استاندارد مقدار IAA تولید

شده برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر مشخص شد (Gordon & Weber, 1951).

سنجش فعالیت ضد قارچی توسط جدایه‌ها

از روش انتشار در آگار با ایجاد چاهک استفاده شد. جدایه‌ها در محیط کشت LB مایع کشت داده شدند. قارچ‌های بیماری‌زای *Aspergillus niger* و *Botrytis cinerea* در محیط Sabaroud Dextrose Agar (SDA) کشت داده شده و هاگ قارچ‌ها خراشیده شده و در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی نرمال به صورت سوسپانسیون در آورده شدند. ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون هاگ قارچی (10^5 CFU/ml) روی محیط کشت SDA توزیع شد. ۱۰۰ میکرولیتر از کشت جدایه‌های باکتریایی (2×10^7 CFU/ml) در داخل چاهک‌های پلیت‌ها ریخته شد. در پلیت‌های شاهد نیز به همین میزان محیط کشت LB مایع ریخته شد. پلیت‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت گرماگذاری شدند. سپس اندازه هاله‌های عدم رشد بر حسب میلی‌متر سنجیده شد (Ahmad *et al*., 2008).

آماده سازی بذرها و تهیه مایع تلقیح

به منظور رفع آلودگی‌های سطح بذر، بذرهای گیاه اسپندک در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۵ دقیقه نگهداری و پس از شستشو با آب مقطر استریل در سدیم هیپوکلریت ۲ درصد نیز به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی و نهایتا ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند (Luna *et al*., 2010). به منظور شکست خواب، بذرهای اسپندک در محیط مرطوب به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شدند. جوانه زنی بذرها با گرماگذاری ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز تسهیل شد. جوانه‌های هم اندازه به شیشه‌های استریل حاوی پرلیت اتوکلاو شده منتقل شد. دانه‌رست‌ها درشرایط نوری تنظیم شده ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، رطوبت ۴۰-۳۰ درصد، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و میانگین نور ۱۵۰ میکرومول فوتون بر متر مربع بر ثانیه آزمایشگاه نگهداری شدند. آبیاری گیاهان با محلول هوگلند (Hopkins & Huner, 2012) انجام گرفت. ۵ روز بعد از انتقال دانه رست‌ها، جدایه‌های باکتریایی منتخب کشت شده در محیط LB، پس از حصول کدورت ۱ مک فارلند، با سانتریفیوژ دور ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه جمع آوری و با سرم فیزیولوژی ۰/۸ درصد شسته شدند. باکتری‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی معلق شده (Egamberdieva, 2010; Simons *et al*., 1996) و از ریشه‌چه به دانه‌رست‌ها تلقیح گردید. به گروه شاهد سرم فیزیولوژی تلقیح شد.

بررسی استقرار جدایه‌های تلقیح شده در ریشه و رشد گیاه

۲۷ روز بعد از کاشت، برداشت گیاهان صورت گرفت. ریشه‌ها بارعایت شرایط استریل به ارلن‌های ۲۵۰ سی سی حاوی سرم فیزیولوژی ۰/۸ درصد منتقل شد. بعد از هم زده شدن (۱۸۰ دور در دقیقه) و تهیه سریال رقت، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات لوله‌ها روی پلیت‌های حاوی محیط کشت LB، کشت سطحی داده شده و در انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۸ ساعت گرماگذاری شدند (Simons *et al*., 1996). نتایج به صورت Colony Forming Unit (CFU) در هر میلی‌لیتر گزارش شد. گیاهان پس از برداشت، در آون به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و با ترازوی حساس توزین شدند. تجزیه و تحلیل آماری نتایج وزن خشک گیاهان با ۶ تکرار و لحاظ خطای معیار در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و رسم نمودار با نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

جداسازی و ویژگی‌های بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی جدایه‌ها

در جداسازی اولیه، ۱۶ جدایه به دست آمد که بعد از انجام تست‌های اولیه بیوشیمیایی و ریخت شناسی و حذف جدایه‌های مشابه ۵ جدایه متفاوت با نام‌های SB، SE، SI، SL و SN برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شدند. خلاصه‌ای از ویژگی‌های این سویه‌ها در جدول ۱ آمده است.

شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب و رسم درخت فیلوژنتیک

نتایج حاصل از مقایسه توالی 16S rDNA به دست آمده از سویه‌های منتخب با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon در جدول ۲ آورده شده است. درخت فیلوژنتیک رسم شده برای نشان دادن روابط جدایه‌ها نیز در شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی در شیشه (*In vitro*) خصوصیات مرتبط با تحریک رشد در جدایه‌ها

بررسی توانایی محلول‌سازی فسفات نشان داد که همه ۵ جدایه قادر به انحلال فسفات بودند. بیش‌ترین میزان انحلال فسفات مربوط به جدایه SL (۵۲۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) و کم‌ترین میزان مربوط به جدایه SI (۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. نتایج سنجش کمی pH حاکی از آن بود که اسیدیته محیط جدایه‌های با توانایی انحلال بالای فسفات (SE، SL وSN) بیش از آن‌هایی بود که فسفات کم‌تری (SB و SI) را محلول ساخته بودند.

در جدول ۳ نتایج مربوط به میزان انحلال فسفات جدایه‌ها و میزان pH مایع رویی کشت جدایه‌ها آورده شده است. درصد کارایی انحلال فسفات (SE) جدایه SL بیش از بقیه جدایه‌ها و برابر ۱۳۰ درصد بود. میزان این معیار در بقیه جدایه‌ها ۱۱۰ درصد بود (جدول ۴).

از بین جدایه‌ها، SE و SN قادر به انحلال روی بودند. این دو باکتری روی پلیت هاله‌های تقریبا هم اندازه ایجاد کردند و کارایی

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی و ریخت شناسی جدایه‌های منتخب.

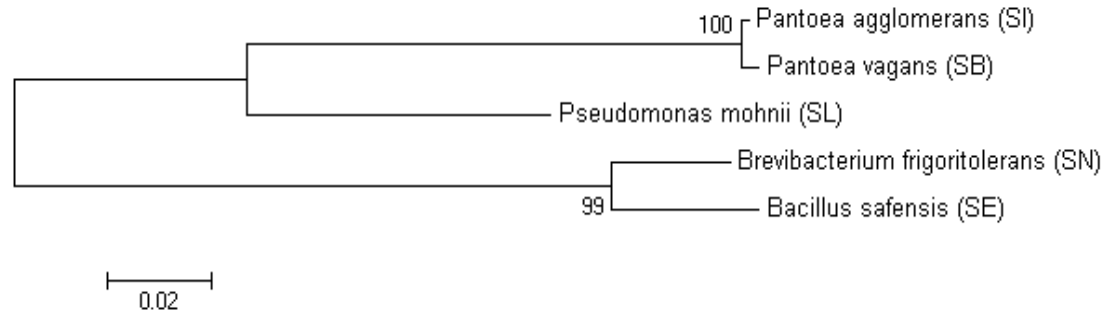
Table 1. Some biochemical and morphological characteristics of selected isolates.

نام انتخابی برای جدایه	ویژگی کلنی	نوع گرم	تولید هاگ	تست اکسیداز	تست کاتالاز	حرکت	شکل میکروسکوپی
SB	زرد رنگ موکوییدی گرد و محدب	-	-	_	+	+	میله‌ای کوتاه
SE	سفید رنگ مواج با حاشیه‌های غیر منظم	+	+	+	+	+	میله‌ای
SI	زرد رنگ نیمه شفاف کمی محدب	_	-	_	+	+	میله‌ای کوتاه
SL	سفید مایل به زرد گرد	-	-	+	+	+	میله‌ای
SN	سفید مایل به خاکستری گرد و کوچک	+	-	+	+	_	میله‌ای کوتاه

جدول ۲- میزان شباهت جدایه‌های منتخب با نزدیک‌ترین گونه ثبت شده در پایگاه EzTaxon.

Table 2. The similarity of selected isolates with the closest species registered at the EzTaxon database.

نام انتخابی جدایه	نزدیک‌ترین باکتری شناخته شده در EzTaxon	Accession number	میزان شباهت (٪)
SB	*Pantoea vagans*	EF688012	99.6
SE	*Bacillus safensis*	ASJD01000027	100
SI	*Pantoea agglomerans*	AG233423	100
SL	*Pseudomonas mohnii*	AM293567	100
SN	*Brevibacterium frigoritolerans*	AM747813	100



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک جدایه‌های منتخب. برای نشان دادن روابط از روش Neighbor-joining استفاده شد. اعداد ذکر شده در محل انشعاب نشانگر درصد نمونه‌گیری Bootstrap از ۱۰۰۰ نمونه است.

Fig.1. Phylogenetic tree of selected isolates. The Neighbor-joining method was applied to illustrate relationships. The numbers at the branch points represent a sample bootstrap percentage of 1000 samples.

انحلال روی مربوط به آن‌ها ۱۱۰ درصد بود (جدول ۴). بررسی نتایج حاصل از توانایی تولید ایندول استیک اسید مشخص کرد که بیش‌ترین میزان تولید ایندول استیک اسید مربوط به جدایه SB با ۷/۹۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. میزان تولید این ماده در جدایه‌های SE، SI، SL و SN به ترتیب برابر با ۳/۸۹، ۵/۴۴، ۵/۶ و۲/۷۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود. نتایج اندازه هاله بازدارندگی باکتری‌ها علیه قارچ‌ها (جدول ۵) نشان دهنده فعالیت ضد قارچی جدایه‌های SB، SI وSL علیه هر دو قارچ بیماری‌زای مورد استفاده بود. جدایه SN علیه قارچ *A. niger* و جدایه SE علیه هیچ کدام از قارچ‌ها فعالیت ضد قارچی نشان نداند.

جدول ۳- غلظت فسفات محلول و pH نهایی مایع رویی کشت جدایه‌ها در محیط PVK مایع به مدت ۱۲۰ ساعت.

Table 3. Phosphorus concentration and final pH of the supernatants cultured isolates in the PVK Broth medium after incubation for 120 hours.

نام انتخابی جدایه	غلظت فسفات حل شده (میکروگرم در میلی‌لیتر)	pH
SB	۹۰	۶/۸۲
SE	۴۴۰	۵/۲۰
SI	۶۰	۶/۶۵
SL	۵۲۸	۵/۲۵
SN	۳۹۰	۵/۵۸

جدول ۴- درصد کارایی انحلال فسفر و روی جدایه‌های باکتریایی.

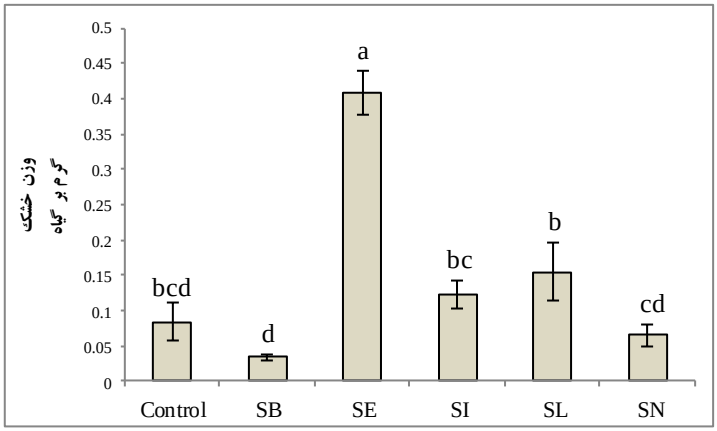
Table 4. Phosphorus and Zinc solubilization efficiency percentage of bacterial isolates.

نام انتخابی جدایه	کارایی انحلال فسفات	کارایی انحلال روی
SB	۱۱۰	-
SE	۱۱۰	۱۱۰
SI	۱۱۰	-
SL	۱۳۰	-
SN	۱۱۰	۱۱۰

جدول۵- اندازه هاله بازدارندگی رشد قارچ‌های *Aspergillus niger* و *Botrytis cinerea* بر حسب میلی‌متر.

Table 5. The size of the inhibition zone of mycelial growth of *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea* in millimeters

	SB	SE	SI	SL	SN
Aspergillus niger	۱۵	_	۱۱	۱۵	_
Botrytis cinerea	۱۴	_	۱۰	۱۵	۱۲



شکل ۲- وزن خشک گیاهان تیمار شده با جدایه‌های باکتریایی. مقادیر میانگین شش تکرار ± SE هستند. حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح $P < 0.05$ است.

Fig. **2**. Dry weights of plants treated with bacterial isolates. The values are the average of six replicates ± SE. Means followed by different letters show a significant difference at the level of $P < 0.05$.

میزان استقرار جدایه‌ها در ریشه و تاثیر آن‌ها در رشد گیاه اسپندک در شرایط گلخانه‌ای

نتایج نشان داد که میزان کلونیزاسیون ریشه برای جدایه‌های SB و SE مساوی و برابر با ۲×۱۰^{۴} CFU در هر میلی‌لیتر و در مورد جدایه‌های SI، SL و SN به ترتیب برابر با $۱۳،۱۰^{۴} \times ۱۰^{۳}$ و ۴۶×۱۰^{۲} CFU در هر میلی‌لیتر بود. تلقیح جدایه‌ها به گیاه تاثیر متفاوتی روی وزن خشک گیاهان تیمارهای مختلف داشت. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، جدایه باکتریایی SE میانگین وزن خشک گیاهان را نسبت به گروه شاهد و دیگر جدایه‌ها به طور معنی داری افزایش داد.

بحث

نتایج حاصل از شناسایی مولکولی (جدول ۲)، شباهت زیاد جدایه‌های باکتریایی SL, SI, SE, SB و SN را به ترتیب با باکتری‌های *Pantoea vagans*، *Bacillus safensis*، *Pantoea agglomerans*، *Pseudomonas mohnii* و *Brevibacterium frigoritolerans* نشان داد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی تعیین شده (جدول ۱) نیز نتایج شناسایی مولکولی به دست آمده را تایید می‌کند. لذا در این قسمت به جای استفاده مکرر نام جدایه‌ها نام باکتری‌هایی که بنا به تست‌های اولیه و مولکولی بیش‌ترین تشابه را به جدایه‌ها داشته‌اند آورده شده است. در تحقیق حاضر بیش‌ترین مقدار انحلال فسفات به صورت کیفی و کمی مربوط به باکتری *P. mohnii* بود. باکتری *B. safensis* نیز از این نظر در جایگاه دوم قرار داشت. در مورد باکتری اول گزارشی مبنی بر انحلال ۲، ۱/۹، ۲ میلی‌گرم فسفر بر لیتر به ترتیب بعداز ۳ روز، ۸ روز و ۱۴ روز و اندازه هاله انحلال ۱۱ میلی‌متر وجود دارد (Xu, 2014). باکتری *B. safensis* شباهت بسیار زیادی به باکتری *Bacillus pumilus* دارد (Satomi *et al*., 2006). با وجود این‌که گزارشی مبنی بر انحلال فسفات توسط *B. safensis* وجود ندارد ولی میزان انحلال ۱۸۸/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفات توسط سویه‌ای از *B. pumilus* وجود دارد (Hafeez *et al*., 2006) و گزارشی مبنی بر ایجاد هاله حل کنندگی فسفات به اندازه ۱۸ میلی‌متر نیز توسط این باکتری وجود دارد (Mufti *et al*., 2015). همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود هر دو باکتری باعث اسیدی شدن محیط کشت می‌شوند. محلول‌سازی میکروبی فسفر خاک در محیط مایع اغلب به علت ترشح اسیدهای آلی مثل اگزالیک اسید، سیتریک اسید، لاکتیک اسید و غیره است. اسیدهای آلی می‌توانند به طور مستقیم با پایین آوردن pH، فسفات معدنی را حل و یا با مشارکت یون آهن و یون آلومینیوم، فسفات را کلاته کنند. اسیدهای غیر آلی مانند هیدروکلریک اسید همچنین می‌توانند فسفات را حل کنند اما آن‌ها اثر کم‌تری در مقایسه با اسیدهای آلی در همان pH دارند. به هر حال به نظر نمی‌رسد اسیدی شدن تنها مکانیسم محلول‌سازی فسفات باشد. چنانچه توانایی برای کاهش pH در بعضی موارد به توانایی برای محلول‌سازی فسفات‌های معدنی مربوط نمی‌شود. در مطالعات پیشین نیز نشان داده شده است که سویه‌هایی از جنس *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Rhizobium* قدرتمندترین حل‌کننده‌های فسفات هستند (Khan *et al*., 2009).

در مطالعات گذشته *B. frigoritolerans* قادر به حل فسفات از P_2O_2 نبوده و توانایی ایجاد هاله حل‌کنندگی فسفات در محیط PVK را نداشته است (Nicoara *et al*., 2014; Raza *et al*., 2015). این باکتری در مطالعه حاضر با انحلال فسفات به میزان ۳۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر باعث اسیدی شدن محیط کشت نیز گردید. میزان انحلال فسفات باکتری *P. agglomerans* نیز در بین جدایه‌ها کم‌ترین میزان (۶۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بود. در مورد این باکتری گزارش‌های متعددی در مورد توانایی انحلال فسفات وجود دارد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۱ انجام شده است ۷۷/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تری کلسیم فسفات در محیط کشت بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون تحت شرایط بهینه توسط یک سویه از *P. agglomerans* گزارش شده است (Mishra *et al*., 2011). بیشینه تولید فسفات محلول ۱۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای سویه *P. agglomerans* R-42 گزارش شده است (Son *et al*., 2006). در مطالعه دیگری یک سویه از همین باکتری یک هاله حل‌کنندگی فسفات به اندازه ۲۱ میلی‌متر ایجاد کرده است (Malboobi *et al*., 2009).

روی (Zn) یک عنصر مغذی در غلظت پایین اما سمی در غلظت‌های بالا است. میزان زیاد انحلال روی ممکن است رشد باکتری‌ها را محدود کند. محلول‌سازی روی بوسیله‌ی باکتری‌ها اهمیت زیادی در فراهم آوردن عنصر ضروری روی برای گیاهان دارد (Verma *et al*., 2014). ساز و کار اساسی برای تجزیه ترکیبات حاوی روی، ترشح اسیدهای آلی است که با کاهش pH محیط، قابلیت دسترسی به عنصر روی برای گیاهان افزایش می‌یابد (Pirhadi *et al*., 2016). در تحقیق حاضر باکتری‌های *B. safensis* و *B. frigoritolerans* توانایی محلول سازی روی را دارا بودند. این دو باکتری هر دو گرم مثبت هستند و همان‌طور که در درخت فیلوژنتیک (شکل ۱) نیز دیده می‌شود، این دو باکتری نسبت به سایر جدایه‌ها قرابت بیش‌تری با هم دارند. در مطالعات گذشته، گزارشی حاکی از ایجاد یک هاله انحلال روی توسط یک گونه نزدیک به *B. safensis* (*B. pumilus*) به اندازه

۱۵ میلی‌متر وجود دارد (Sharma *et al*., 2012). گزارش‌های دیگری در مورد توانایی انحلال روی توسط باکتری‌های جنس *Bacillus* وجود دارد (Mumtaz *et al*., 2017; Sharma *et al*., 2012).

اکسین یا IAA به وسیله اکثر گونه‌های باکتریایی تولید می‌شود. همانند گیاهان، تریپتوفان پیش‌ساز تولید IAA در باکتری‌ها بوده و افزودن آن به کشت‌های باکتریایی تولید کننده IAA، سنتز این هورمون را افزایش می‌دهد (Dastager *et al*., 2010; Sharma *et al*., 2012). IAA به عنوان مولکول سیگنال مهم در تنظیم نمو گیاه عمل می‌کند. میزان تولید IAA به وسیله باکتری‌های محرک رشد گیاه ممکن است در میان گونه‌ها و سویه‌ها بسته به شرایط کشت و قابلیت دسترسی به سوبسترا تحت تاثیر قرار گیرد (Ashrafuzzaman *et al*., 2009). تولید مقادیر پایین IAA به وسیله باکتری‌ها می‌تواند اثرات مثبت روی رشد گیاه اعمال کند؛ در حالی که تولید مقادیر بالا، یک مشخصه از عوامل بیماری‌زای گیاهی است و باعث ممانعت از رشد ریشه می‌شود (Afzal *et al*., 2015). در تحقیق حاضر بیش‌ترین مقدار تولید IAA (۷/۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) مربوط به باکتری *P. vagans* بود. در مطالعات گذشته گزارش‌هایی مبنی بر تولید ۶۰/۴، ۴۲/۱، ۳/۵۰ و ۱۸/۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر IAA به ترتیب توسط سویه‌هایی از *P. agglomerans*، *B. pumilus*، *B. frigoritolerans* و *P. mohnii* وجود دارد (Hafeez *et al*., 2006; Mishra *et al*., 2011; Xu, 2014).

اکثر باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه ممکن است سیستم دفاعی گیاهان را علیه عامل بیماری‌زا القاء و یا مقاومت گیاه را از طریق تولید اجزای ضد میکروبی افزایش دهند. مهار رشد عامل بیماری‌زا ممکن است مربوط به ترشح آنتی بیوتیک و توکسین، رقابت با عامل بیماری‌زا برای فضا و مواد مغذی و تغییر pH در محیط یا ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلول مانند کیتیناز و بتا ۱و۳ گلوکاناز باشد (Pirhadi *et al*., 2016). در اغلب مقالات هاله عدم رشد با قطر بیش از ۱۰ میلی‌متر نشان دهنده فعالیت ضد میکروبی قوی ماده یا باکتری مورد آزمایش است (Kim *et al*., 2016; Shrestha *et al*., 2014). در تحقیق حاضر تمام باکتری‌هایی که دارای فعالیت ضد قارچی بودند هاله مهارکنندگی قوی را باعث شدند (جدول ۵). در مطالعات گذشته فعالیت ضد قارچی یک سویه *P. vagans* علیه *A. niger* منفی گزارش شده است (Afzal *et al*., 2015) و توانایی ایجاد هاله بازدارندگی به اندازه ۲۰ میلی‌متر علیه *B. cinerea* توسط یک سویه *P. agglomerans* گزارش شده است (Chernin *et al*., 1995). گزارش افزایش مقاومت درختان مو علیه *B. cinerea* به علت تلقیح *P.* PTA-AF1 *agglomerans* در دست است (Trotel-Aziz *et al*., 2008). در مطالعه حاضر جدایه‌های منسوب به این دو نوع باکتری هاله ممانعت از رشد قوی را بر علیه هر دو باکتری بیماری‌زای گیاهی نشان دادند. در یک مطالعه یک سویه از *B. pumilus* قادر به ایجاد یک هاله بازدارندگی به اندازه ۲۷ میلی‌متر علیه *A. niger* بوده و در یک مطالعه دیگر سویه‌ای از همین باکتری ۲۸/۵۷ درصد فعالیت ضد قارچی علیه *B. cinerea* نشان داده است (Cherif-Silini *et al*., 2016; Munimbazi & Bullerman, 1998). این در حالی است که علی‌رغم تشابهات بسیار زیاد *B. pumilus* به *B. safensis*، این باکتری در این مطالعه هیچ فعالیت ضد قارچی را نشان نداد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ انجام گرفته است فعالیت ضد قارچی باکتری *B. frigoritolerans* علیه دو قارچ مورد استفاده در این مطالعه منفی بوده است (Cherif-Silini *et al*., 2016). برای باکتری *P. mohnii* فعالیت ضد قارچی گزارش نشده است. در مطالعه حاضر بیش‌ترین فعالیت ضد قارچی بر علیه هر دو قارچ مربوط به همین باکتری است. هر سه جدایه دارای فعالیت ضد قارچی بر علیه هر دو قارچ مورد بررسی قرار گرفته، متعلق به رده Gammaproteobacteria بودند.

اثرات بهبود رشد گیاهان به وسیله تلقیح دانه آن‌ها با ریزوباکتری‌ها دیده شده است. چنین افزایشی به افزایش ظرفیت تثبیت کنندگی نیتروژن، توان حل کنندگی فسفات و همچنین توانایی باکتری‌ها برای تولید سوبستراهای محرک رشد گیاه نسبت داده می‌شود (Turan *et al*., 2014). جدایه‌های باکتریایی ارتفاع گیاه، طول ریشه و تولید ماده خشک را در محصولات کشاورزی متنوع مانند سیب زمینی، گوجه فرنگی، ذرت، گندم و غیره افزایش می‌دهند (Bhattacharyya & Jha, 2012). نتایج تاثیر جدایه‌ها بر روی وزن خشک اسپندک نشان داد که فقط باکتری *B. safensis* تاثیر معنی داری در افزایش وزن خشک گیاه دارد. در مطالعه‌ای تاثیر *B. pumilus* در افزایش وزن خشک ریشه و ساقه گیاه گندم مشاهده شده است (Hafeez *et al*., 2006). نتایج شمارش باکتری‌های مستقر در ریشه نشان داد که میزان استقرار باکتری *B. safensis* در ریشه مساوی استقرار باکتری *P. vagans* و بیش از بقیه باکتری‌ها بود. مقایسه نتایج آزمون‌های این دو باکتری نشان می‌دهد که به احتمال زیاد موفقیت باکتری *B. safensis* در تحریک رشد گیاه، به دلیل انحلال فسفات حدود ۵ برابر بیش‌تر، قابلیت انحلال روی و میزان تولید ایندول استیک کم‌تر آن نسبت به باکتری *P. vagans* باشد. در مورد باکتری *P. mohnii* نیز با وجود این‌که قدرت انحلال فسفات بیش‌تری نسبت به *B. safensis* داشت، دلایل

عدم قابلیت تحریک رشد در گیاه را می‌توان به میزان استقرار کم‌تر و تولید ایندول استیک اسید بیش‌تر نسبت داد.

در کل نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در ریشه سپهر اسپندک انواع باکتری زندگی می‌کنند. در مطالعه حاضر پنج گونه باکتریایی از ریشه اسپندک جداسازی شدند. جدایه‌های مورد تحقیق خصوصیات بیوشیمیایی باکتری‌های تسریع‌کننده گیاهان را نشان دادند. تعدادی از جدایه‌ها فعالیت ضدقارچی نشان دادند. در شرایط آزمایشگاهی یکی از جدایه‌ها موجب افزایش رشد اسپندک در مقایسه با تیمار شاهد و بقیه جدایه‌ها شد. بنابراین جدایه فوق شاید بتواند به عنوان کود زیستی به ویژه در شرایط سخت محیطی کاربرد داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید مدنی آذربایجان اعلام می‌کنند.

REFERENCES

Abdel-Hamid, R., Abilov, Z., Sultanova, N., Saitjanova, S. and Gemedzhieva, N. 2013. Preliminary phytochemical screening of *Zygophyllum fabago*. – Int. J. Biol. Chem. 6: 60-4.

Afzal, I., Shinwari, Z. and Iqrar, I. 2015. Selective isolation and characterization of agriculturally beneficial endophytic bacteria from wild hemp using canola. – Pak. J. Bot. 47: 1999-2008.

Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. – Microbiol. Res. 163: 173-181.

Antoun, H. 2013. Brenner's encyclopedia of genetics. – Elseivier, New York, 4368 pp.

Ashrafuzzaman, M., Hossen, F., Ismail, M., Hoque, A., Islam, M., Shahidullah, S. and Meon, S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. – Afr. J. Biotechnol. 8: 1247-1252.

Bartholomew, J. and Mittwer, T. 1950. A simplified bacterial spore stain. – Stain Technol. 25: 153-156.

Bhattacharyya, P. and Jha, D. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Emergence in agriculture. – World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 1327-1350.

Cherif-Silini, H., Silini, A., Yahiaoui, B., Ouzari, I. and Boudabous, A. 2016. Phylogenetic and plant-growth-promoting characteristics of *Bacillus* isolated from the wheat rhizosphere. – Ann. Microbiol. 66: 1087-1097.

Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. and Chet, I. 1995. Chitinolytic enterobacter agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. – Appl. Environ. Microbiol. 61: 1720-1726.

Dastager, S., Deepa, C. and Pandey, A. 2010. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp. NII-0909 and its interaction with cowpea. – Plant Physiol. Biochem. 48: 987-992.

Dawwam, G., Elbeltagy, A, Emara, H., Abbas, I. and Hassan, M. 2013. Beneficial effect of plant growth promoting bacteria isolated from the roots of potato plant. – Ann. Agric. Sci. 58: 195-201.

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. – Crit. Rev. Plant Sci. 22: 107-149.

Dworkin, M., and Foster, J. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. – J. Bacteriol. 75: 592-603.

Egamberdieva, D. 2010. Growth response of wheat cultivars to bacterial inoculation in calcareous soil. – Plant Soil Environ. 56: 570-573.

Faller, A., and Schleifer, K. 1981. Modified oxidase and benzidine tests for separation of *staphylococci* from *micrococci*. – J. Clin. Microbiol. 13: 1031-1035.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. – Evolution 39: 783-791.

Frank, J., Reich, C., Sharma, S., Weisbaum, J., Wilson, B., and Olsen, G. 2008. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA

genes. – Appl. Environ. Microbiol. 74: 2461-2470.

Gordon, S., Weber, R. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. – Plant Physiol. 26: 192-195.

Gusain, Y., Kamal, R., Mehta, C., Singh, U. and Sharma, A. 2015. Phosphate solubilizing and indole-3-acetic acid producing bacteria from the soil of Garhwal Himalaya aimed to improve the growth of rice. – J. Environ. Biol. 36: 301.

Hafeez, F., Yasmin, S., Ariani, D., Zafar, Y. and Malik, K. 2006. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. – Agron. Sustain. Dev. 26: 143-150.

Hopkins, W. and Huner, N. 2012. Introduction to plant physiology. – APS press, Minnesota, 528 pp.

Khan, M., Zaidi, A., and Wani, P. 2009. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture-a review. – Agron Sustain Dev. 27: 29-43.

Khan, S., Khan, A., Khan, A., Wadood, A., Farooq, U., Ahmed, A., Ahmed V. U., Sener, B. and Erdemoglu, N. 2014. Urease inhibitory activity of ursane type sulfated saponins from the aerial parts of *Zygophyllum fabago* Linn. – Phytomedicine 21: 379-382.

Kim, Y., Kotnala, B., Kim, Y. and Jeon, Y. 2016. Biological characteristics of *Paenibacillus polymyxa* GBR-1 involved in root rot of stored Korean ginseng. – J. Ginseng. Res. 40: 453-461.

Luna, M., Galar, M., Aprea, J., Molinari, M. and Boiardi, J. 2010. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter* diazotrophicus. – Biotechnol. Lett.. 32:1071-1076.

Majeed, A., Abbasi, M., Hameed, S., Imran, A. and Rahim, N. 2015. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. – Front. Microbiol. 6: 198.

Malboobi, M., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., Deljou, A., Morabbi Heravi, K., 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. – World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1471-1477.

Mishra, A., Chauhan, P., Chaudhry, V., Tripathi, M. and Nautiyal, C. 2011. Rhizosphere competent Pantoea agglomerans enhances maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, without altering the rhizosphere functional diversity. – Anton. Leeuw. Int. J.G. 100: 405-413.

Mufti, R., Amna Rafique, M., Haq, F., Hussain, M., Munis, M. F. H., Masood, S, Mumtaz A. S and Javed Chaudhary, H. 2015. Genetic diversity and metal resistance assessment of endophytes isolated from *Oxalis corniculata*. – Soil Environ. 34: 89-99.

Mumtaz, M., Ahmad, M., Jamil, M. and Hussain, T. 2017. Zinc solubilizing *Bacillus* spp. potential candidates for biofortification in maize. – Microbiol. Res. 202: 51-60.

Munimbazi, C., and Bullerman, L. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of Bacillus pumilus. – J. Appl. Microbiol. 84: 959-968.

Nicoara, A., Neagoe, A., Stancu, P., de Giudici, G., Langella, F., Sprocati, A. R., Iordache, V. and Kothe, E. 2014. Coupled pot and lysimeter experiments assessing plant performance in microbially assisted phytoremediation. – Environ. Sci. Pollut Res. 21: 6905-6920.

Pikovskaya, R., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. – Mikrobiologiya 17: 362-370.

Pirhadi, M., Enayatizamir, N., Motamedi, H. and Sorkheh, K. 2016. Screening of salt tolerant sugarcane endophytic bacteria with potassium and zinc for their solubilizing and antifungal activity. – Biosc. Biotech. Res. 9: 530-538.

Queipo-Ortuo, M., Colmenero, J., Macias, M., Bravo, M. and Morata, P. 2008. Preparation of bacterial DNA template by boiling and effect of immunoglobulin G as an inhibitor in real-time PCR for serum samples from patients with brucellosis. – Clin. Vaccine Immunol. 15: 293-296.

Raza, F., Amin, A. and Faisal, M. 2015. Desiccation-tolerant rhizobacteria from Cholistan desert, Pakistan, and their impact on *Zea mays* L. – Pol. J. Environ. 24: 1173-1181.

Satomi, M., La Duc, M. and Venkateswaran, K. 2006. *Bacillus safensis* sp. nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56: 1735-1740.

Sharma, S., Sharma, M., Ramesh, A. and Joshi, O. 2012. Characterization of zinc-solubilizing *Bacillus* isolates and their potential to influence zinc assimilation in soybean seeds. – J. Microbiol. Biotech. 22: 352-359.

Shrestha, A., Kim, B. and Park, D. 2014. Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper. – Biocontrol Sci. Technol. 24: 763-779.

Simons, M., Van Der Bij, A., Brand, I., De Weger, L., Wijffelman, C. and Lugtenberg, B. 1996. Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. – Mol. Plant Microbe Interact. 9: 600-607.

Son, H., Park, G., Cha, M. and Heo, M. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. – Bioresour. Technol. 97: 204-210.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods – Mol. Biol. Evol. 28: 2731-2739.

Taylor, W., Achanzar, D. 1972. Catalase test as an aid to the identification of Enterobacteriaceae. – Appl. Microbiol. 24: 58-61

Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Biagianti, S., and Aziz, A. 2008. Characterization of new bacterial biocontrol agents *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pantoea and Pseudomonas* spp. mediating grapevine resistance against Botrytis cinerea. – Environ. Exp. Bot. 64: 21-32.

Turan, M., Ekinci, M., Yildirim, E., GNE, A., Karaguz, K., Kotan, R., and Dursun, A. 2014. Plant growth-

promoting rhizobacteria improved growth, nutrient, and hormone content of cabbage (*Brassica oleracea*) seedlings. – Turk. J. Agric. For. 38: 327-333.

Twedt, R., Spaulding, P., and Hall, H. 1969. Morphological, cultural, biochemical, and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahemolyticus* with related cultures isolated in the United States. – J. Bacteriol. 98: 511-518.

Verma, P., Yadav, A., Kazy, S., Saxena, A. and Suman, A. 2014. Evaluating the diversity and phylogeny of plant growth promoting bacteria associated with wheat (*Triticum aestivum*) growing in central zone of India. – Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 3: 432-447.

Xu, J. 2014. Isolation and assessment of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria for use as biofertilizers. – Auburn University, Auburn, 145 pp.

Yoon, S., Ha, S., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y. Seo, H. and Chun, J. 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. – Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67: 1613-1617.

*****

How to cite this article:

Zadeh hosseingholi, E., Chaparzadeh, N. and Mahmudi Aghdam, S. 2020. Isolation and characterization of plant growth-promoting bacteria from Syrian bean caper (*Zygophyllum fabago*) rhizosphere. – Nova Biologica Rep. 6: 435-445. (In Persian)

زاده حسینقلی، ا.، چاپارزاده، ن. و محمودی اقدم.، س. ۱۳۹۸. جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد از ریشه سپهر گیاه اسپندک. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۴۴۵-۴۳۵.