رابطه خاک و گیاه / سال یازدهم / شماره چهارم / زمستان ۱۳۹۹ / صفحات ۱۰۰-۸۱ مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی ریزوباکتری‌های PGP از خاک‌های شور و بررسی تأثیر آن‌ها بر جذب عناصر غذایی در گندم تحت تنش شوری

زهرا روی‌دل[۱]، محسن برین[۱]، میرحسن رسولی صدقیانی[۱] و مریم خضری[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۸)

چکیده

این پژوهش به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد گیاهان (PGPR)، از خاک‌ها شور و ارزیابی تأثیر باکتری‌های جداسازی شده، قارچ‌های همزیست و اندوفیت بر غلظت برخی عناصر غذایی در گیاه گندم تحت تنش شوری در شرایط گلخانه اجرا شد. فاکتورها شامل تیمارهای میکروبی (باکتری PGP، قارچ میکوریز، قارچ اندوفیت و شاهد) و سطوح شوری (بدون شوری، ۸ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) بودند. در پایان دوره رشد، غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، سدیم، آهن، روی و منگنز گیاه و نیز درصد کلونیزاسیون ریشه گندم اندازه‌گیری شد. از بین ۱۰ جدایه خالص‌سازی شده، سه جدایه که دارای ویژگی‌های محرک رشدی بهتری بودند، مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی قرار گرفتند. نتایج نشان داد دو جدایه شناسایی‌شده از جنس *Pseudomonas* (جدایه Ur743 از گونه *Pseudomonas aeruginosa* و جدایه Ur745 از گونه *Pseudomonas fluorescens*) و جدایه Ur840 از گونه *Stenotrophomonas maltophilia* بود. نتایج آزمون گلخانه‌ای بیانگر آن بود که در سطح بدون شوری، قارچ میکوریز در جذب عناصر فسفر، آهن و منگنز بهتر از سایر تیمارهای میکروبی مؤثر بود. اما در بالاترین سطح شوری (۱۴ dS m^{-1}) باکتری‌های PGP، غلظت عناصر نیتروژن، فسفر، آهن و منگنز را در اندام هوایی به‌طور معنی‌دار نسبت به شاهد افزایش دادند. همچنین کاربرد باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد سبب افزایش ۱/۹۹، ۱/۷۱ و ۱/۳۷ برابری به‌ترتیب در غلظت پتاسیم، نسبت پتاسیم به سدیم و غلظت روی در مقایسه با شاهد شد. در مجموع ریزجانداران بومی جداسازی‌شده از خاک‌شور نسبت به سایر ریزجانداران در این پژوهش، سبب بهبود جذب عناصرغذایی و افزایش زیست‌توده گیاه گندم در شرایط تنش شوری شدند.

واژه‌های کلیدی: تلقیح میکروبی، باکتری محرک رشد گیاه، کلونیزاسیون ریشه، قارچ میکوریز، قارچ اندوفیت

مقدمه

شوری و تنش ناشی از آن، یکی از مهم‌ترین و رایج‌ترین تنش‌های محیطی است که تولید کشاورزی را در کشور با محدودیت مواجه ساخته است. عدم تعادل یونی ایجادشده توسط شوری بر فراهم بودن عناصر غذایی، رقابت در جذب و انتقال این عناصر در گیاه نقش به‌سزایی دارد (۱۱). به‌گونه‌ای که رشد، فتوسنتز و سایر فعالیت‌های متابولیسمی در گیاه را تحت تأثیر خود قرار می‌دهد (۲۳). سمّیت یون‌هایی مانند سدیم

۱. گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲. موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.barin@urmia.ac.ir

و کلرید و نیز کاهش پتانسیل آب موجود در خاک شور رشد و توسعه گیاهان در این خاک‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۲۹). شوری موجب کاهش رشد ریشه شده و منجر به کاهش جذب فسفر توسط گیاه می‌شود (۱۶). در بافت‌های گیاهی زیادی نسبت پتاسیم به سدیم به‌عنوان یکی از ویژگی‌های فیزیولوژیک مهم در ایجاد تحمل به شوری در برخی گونه‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته است. افزایش یون سدیم در محیط ریشه سبب کاهش میزان جذب یون پتاسیم و پایین آمدن نسبت پتاسیم به سدیم می‌شود (۱۲). اشرف و مکنیلی (۹) به این نتیجه رسیدند که گیاهان متحمل به شوری در هنگام مواجه با شوری دارای غلظت سدیم و کلرید کمتر و بالعکس غلظت پتاسیم و کلسیم بیشتر در بخش هوایی خود بودند؛ در نتیجه گیاهان متحمل به شوری در مقایسه با گیاهان حساس، نسبت کلسیم به سدیم و پتاسیم به سدیم بیشتری دارند. همچنین، شوری خاک سبب کاهش جمعیت و فعالیت ریزجانداران ساکن خاک شده و از این راه بر فراهمی عناصر غذایی مختلف تأثیر می‌گذارد (۲۴).

کاربرد و تلقیح ریزجاندارانی مانند باکتری‌های ریزوسفری بهبوددهنده رشد گیاه (PGPR[1]) و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AMF[2]) و اندوفیت برای محصولاتی که در زمین‌های شور کشت شده‌اند، می‌تواند موجب کاهش اثر شوری شده و برای بهبود رشد گیاه مفید واقع شود (۱۳، ۴۳ و ۶۸). ریزجانداران از راه مکانیسم‌های انتخابی، سبب بهبود جذب یون‌ها و عناصر غذایی (۲۹)، کلونیزاسیون ریشه، ایجاد تعادل یونی (۲۵)، بهبود فتوسنتز (۵) و جذب آب (۱۰) در گیاه می‌شوند، و تحمل گیاه را در برابر شوری خاک افزایش می‌دهند. قارچ‌های میکوریز نیز با جلوگیری از جذب سدیم و کلرید و یا انتقال کم‌تر آن‌ها به بخش هوایی گیاه به عنوان یک اصلاح کننده زیستی در خاک شور عمل می‌کنند (۵). قارچ *Pirimospora indica* قادر به تحمل شوری زیاد ناشی از کلرید سدیم است (۶۸). برخی پژوهش‌ها نشان داده است که باکتری‌های PGP جداسازی شده از مناطق شور به میزان زیاد نمک مقاومت نشان می‌دهند (۴۳)، و از طریق تنظیم اسمزی، از بین بردن تأثیر سمّی یون سدیم و فتوسنتز بیش‌تر باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر تنش شوری می‌شوند (۳۸).

گیاه گندم با حد آستانه حدود ۶ دسی‌زیمنس بر متر، به‌عنوان یکی از محصولات استراتژیک در ایران و جهان شناخته می‌شود و به دلیل سازگاری ژنوتیپ های آن با شرایط محیطی مختلف، در مناطق وسیعی از جهان با آب و هوای متنوع کشت می‌شود (۸). در سال های اخیر، پسروی دریاچه ارومیه منجر به افزایش مساحت شوره‌زارهای اطراف آن شده است که این امر مهم باعث تغییر اقلیم و آثار زیست‌محیطی زیادی در منطقه شده است (۱۳ و ۱۵). این پژوهش با فرض اینکه باکتری‌های محرک رشد جداسازی شده از خاک شور می‌توانند رشد گیاه را در شرایط شور، بهبود ببخشند اجرا شد. برای اثبات این فرضیه پژوهش حاضر با هدف جداسازی باکتری‌های محرک رشد گیاه از خاک‌های شور اطراف دریاچه ارومیه و ارزیابی تأثیر این باکتری‌ها به همراه قارچ‌های همزیست و اندوفیت بر بهبود جذب برخی عناصر غذایی کم‌مصرف و پرمصرف در گیاه گندم در شرایط تنش شوری انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

- جداسازی PGPRها از ریزوسفر از ریزوسفر گیاهان علفی بومی حاشیه دریاچه ارومیه

به‌منظور جداسازی باکتری‌هایPGP ، تعداد ۳۰ نمونه خاک ریزوسفر از گیاهان علفی بومی از زمین‌های شور حاشیه دریاچه ارومیه، واقع در استان آذربایجان غربی برداشت شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، بخشی از نمونه‌های خاک ریزسفری از اطراف ریشه گیاهان مختلف جداسازی شد. سپس نمونه‌های خاک در آزمایشگاه به روش سری رقت‌های ده‌تایی با آب مقطر سترون تا رقت 10^{-4} رقیق شده و ۵۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-3} و 10^{-4} بلافاصله در محیط کشت نوترینت آگار (NA) کشت شد. پلیت‌های کشت‌شده به‌مدت سه شبانه‌روز در دمای

1. Plant growth promoting rhizobacteria
2. Arbuscular mycorrhizal fungi

۲۸ درجه سلسیوس در گرماخانه نگهداری شدند. تعداد ۱۵ کلنی باکتری که ویژگی‌های ریخت‌شناسی متفاوتی را نشان دادند، برای ادامه آزمایش‌ها انتخاب شدند.

– خالص‌سازی و نگهداری باکتری‌های PGP

برای خالص‌سازی جدایه‌های انتخاب شده، کشت ۱۶ خطی جدایه‌ها روی محیط کشت NA انجام شد و پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. بازکشت جدایه‌ها سه بار تکرار شد. پس از رشد، یک کلنی خالص باکتری‌ها برای هر جدایه انتخاب شد.

برای نگهداری کوتاه‌مدت باکتری‌ها، هر جدایه روی محیط کشت مورب درون لوله آزمایش کشت شد. پس از رشد کلنی باکتری، به لوله‌ها گلیسرول سترون افزوده شد و لوله‌ها در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای نگهداری بلندمدت باکتری‌ها، سوسپانسیون کلنی خالص باکتری در محلول گلیسرول ۲۵ درصد تهیه شد و در دمای ۸۰– درجه سیلسیوس نگهداری شد (۵۱).

برخی از ویژگی‌های PGPR جدایه‌ها به شرح زیر بررسی شد:

– ارزیابی کیفی توانایی انحلال فسفات نامحلول در محیط (NBRIP)

برای بررسی توانایی کیفی انحلال فسفات نامحلول معدنی جدایه‌ها، از محیط کشت NBRIP[1] (۱۰ گرم گلوکز، ۲/۵ گرم تری‌کلسیم فسفات، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر، pH= ۷/۲) استفاده شد. برای هر جدایه باکتری یک پلیت حاوی این محیط کشت در نظر گرفته شد. سطح هر پلیت به چهار قسمت مساوی تقسیم شد و مرکز هر قسمت با ۵ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری رشدیافته در محیط نوترینت براث (NB) تلقیح شد. پلیت‌های تلقیح‌شده در گرماخانه با دمای ۲۸ درجه سیلسیوس گرماگذاری شدند. قطر کلنی رشد یافته و نیز قطر هاله شفاف اطراف کلنی که حاصل از انحلال تری‌کلسیم فسفات بود، اندازه‌گیری شد. در نهایت شاخص حلالیت به‌صورت قطر هاله تقسیم بر قطر کلنی برای جدایه‌های باکتریایی محاسبه شد (۵۸).

– ارزیابی کمی توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول در محیط NBRIP مایع

برای این منظور، جدایه‌های منتخب در محیط کشت مایع NBRIP کشت شدند. از کشت شبانه باکتری رشد یافته در محیط NB، مقدار ۲ درصد حجمی در ارلن‌های حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NBRIP با منبع فسفات نامحلول (تری‌کلسیم فسفات ($Ca_3(PO_4)$) به مقدار ۵ گرم در لیتر) تلقیح شد. ارلن‌های حاوی محیط تلقیح‌شده به‌مدت حدود ۱۰ روز در گرماخانه شیکردار (۱۲۰ rpm) و دمای ۲۸ درجه سیلسیوس قرار داده شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از هر محیط کشت برداشته شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد، تا در محلول شفاف به‌دست‌آمده غلظت فسفر محلول اندازه‌گیری شود. اندازه‌گیری غلظت فسفر با روش مولیبدات وانادات انجام شد (۲۱).

– ارزیابی کیفی توانایی انحلال میکا

برای بررسی توانایی کیفی انحلال میکا، برای هر جدایه باکتری یک پلیت حاوی محیط کشت الکساندروف (ساکارز ۵ گرم در لیتر، فسفات کلسیم ۲ گرم در لیتر، کلرید آهن III ۰/۰۰۵گرم در لیتر، سولفات منیزیم .هفت آبه ۰/۵ گرم در لیتر، کربنات کلسیم ۰/۱ گرم در لیتر، آگار ۲۰ گرم در لیتر، میکا ۲ گرم در لیتر و pH برابر با ۷/۵) در نظر گرفته شد (۳۱). سطح هر پلیت به چهار قسمت مساوی تقسیم شد و مرکز هر قسمت با پنج میکرولیتر از کشت شبانه باکتری رشدیافته در محیط NB تلقیح شد. پلیت‌های تلقیح شده در گرماخانه در دمای ۲۸ درجه سیلسیوس نگه‌داری شد. قطر کلنی رشد یافته و نیز قطر هاله شفاف اطراف کلنی اندازه‌گیری شد. شاخص حلالیت به صورت قطر هاله تقسیم بر قطر کلنی برای هر جدایه باکتری محاسبه شد.

1. National Botanical Research Institutes Phosphate

– تولید اکسین

به منظور بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت NB کشت داده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط NB حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ال-تریپتوفان منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۴۸ درجه سلسیوس نگه داری شد. سپس چند قطره معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ۶ آبه ۰/۵ مولار) به سوسپانسیون افزوده شد. ایجاد حلقه قرمز رنگ در قسمت رویی محلول، به عنوان جواب مثبت و عدم تشکیل حلقه قرمز رنگ جواب منفی در نظر گرفته شد (۱۷).

– تولید سیدروفور

برای اندازه گیری تولید سیدروفور از تلقیح جمعیت تنظیم‌شده باکتری‌ها در محیط CAS[1] _ آگار استفاده شد. تهیه این محیط بر اساس روش اصلاح‌شده الکساندر و زوبرر (۲) است. برای تهیه این محیط، محلول Fe_CAS، بافر غذایی و کازوآمینواسید به‌طور مجزا تهیه و سترون شده و سپس با هم مخلوط شدند. پس از جامدشدن محیط کشت، مقدار ۵ میکرولیتر از کشت شبانه باکتری رشدیافته در محیط NB، به‌صورت نقطه‌ای در مرکز پلیت‌ها تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. تغییر رنگ محیط CAS_آگار از آبی به نارنجی نشان‌دهنده توانایی تولید سیدروفور توسط باکتری‌ها است.

– آزمون شوری

به‌منظور سنجش رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف نمک، محیط کشت حداقل معدنی[2] با غلظت‌های صفر، ۲، ۵، ۷ و ۱۰ درصد کلرید سدیم تهیه شد. از کشت شبانه باکتری رشدیافته در محیط NB به میزان ۲ درصد حجمی سوسپانسیون باکتریایی به محیط کشت مایع دارای نمک تلقیح شد. کدورت و تغییر رنگ ناشی از رشد پس از ۷۲ ساعت با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد (۴۳).

– انتخاب باکتری‌های برتر برای شناسایی فنوتیپی و مولکولی

با توجه به نتایج آزمون‌های انجام‌شده شامل حل کنندگی فسفر و پتاسیم، تولید ایندول استیک اسید و سیدروفور، از مجموع ده جدایه خالص‌سازی‌شده، سه جدایه که از لحاظ ویژگی‌های و قابلیت‌های باکتری‌های PGP برتر از سایرین بودند به‌عنوان جدایه‌های منتخب در نظر گرفته شدند و مورد شناسایی فنوتیپی و مولکولی قرار گرفتند. همچنین از این سه جدایه در آزمون گلخانه‌ای نیز استفاده شد.

– شناسایی فنوتیپی و مولکولی جدایه‌های منتخب

بررسی برخی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های برتر بر اساس کلیدهای معتبر باکتری‌شناسی انجام شد (۵۲). این آزمون‌ها شامل رنگ‌آمیزی گرم، رشد هوازی/ بی‌هوازی، تحرک، اکسیداز، کاتالاز، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ‌بی، تولید اندوسپور، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین و سیترات بودند.

شناسایی مولکولی و باکتری‌های ریزوسفری برتر حل-کننده فسفات با استفاده از آغازگرهای عمومی طراحی‌شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA انجام شد. بدین منظور، DNA ژنومی جدایه‌های انتخاب‌شده با استفاده از روش لوپ و همکاران (۳۷) استخراج شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (۶۴) انجام شد. هر واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر با ترکیب ۱۲ میکرولیتر مخلوط آماده واکنش – PCR Master Mix Red (Ampliqon-Denmark) $MgCl_2$ 180301-50، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ پیکومول بر میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر DNA الگو (۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و آب مقطر سترون

1. Chrome Azurol S
2.Tris Minimal

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این آزمایش.

Table 1. Some physical and chemical properties of the soil used in this study.

بافت خاک Soil texture	واکنش خاک pH	رسانایی الکتریکی EC ($dS\ m^{-1}$)	کربن آلی OC	کربنات کلسیم معادل $CaCO_3$ (%)	فسفر قابل جذب P	پتاسیم قابل جذب K_{ava} ($mg\ kg^{-1}$)
لوم رسی Clay loam	7.69	0.50	0.50	19.5	7.40	194

انجام شد. تکثیر قطعه مورد نظر به‌صورت چندمرحله‌ای شامل واسرشت اولیه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس در ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل که هر کدام شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت رشته DNA، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۲ درجه سلسیوس برای اتصال آغازگرها به DNA الگو و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای توسعه رشته DNA جدید و در نهایت بسط نهایی رشته DNA ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی ژل انجام شد. خالص‌سازی محصول PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی شد. تعیین ترادف محصول PCR، با ارسال قطعه تکثیرشده و آغازگرهای مورد استفاده به شرکت بایونیر کره جنوبی صورت گرفت. استخراج و اصلاح توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار Chromase انجام شد. دو توالی پیشرو و پسرو از یک جدایه با استفاده از نرم‌افزار Main Workbench8 CLC هم‌ردیف‌سازی و تنظیم شدند. مقایسه میزان قرابت جدایه‌های این بررسی با جدایه‌های نزدیک به آن‌ها و شناسایی گونه جدایه‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) با جستجوی در BLAST (Basic Local Alignment) انجام شد.

– آزمایش گلخانه‌ای

این پژوهش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی، در سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل شوری (بدون شوری، ۸ و ۱۴ دسی‌زمینس بر متر) و تلقیح میکروبی (PGPR،AMF، قارچ اندوفیت *Serendipita indica* و شاهد) بود. خاک مورد استفاده برای آزمایش گلخانه‌ای، از عمق ۳۰- ۰ سانتی‌متری زمین‌های دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه تهیه شده و پس از هوا–خشک‌کردن از الک با اندازه چشمه ۴ میلی‌متر عبور داده شد. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (۵۶) (جدول ۱)، و سپس در گلدان‌های پلاستیکی ۵ کیلوگرمی ریخته شد. برای تلقیح میکروبی از باکتری‌های جداسازی شده از خاک ریزوسفری (۳ جدایه) که شامل باکتری‌های PGP (ترکیبی از گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa*، *Pseudomonas fluorescens* و *Stenotrophomonas maltophilia*) و نیز قارچ اندوفیت (*S. indica*) و قارچ میکوریز (ترکیبی سه گونه *Rhizophagus irregularis*، *Rhizophagus fasciculatus* و *Diversispora versiformis*) تهیه‌شده از بانک میکروبی گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه ارومیه استفاده شد.

به‌منظور بررسی آثار آنتاگونیستی گونه‌های باکتری جداسازی‌شده از خاک ریزوسفری (۳ جدایه مورد استفاده در آزمایش گلخانه‌ای)، برخی آزمایش‌ها شامل کدورت‌سنجی، انحلال ترکیبات نامحلول فسفات و جوانه‌زنی بذور پیش از استفاده انجام شد (۳۵). برای تلقیح بذرها با باکتری‌ها و قارچ اندوفیت از روش غوطه‌ورکردن و شیک‌کردن بذرهای جوانه‌دارشده به‌مدت ۲ ساعت در مایه تلقیح به‌ترتیب با جمعیت میکروبی 10^{-8} (سلول در هر میلی‌لیتر) و 10^{-5} (اسپور در میلی‌لیتر) استفاده شد. بذور پس از تکان‌دادن،

صاف شده، در زیر جریان سترون هود میکروبی خشک شده و همان روز کشت شدند. در تیمارهای قارچ میکوریز، مقدار ۶۰ گرم مایه تلقیح (شامل مجموع سه قارچ) به زیر بذور ریخته شد. در تیمارهای شاهد از مایه تلقیح سترون‌شده استفاده شد. در هر گلدان تعداد ۱۰ عدد بذر گندم رقم افق پس از انجام ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد، کشت شد. سطوح مختلف شوری با افزودن کلرید سدیم در مقدار و حجم مشخص برای هر تیمار انجام شد. در آزمایش‌های اولیه کلرید سدیم در سطوح ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸ و ۱ گرم در ۱۵۰ میلی‌لیتر آب حل شده و سپس به هرکدام از گلدان‌هایی که حاوی ۵۰۰ گرم خاک خشک‌شده بودند، افزوده شد و به حد اشباع رسید. پس از ۲۴ ساعت رسانایی الکتریکی (EC) در خاک فوق اندازه‌گیری شد. EC اندازه‌گیری‌شده با سطوح کلرید سدیم که از پیش مشخص شده بود به خاک افزوده شد. یک رگرسیون خطی به‌دست آمد که با استفاده از آن مقدار کلرید سدیم مورد نیاز برای سطوح شوری مورد نظر محاسبه شد. پس از اتمام کاشت بذور، تیمار شوری در طی دو هفته به گلدان‌ها اعمال شد (۳). ۱۰ روز پس از سبزشدن بذرها، تعداد ۳ بوته سالم‌تر و قوی‌تر در هر گلدان نگهداری و سایر بوته‌ها حذف شدند.

پس از ۶۰ روز عملیات برداشت انجام شد. بخش هوایی و ریشه گیاه پس از شستشو با آب مقطر به‌مدت ۴۸ ساعت در آون و در دمای ۶۵ درجه سلسیوس خشک شدند. سپس نمونه‌ها برای تعیین عناصر آسیاب شده و از الک ۰/۵ میلی‌متری عبور داده شدند. هضم اندام هوایی گیاه برای فسفر، پتاسیم سدیم، کلسیم، آهن، روی و منگنز به روش خشک سوزانی تعیین شد (۶۴). در عصاره‌های به‌دست آمده غلظت فسفر به روش رنگ‌سنجی در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر، غلظت سدیم و پتاسیم موجود در عصاره‌ها به روش نشر اتمی با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر، غلظت کلسیم به روش کمپلکسومتری، و غلظت آهن، روی و منگنز به روش جذب اتمی با استفاده از دستگاه جذب اتمی تعیین شد. همچنین غلظت نیتروژن اندام‌های هوایی با روش کجلدال تعیین شد. برای ارزیابی درصد کلونیزاسیون ریشه‌ها بر اساس روش فیلیپس و هایمن (۴۷) رنگ‌آمیزی شدند و سپس ۱۰۰ قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌های رنگ‌آمیزی‌شده به‌منظور ارزیابی درصد کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ‌ها به‌صورت تصادفی انتخاب شدند و زیر میکروسکوپ قطعاتی از ریشه که توسط قارچ کلونیزه شده بود بررسی شد (۱۸). تجزیه و تحلیل آماری با نرم‌افزار SPSS، رسم نمودارها با نرم‌افزار Execl و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

– جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد گیاه

از بین ۳۰ نمونه خاک برداشت‌شده از زمین‌های شور حاشیه دریاچه ارومیه، تعداد ۱۰ جدایه باکتری جداسازی و خالص‌سازی شد. سه جدایه بر اساس آزمون‌های اختصاصی PGPR (حل‌کنندگی پتاسیم و فسفر، تولید سیدروفور و تولید ایندول استیک اسید) برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند (جدول ۲). نتایج نشان داد که این سه جدایه از توانایی حل‌کنندگی فسفات در محیط جامد و مایع برخوردار بودند (جدول ۲). در محیط جامد و مایع NBRIP، جدایه Ur745 بیش‌ترین توان حل‌کنندگی فسفر را نشان دادند. ابراهیمی و همکاران (۲۲) ۵۰ جدایه باکتری را جداسازی کرده و از نظر توانایی حل فسفات‌های نامحلول مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که بیش‌تر جدایه‌ها قادر به انحلال فسفر نامحلول بودند.

تمامی جدایه‌ها از توانایی حل‌کنندگی پتاسیم نیز برخوردار بودند. جدایه Ur743 بیش‌ترین مقدار حل‌کنندگی پتاسیم را به خود اختصاص داد. از جمله دلایل احتمالی انحلال ترکیبات نامحلول پتاسیم و فسفر، می‌توان به تولید اسیدهای آلی و معدنی، کلات و آنزیم‌هایی توسط این ریزجانداران اشاره

جدول ۲. نتایج آزمون‌های PGPR و مقاومت به شوری جدایه‌ها.

Table 2. Results of PGPR tests and salinity resistance of the isolates.

Ur840 *Stenotrophomonas maltophilia*	Ur745 *Pseudomonas fluorescens*	Ur743 *P*seudomonas *aeruginosa*	جدایه Microbial strains
1.2	3.4	3	شاخص حلالیت فسفر نامحلول Insolubility index of the insoluble phosphorus
2.16	26.29	24.04	حل‌کنندگی ترکیب نامحلول فسفر در محیط مایع Solubility of the insoluble phosphorus compound in the liquid medium (µg/ml)
3.5	3.3	4.16	شاخص حلالیت پتاسیم نامحلول Solubility index of the insoluble potassium
+	+	-	تولید اکسین Auxin production
-	+	+	تولید سیدروفور Siderophore production
+	+	+	تحمل به شوری (تا ۱۰ ٪) Tolerance to salinity (Up to 10%)

کرد (۱۵ و ۲۲). مویرا و همکاران (۴۲) تعداد زیادی از ریزجانداران را جداسازی کردند که پتانسیل آزادسازی یون‌های فلزی از منابع سیلیکات‌ها، سنگ و خاک‌ها را داشتند. آن‌ها همچنین بیان داشتند که این ریزجانداران اسید سیتریک و اسید اگزالیک که به‌طور عمده در تجزیه یا انحلال سیلیکات‌های طبیعی و در انتقال یون‌های فلزی در خاک مؤثرند را تولید می‌کنند. از لحاظ تولید ایندول استیک اسید تنها جدایه‌های Ur745 و Ur840 این توانایی را داشتند. در ارزیابی سیدروفور نیز تنها جدایه‌های Ur743 و Ur745 سیدروفور مثبت بودند (جدول ۲). تائوریان و همکاران (۶۱) نیز پس از ارزیابی ۱۱۰ حل‌کننده فسفات، آن‌ها را از لحاظ تولید سیدروفور مورد بررسی قرار داده و دریافتند که بیش از ۷۰ درصد این سویه‌ها دارای توان تولید سیدروفور هستند. لازم به‌ذکر است که سودوموناس‌ها بیش‌ترین تعداد جمعیت را نسبت به سایر باکتری‌ها در ریزوسفر دارند. در بررسی مقاومت به غلظت نمک و شوری، هر سه این جدایه‌ها در میزان‌های ۲، ۵، ۷ و ۱۰ درصد غلظت نمک به‌خوبی رشد کردند و از توانایی تحمل به شوری برخوردار بودند. با توجه به نتایج حاصل از آزمون‌های PGPR، جدایه‌های Ur743، Ur745 و Ur840 به‌عنوان جدایه‌های برتر انتخاب شدند. از این‌رو این جدایه‌ها شناسایی مولکولی شده و در کشت گلدانی مورد استفاده قرار گرفتند.

بر اساس نتایج آزمون‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک انجام‌شده در این پژوهش، هر سه جدایه برتر گرم منفی بودند. نتایج آزمون‌های فنوتیپی جدایه‌های برتر این بررسی در جدول (۳) آورده شده است.

نتایج شناسایی مولکولی و مقایسه توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های برتر این بررسی با توالی‌های ثبت‌شده در بانک اطلاعات ژنی (GenBank) نشان داد جدایه‌های Ur743 و Ur745 به‌ترتیب با جدایه‌هایی از گونه‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fluorescens* ثبت‌شده در Gen Bank بین ۹۹ تا ۱۰۰ درصد مشابهت نشان دادند. جدایه Ur840 نیز با توالی‌های ثبت شده از گونه *Stenotrophomonas maltophilia* ۱۰۰ درصد شباهت داشت. روش‌های مبتنی بر آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی در شناسایی باکتری‌ها زمان‌بر بوده و در برخی موارد این روش‌ها قادر به تمایز جدایه‌های

جدول ۳. ویژگی‌های فنوتیپی باکتری‌های ریزوسفری برتر در این آزمایش.

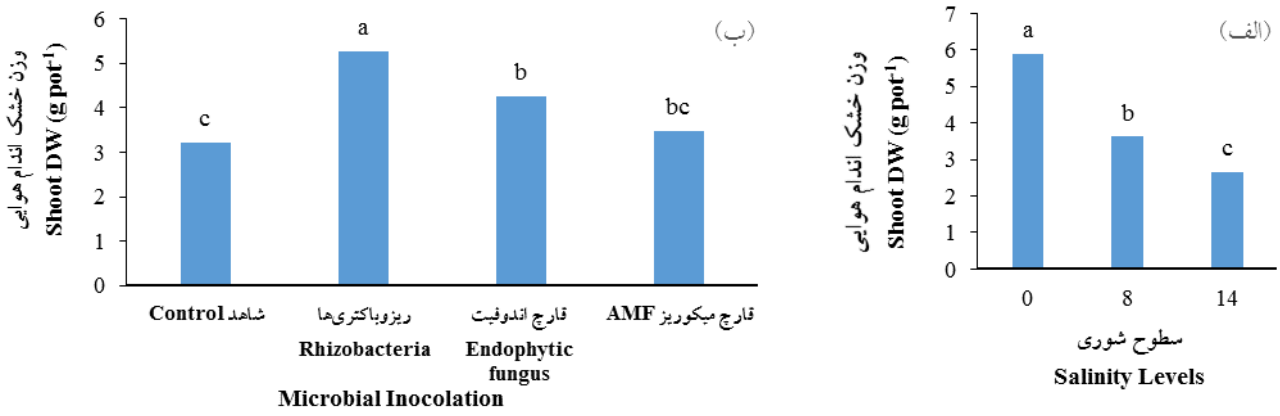
Table 3. Phenotypic characteristics of the superior rhizobacteria used in this study.

جدایه Strains	Ur743 *P*seudomonas *aeruginosa*	Ur745 *Pseudomonas fluorescens*	Ur840 *Stenotrophomonas maltophilia*
رنگ‌آمیزی گرم Gram staining	–	–	–
رشد هوازی اجباری Obligate aerobic growth	+	+	+
تحرک Mobility	+	+	+
اکسیداز Oxidase	+	+	+
کاتالاز Catalase	+	+	+
تولید رنگدانه فلورسنت Production of fluorescent pigments	+	+	–
تولید اندوسپور Endospore production	–	–	–
هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis	+	+	+
سیترات Citrate	+	+	+

نزدیک به هم نیستند. بنابراین در سال‌های اخیر، شناسایی جدایه‌های باکتریایی با روش‌های مولکولی مورد توجه قرار گرفته است. مقایسه توالی ژن 16S rRNA در بین باکتری‌ها، یکی از ابزارهای کاربردی در شناسایی و پژوهش‌های نسب‌شناختی این ریزجانداران است (۴۱). در این پژوهش دو جدایه از سه جدایه برتر از جنس *Pseudomonas* بودند. رسولی‌صدقیانی و همکاران (۵۱) در پژوهشی نشان دادند که جنس *Pseudomonas* از جمله مهم‌ترین باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه هستند. آنها از ۵۲ نمونه خاک ریزوسفری، ۲۰۱ جدایه منسوب به جنس *Pseudomonas* جداسازی و خالص‌سازی کرده و بیان داشتند که تراکم جمعیت این باکتری‌ها از $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$ تا ۶×۱۰^{۶} سلول باکتری در هر گرم خاک ریزوسفر متغیر است. با توجه به نتایج آزمون‌های فنوتیپی و ژنتیکی انجام‌شده، جدایه‌های برتر این پژوهش مربوط به گونه‌های *P. aeruginosa*، *P. fluorescens* و *S. maltophilia* شناسایی شدند (جدول ۳).

– اثر تلقیح میکروبی در سطوح مختلف شوری بر میزان برخی عناصر غذایی در اندام هوایی گندم

نتایج تجزیه واریانس نشان‌دهنده معنی‌داری اثر اصلی سطوح شوری بر وزن خشک اندام هوایی و تمامی غلظت‌های عناصر غذایی اندازه گیری‌شده بخش هوایی گیاه در سطح ۰/۱ درصد بود. اثر اصلی تلقیح میکروبی نیز بر وزن خشک اندام هوایی و غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم، آهن، روی و منگنز در سطح ۰/۱ درصد و نسبت پتاسیم به سدیم بخش هوایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد. اثر برهم‌کنش این تیمارها بر غلظت نیتروژن و فسفر در سطح ۱ درصد، و غلظت آهن و منگنز در سطح ۵ درصد معنی‌دار شد.



شکل ۱. مقایسه میانگین آثار اصلی: الف) سطوح شوری و ب) تلقیح میکروبی بر وزن خشک اندام هوایی (g pot^{-1})؛ ستون‌های دارای حرف مشترک در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار ندارند.

Fig. 1. Mean comparisons of the main effects of salinity levels (a) and microbial inoculation (b) on the shoot dry weight (Shoot DW, g pot^{-1}); Columns with similar letters are not significantly different at 5% probability level according to the Duncan test.

وزن خشک اندام هوایی

مقایسه میانگین اثر سطوح شوری بر وزن خشک اندام هوایی نشان داد که بیش‌ترین (۵/۸۷ گرم در گلدان) و کم‌ترین (۲/۶۶ گرم در گلدان) مقدار وزن خشک اندام هوایی به‌ترتیب در سطح اول و سطح سوم شوری به‌دست آمد (شکل ۱-الف). در بین تیمارهای تلقیح میکروبی بیش‌ترین (۵/۲۸ گرم در گلدان) و کم‌ترین (۳/۲۰ گرم در گلدان) مقدار وزن خشک اندام هوایی به‌ترتیب متعلق به تیمار تلقیح باکتریایی و شاهد بود (شکل ۱-ب). تیمارهای میکروبی قارچ اندوفیت نسبت به میکوریز تأثیر بیشتری در افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه داشته است. در کل با افزایش میزان شوری، وزن خشک اندام هوایی در تمامی ترکیب‌های تیماری کاهش یافت که آن را می‌توان به تغییر در انتقال فرآورده‌های فتوسنتزی به ریشه‌ها، کاهش محتوای آب نسبی برگ و بسته‌شدن جزئی یا کلی روزنه‌ها و نیز عدم توازن یونی، تجمع یون‌های سدیم و کلرید و یا تخریب ساختمان کلروپلاست در گیاهان نسبت داد (۱۲). در رابطه با تأثیر مثبت باکتری‌های محرک رشد می‌توان بیان داشت که باکتری‌ها از راه سازوکارهای مختلف، از جمله تولید سیدروفور، افزایش جذب فسفر توسط گیاه، تثبیت نیتروژن و سنتز آنزیم‌هایی که مقدار اتیلن را در گیاه تنظیم می‌کنند سبب تحریک رشد گیاه می‌شوند (۵۷). همچنین باکتری‌ها از راه افزایش تولید متابولیت های محرک رشد مانند جیبرلین، سیتوکینین و اکسین می توانند باعث افزایش توسعه ریشه و به تبع آن افزایش جذب مواد غذایی و هم چنین افزایش فتوسنتز شود و از این راه تجمع ماده خشک در گیاه را افزایش دهد (۶۳). قارچ *سرندیپتا اندیکا* احتمالاً با افزایش در محتوای آب نسبی برگ‌ها در اثر تجمع اسمولیت‌های آلی و افزایش محتوای کلروفیل برگ توانست وزن زیتوده گیاهی را افزایش دهد (۲۷). افزایش مقدار ماده خشک در اندام هوایی گیاه در حضور قارچ‌های میکوریز نسبت به شاهد می‌تواند به‌دلیل افزایش جذب عناصر و یا بهبود جذب آب در این گیاهان باشد (۱)

– غلظت نیتروژن در گیاه

مقایسه میانگین داده‌های حاصل از آزمایش نشان داد که با افزایش شوری میزان نیتروژن گیاه به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. به‌گونه‌ای که کم‌ترین میزان نیتروژن در تیمار با شوری سطح ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر به‌دست آمد. همچنین مقایسه میانگین نشان داد که در بین تیمارهای میکروبی در سطوح شوری اعمال‌شده (۸ و ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر) بیش‌ترین و کم‌ترین غلظت نیتروژن اندام هوایی به ترتیب مربوط به تیمار باکتری و تیمار شاهد بود هر چند بین تیمار باکتری و اندوفیت

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش شوری و تلقیح میکروبی بر غلظت برخی عناصر غذایی در بخش هوایی گیاه گندم.

Table 4. Mean comparisons of the interaction effect of salinity and microbial inoculation on the concentration of some nutrients in the wheat shoot.

منگنز Mn (mg/kg)	آهن Fe (mg/kg)	فسفر P (%)	نیتروژن N (%)	تلقیح میکروبی Microbial inoculation	شوری ($dS\ m^{-1}$) Salinity
8.70^{d}	161.60^{bc}	0.11^{e}	1.64^{cd}	شاهد Control	
28.60^{a}	187.35^{a}	0.47^{a}	2.06^{b}	ریزوباکتری‌ها Rhizobacteria	بدون شوری EC=0
18.71^{bc}	170.68^{b}	0.34^{b}	2.52^{a}	قارچ اندوفیت Endophytic fungus	
25.37^{a}	191.88^{a}	0.48^{a}	2.13^{b}	قارچ میکوریز AMF	
4.71^{e}	134.30^{e}	0.09^{e}	1.26^{ef}	شاهد Control	
20.75^{b}	160.81^{c}	0.09^{e}	2.87^{bc}	ریزوباکتری‌ها Rhizobacteria	شوری ۸ EC=8
15.85^{c}	145.85^{d}	0.19^{d}	1.49^{de}	قارچ اندوفیت Endophytic fungus	
16.99^{bc}	169.61^{bc}	0.17^{c}	1.38^{def}	قارچ میکوریز AMF	
3.23^{e}	111.41^{f}	0.04^{f}	1.06^{g}	شاهد Control	
15.47^{c}	145.36^{d}	0.10^{e}	1.32d^{ef}	ریزوباکتری‌ها Rhizobacteria	شوری ۱۴ EC=14
9.17^{d}	119.74^{f}	0.10^{e}	1.18^{ef}	قارچ اندوفیت Endophytic fungus	
11.63^{d}	131.64^{e}	0.11^{e}	1.16^{ef}	قارچ میکوریز AMF	

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

In each column, means with similar letters are not significantly different at 5% probability level according to the Duncan test.

اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴). برخی پژوهشگران رقابت یون‌های کلرید و نیترات برای جذب توسط گیاه را بررسی کرده و بیان کردند که رقابت موجود بین یون‌های مذکور به پتانسیل منفی سلول‌های ریشه، بار منفی این یون‌ها (کلرید و نیترات) و جذب یون‌ها توسط سیستم‌های ناقل یکسان مرتبط است (۳۰). کارلیداق و همکاران (۳۳) بیان داشتند که باکتری‌های محرک رشد گیاه از راه محدودنمودن جذب کلرید منجر به افزایش جذب نیترات در گیاه می‌شوند. برخی دیگر از پژوهشگران افزایش فعالیت نیترات رداکتاز توسط باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد را عامل افزایش جذب نیتروژن در گیاهچه‌های گندم و اسفناج مطرح کرده‌اند (۱۹). همچنین قارچ‌های اندوفیت و میکوریز از راه افزایش تارهای کشنده و گسترش سیستم ریشه‌ای و در نتیجه افزایش سطح ریشه نقش مهمی در عرضه عناصر برای گیاه بر عهده دارند که بهره‌گیری از حجم بیشتر خاک که ریشه‌های تغذیه‌کننده به آن دسترسی ندارند را ممکن می‌سازد (۳۶).

جدول ۵. مقایسه میانگین اثر اصلی شوری بر غلظت برخی عناصر غذایی در بخش هوایی گیاه گندم.

Table 5. Mean comparisons of the main effect of salinity on the concentration of some nutrients in the wheat shoot.

تیمار شوری Salinity (dS m^{-1})	پتاسیم K (%)	کلسیم Ca (%)	سدیم Na (%)	نسبت پتاسیم به سدیم K/Na	نسبت کلسیم به سدیم Ca/Na	روی Zn (mg/kg)
بدون شوری EC=0	2.11^{a}	0.85^{a}	0.52^{c}	4.04^{a}	1.64^{a}	50.91^{a}
شوری ۸ EC=8	1.34^{b}	0.55^{b}	0.94^{b}	1.40^{b}	0.57^{b}	43.62^{b}
شوری ۱۴ EC=14	0.99^{c}	0.32^{c}	2.69^{a}	0.34^{c}	0.11^{c}	35.94^{c}

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

In each column, means with dissimilar letters are significantly different at 5% probability level according to the Duncan test.

– غلظت پتاسیم در گیاه

نتایج نشان داد کم‌ترین غلظت پتاسیم در سطح شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر و بیش‌ترین غلظت این عنصر غذایی مربوط به تیمار بدون شوری بود. به‌گونه‌ای که تیمار بدون شوری سبب افزایش ۱/۵۷ برابری در بخش هوایی گیاه در مقایسه با سطح شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر شد (جدول ۵). در بین تیمارهای تلقیح میکروبی نیز تیمار باکتری‌های PGP سبب افزایش ۱/۹۹ برابری پتاسیم نسبت به شاهد شدند (جدول۶). بنا به‌نظر برخی پژوهشگران غالبیت یون سدیم در سطوح بالای شوری از جذب پتاسیم توسط گیاه جلوگیری کرده و سبب کاهش تجمع یون پتاسیم در گیاه می‌شود (۱۲). به‌نظر می‌رسد در این کاهش، علاوه بر اثر آنتاگونیستی سدیم بر جذب پتاسیم، کاهش فعالیت میکروبی، کاهش سرعت معدنی‌شدن مواد آلی و در نتیجه کاهش سرعت آزادسازی پتاسیم در شرایط شور نقش داشته باشد (۳۸). سایر پژوهش‌ها نشان داده‌اند که باکتری‌های محرک رشد در افزایش غلظت پتاسیم گیاه بسیار توانا بوده و افزایش جذب پتاسیم در تیمارهای میکروبی را می‌توان به تولید انواع فیتوهورمون‌ها نسبت داد. این باکتری‌ها از راه تولید اسیدهای آلی و کپسول‌های پلی‌ساکاریدی باعث انحلال کانی‌ها و آزادسازی پتاسیم می‌شوند (۳۴). رابطه میکوریزی به گیاهان کمک می‌کند تا برای جذب پتاسیم رقابت کنند و تمایل بیشتری برای جذب پتاسیم تحت شرایط شوری القا می‌کند (۲۰).

– غلظت فسفر در گیاه

نتایج مقایسه میانگین اثر برهم‌کنش شوری و تلقیح میکروبی بر غلظت فسفر بخش هوایی گیاه نشان داد (جدول ۴) که تلقیح میکروبی در تمام سطوح شوری نسبت به تیمار شاهد سبب افزایش غلظت فسفر در اندام هوایی گیاه شد. به‌گونه‌ای که بیشترین غلظت فسفر در بخش هوایی (۰/۴۸ درصد) را تیمار بدون شوری تلقیح قارچ میکوریزی به خود اختصاص داد. هر چند با افزایش شوری غلظت فسفر در همه تیمارها کاهش یافت اما این کاهش غلظت فسفر در تیمار شاهد نسبت به تلقیح میکروبی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. فسفر نقش مهمی را در انتقال انرژی ایفا می‌کند و کمبود آن موجب کاهش قابل توجهی در فرآیندهای متابولیکی مرتبط با تقسیم سلولی، توسعه و گسترش سلول، تنفس و فتوسنتز می‌شود. نتایج نشان داد که با افزایش شوری میزان جذب فسفر کاهش یافته است. در خاک‌های شور، آنیون کلرید و دی‌هیدروژن فسفات برای جذب توسط گیاه با یکدیگر رقابت می‌کنند و در نتیجه جذب فسفر و تجمع آن در اندام هوایی کاهش می‌یابد (۱۱). تیمار باکتری نیز اختلاف معنی‌داری با قارچ میکوریز در سطح بدون شوری نشان نداد. قارچ میکوریز غلظت فسفر در گیاهان را به واسطه دارابودن شبکه گسترده‌ای از هیف افزایش می‌دهد به‌دلیل اینکه کارایی جذب فسفر به‌طور مستقیم وابسته به مقدار کل این عنصر در گیاه است، افزایش جذب فسفر در تیمارهای قارچی علاوه بر تأثیر همزیستی میکوریزایی در افزایش سطح جذب

جدول ۶. مقایسه میانگین اثر اصلی تلقیح میکروبی بر غلظت برخی عناصر غذایی در بخش هوایی گیاه گندم.

Table 6. Mean comparisons of the main effect of microbial inoculation on the concentration of some nutrients in the wheat shoot.

تیمار تلقیح میکروبی Microbial inoculation	پتاسیم K (%)	نسبت پتاسیم به سدیم K/Na	روی Zn (mg/kg)
شاهد Control	1.03[b]	1.51[b]	36.95[d]
ریزوباکتری‌ها Rhizobacteria	2.05[a]	2.59[a]	50.86[a]
قارچ اندوفیت Endophytic fungus	1.04[b]	1.37[b]	40.43[c]
قارچ میکوریز AMF	1.70[a]	2.23[a]	45.46[b]

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف متفاوت هستند، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی‌داری دارند.

In each column, means with dissimilar letters are significantly different at 5% probability level according to the Duncan test.

ریشه می‌تواند به‌دلیل تأثیر این قارچ‌ها در ترشح فسفاتازها، اگزالات‌ها و تراوش یون پروتون نیز صورت بگیرد (۲۵). استفاده از باکتری‌های محرک رشد به‌همراه خاک فسفات در شرایط گلخانه فسفر گیاه را به‌ترتیب ۴۲ و ۴۷ درصد افزایش دادند که می‌تواند ناشی از ترشح اسیدهای آلی باشد و کاهش میزان جذب آن را در شرایط شور را می‌توان به کاهش طول ریشه نسبت داد (۶). افزایش شوری در خاک، فراهمی فسفر برای گیاه را کاهش می‌دهد زیرا با توجه به اینکه فسفر و کلرید هر دو آنیون هستند. بنابراین جذب آن‌ها توسط گیاه از مکانسیم مشابهی پیروی می‌کند. یون کلرید که در محلول خاک‌های شور به مقدار فراوان یافت می‌شود با آنیون فسفات رقابت کرده و به مقدار بیشتری جذب گیاه می‌شود. باکتری‌های محرک رشد موجب محلول‌شدن فسفر معدنی خاک، بهبود جذب کارآمد آن از خاک و بیش‌ترشدن مقدار آن در اندام‌های گیاه می‌شوند. در رابطه با افزایش غلظت فسفر در تیمارهای باکتری (جدول ۲) و قارچی دلایل مختلفی بیان شده است که از جمله تولید اسیدهای معدنی (اسید کربنیک و اسید سولفوریک)، اسیدهای آلی (اگزالیک، سیتریک و لاکتیک) و تولید آنزیم‌های فسفاتاز و در نتیجه انحلال فسفات‌های آلی و معدنی را می‌توان نام برد (۵۱). قارچ‌های اندوفیت با برقراری روابط همیاری و همزیستی در تعامل با گیاهان بوده و با انجام فعالیت‌هایی مانند تولید انواع متابولیت‌ها، تجزیه ترکیبات آلی و تولید مواد محرک رشد در افزایش فراهمی عناصر از جمله فسفر نقش دارند (۵۴).

– غلظت کلسیم در گیاه

با توجه به نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵)، بیش‌ترین و کم‌ترین غلظت کلسیم اندام هوایی گیاه گندم با (۰/۸۵ و ۰/۳۲ درصد) به‌ترتیب مربوط به سطح بدون شوری و شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر بود. کلسیم به‌عنوان یک پیام‌رسان ثانویه تحت تنش شوری عمل می‌کند. بر پایه برخی پژوهش‌های صورت گرفته رابطه میکوریزی موجب افزایش جذب کلسیم توسط گیاه می‌شود. با افزایش شوری، به‌دلیل افزایش یون سدیم، این یون جایگزین یون کلسیم موجود در غشای پلاسمایی تارهای کشنده شده و در نتیجه باعث تغییر در نفوذپذیری غشای پلاسمایی می‌شود. با توجه به اینکه نشت کلسیم از سلول انجام شده، طبیعی است که مقدار کلسیم در گیاه کاهش یابد (۵۰).

– غلظت سدیم در گیاه

با افزایش شوری، غلظت سدیم بخش هوایی گیاه افزایش یافت. به‌گونه‌ای که در بین تیمارهای مورد بررسی، شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر سبب افزایش ۵/۱۷ برابری غلظت سدیم

نسبت به تیمار بدون شوری شد (جدول ۵). افزایش غلظت سدیم با افزایش سطوح شوری کلرید سدیم می‌تواند به‌دلیل فراوانی یون‌های سدیم در محیط ریشه و کاهش رشد گیاه در اثر سمّیت یون سدیم در سطوح بالای شوری باشد. غلظت بیشتر سدیم نسبت به پتاسیم در محیط‌های شور و رقابت این یون با پتاسیم در جذب، سبب کاهش جذب پتاسیم و در نتیجه افزایش غلظت سدیم تا حد سمّیت و کاهش رشد گیاه می‌شود (۶۷). باکتری‌های مقاوم به شوری از راه برقراری پیوند سدیم با پلی‌ساکاریدهای سطحی جذب این عنصر را کاهش می‌دهند (۵۵).

– نسبت‌های پتاسیم به سدیم و کلسیم به سدیم در بخش هوایی گیاه گندم

نتایج حاکی از آن بود که با افزایش شوری، نسبت پتاسیم به سدیم اندام هوایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت به‌گونه‌ای که بیش‌ترین غلظت (۴/۰۴) نسبت پتاسیم به سدیم بخش هوایی در تیمار بدون شوری به دست آمد (جدول ۵). در بین تیمارهای میکروبی، تلقیح باکتریایی این نسبت را بیشتر از بقیه تیمارهای میکروبی افزایش داد و سبب افزایش ۱/۷۱ برابری این نسبت در مقایسه با شاهد شد. البته بین تیمارهای تلقیح باکتریایی و قارچی از نظر تأثیرگذاری بر این نسبت اختلاف آماری مشاهده نشد (جدول ۵). یکی از فاکتورهای نشان‌دهنده تحمل گیاهان در برابر تنش شوری، نسبت جذب پتاسیم به سدیم است (۴۸). خاک‌هایی که شوری آن‌ها غالباً ناشی از کلرید سدیم است (مشابه این پژوهش)، می‌توان از نسبت غلظت پتاسیم به سدیم گیاه به‌عنوان شاخصی از تحمل گیاه در برابر شوری استفاده کرد. در شرایط یکسان، هر قدر این نسبت بیش‌تر باشد، تحمل گیاه در برابر شوری بیش‌تر خواهد بود (۶۰). بنابراین با افزایش سطوح شوری به‌علت افزایش غلظت یون سدیم در محیط ریشه این نسبت در گیاهان تلقیح‌شده نسبت به گیاهان شاهد می‌تواند به‌عنوان یک معیار تحمل به شوری در این گیاهان مطرح باشد. افزایش مقدار یون پتاسیم گیاه در غلظت زیاد نمک یک مزیت است و می‌تواند به‌عنوان معیاری خوب برای انتخاب گیاهان از نظر تحمل به شوری به‌کار رود (۱۲). یکی دیگر از دلایل کاهش این نسبت در تنش شوری را می‌توان به اثر برهم‌کنش یون سدیم بر جذب پتاسیم و حامل‌های انتقال‌دهنده این دو یون نسبت داد. همچنین نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کم‌ترین نسبت غلظت کلسیم به سدیم بخش هوایی گیاه در تیمار با شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (جدول ۵). با افزایش شوری ناشی از کلرید سدیم، غلظت یون سدیم خیلی بیشتر از غلظت یون کلسیم در محیط ریشه بوده و سبب جذب بیشتر یون سدیم در رقابت با کلسیم توسط گیاه می‌شود و این امر کاهش این نسبت را در اندام هوایی گیاه به‌دنبال خواهد داشت. غلظت کم یون کلسیم در شرایط شوری خاک ممکن است به‌شدت عمل غشاء سلولی را تحت تأثیر قرار داده و به‌عنوان مانعی برای ورود یون‌ها به درون سلول عمل می‌کند (۴۵). همچنین افزایش تجمع پتاسیم در تیمارهای باکتریایی می‌تواند به این دلیل باشد که احتمالاً باکتری‌های محرک رشد گیاه (باکتری‌های مولد ACC – دآمیناز) از راه تغییر در انتخاب‌پذیری سدیم و پتاسیم برای جذب توسط گیاه و در نتیجه با محدودنمودن جذب سدیم، جذب پتاسیم را افزایش می‌دهند (۲۸). همچنین باکتری‌های مقاوم به شوری از راه پیونددادن سدیم با پلی‌ساکاریدهای سطحی، جذب آن را کاهش می‌دهند (۵۵).

– غلظت آهن، روی و منگنز در بخش هوایی گیاه گندم

با افزایش سطوح شوری، غلظت آهن، منگنز و روی در بخش هوایی گندم کاهش یافت. در سطوح بدون شوری و ۸ دسی‌زیمنس بر متر قارچ میکوریز غلظت آهن را بیشتر از سایر تلقیح میکروبی افزایش داد هرچند با باکتری‌ها اختلاف معنی‌دار نداشت. اما در شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر باکتری‌ها به‌طور معنی‌دار غلظت آهن را افزایش دادند (جدول ۴). همچنین مقایسه میانگین‌ها نشان داد (جدول ۴) که در تمام سطوح شوری، در بین تلقیح میکروبی، تلقیح باکتری‌ها بهتر از بقیه

تیمار میکروبی عمل کرده و سبب افزایش غلظت منگنز در اندام‌های هوایی گیاه شد (جدول ۴). در ارتباط با غلظت روی در بخش هوایی گیاه نیز نتایج بیانگر کاهش غلظت روی با افزایش شوری از تیمار بدون شوری (۵۰/۹۱ میلی‌گرم در کیلوگرم) تا شوری ۱۴ دسی‌زیمنس بر متر (۳۵/۹۴ میلی‌گرم در کیلوگرم) بود (جدول ۵). در بین تیمارهای میکروبی تلقیح باکتری‌های ریزوسفری بهتر از بقیه تیمارهای میکروبی عمل کرده و سبب افزایش غلظت روی در اندام هوایی شد (جدول ۶).

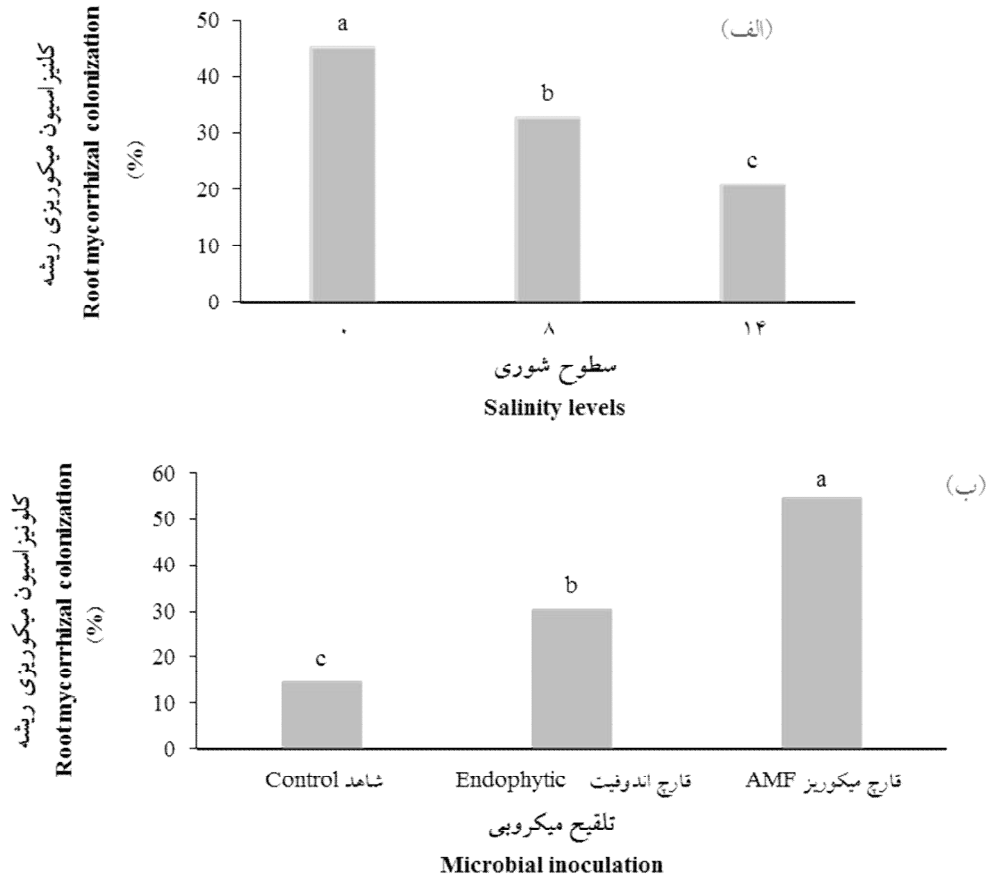
باکتری‌های محرک رشد با گسترش سیستم ریشه‌ای و افزایش ترشحات آن و در نتیجه تشدید فعالیت‌های ریزوسفری، سبب افزایش فراهمی عناصر میکرو برای گیاه می‌شوند. افزایش غلظت عناصرکم مصرف به‌ویژه آهن، منگنز و روی در تلقیح باکتری‌ها ممکن است مربوط به توانایی تولید سیدروفورهای میکروبی باشد. تولید سیدروفور در باکتری‌های محرک رشد گیاه مانند جنس *Pseudomonas* به اثبات رسیده است (۶۶). همچنین برخی پژوهشگران تولید اسیدهای آلی، فرآیندهای کاهشی را در انحلال منگنز دخیل دانسته‌اند (۷). نتایج حاصل از تأثیر برقراری رابطه همزیستی میکوریزایی در غلظت آهن اندام هوایی گیاه بسیار متغیر گزارش شده است. در گیاه سویا برقراری رابطه میکوریزایی منجر به کاهش جذب آهن شده است، درحالی که در گیاه ذرت منجر به افزایش آهن می‌شود. همچنین گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز توانایی متفاوتی در جذب آهن نشان می‌دهند. به‌نظر می‌رسد قارچ‌های میکوریز از راه ترشح انواعی از سیدروفورها و کلاته‌کردن آهن توانسته‌اند جذب و انتقال آهن را افزایش دهند (۵۲). علی‌پور و سبحانی‌پور (۴) بیان کردند که افزودن باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد به محیط رشد ذرت سبب افزایش آهن در اندام هوایی می‌شود. طالعی و همکاران (۵۸) گزارش کردند که افزایش سطوح شوری خاک (۴ به ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر) سبب کاهش معنی‌دار مقدار جذب منگنز توسط گیاه دارویی پادشاه تلخ (*Andrographis paniculata Nees.*) شده است.

– درصد کلونیزاسیون ریشه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که آثار اصلی سطوح شوری و تلقیح میکروبی بر درصد کلونیزاسیون ریشه معنی‌دار بود ($p < ۰/۰۰۱$). ولی برهم‌کنش تیمارها بر این شاخص تأثیر معنی‌داری نشان ندادند. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد کلونیزاسیون ریشه در بین سطوح شوری با ۴۵ و ۲۱ درصد به‌ترتیب مربوط به سطح بدون شوری و شوری ۱۴ بود (شکل ۲–الف). در بین تیمارهای میکروبی نیز بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار این شاخص با ۵۴/۴ و ۱۴/۳ درصد به‌ترتیب مربوط به تیمار میکوریز و تیمار شاهد بود (شکل ۲–ب). تنش شوری در توانایی کلونیزه‌شدن، تندش اسپور و رشد هیف اختلال ایجاد می‌کند پژوهشگران زیادی تأثیر منفی شوری بر این شاخص را گزارش کرده‌اند (۴۹). کلونیزه‌شدن ریشه گیاهان توسط قارچ میکوریز آربوسکولار در حضور NaCl کاهش می‌یابد که احتمالاً به‌دلیل تأثیر مستقیم NaCl بر قارچ است به این معنی که شوری بر عملکرد میکوریز اثر بازدارندگی دارد (۳۲). با افزایش شوری میزان توسعه *S. indica* کاهش یافت (۳۶) که نشان‌دهنده اثر بازدارنده افزایش شوری بر توسعه فعالیت *S. indica* است. ممکن است این کاهش به اثر منفی شوری بر میزان فتوسنتز و کاهش عرضه کربن به قارچ، و همچنین به اثر مهارکننده یون‌های سدیم و کلرید بر رشد ریسه‌های قارچ نسبت داده شود که در نهایت می‌تواند همزیستی قارچ با گیاه کاهش یابد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست آمده در این پژوهش، اهمیت باکتری‌های ریزوسفری جداسازی‌شده از خاک‌های شور و متحمل به غلظت زیاد نمک و همچنین قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و اندوفیت را در بهبود وضعیت عناصر غذایی گیاه تحت شرایط تنش شوری نشان می‌دهد. بررسی نتایج به‌دست آمده نشان داد که گیاهان تلقیح‌شده با باکتری‌ها ریزوسفری و قارچ‌ها نسبت به گیاهان تلقیح‌نشده (شاهد) به میزان کم‌تری تحت تنش شوری



شکل ۲. مقایسه میانگین آثار اصلی: الف) سطوح شوری ($dS\ m^{-1}$) و ب) تلقیح میکروبی بر کلونیزاسیون ریشه؛ ستون‌های دارای حرف متفاوت در سطح ۵ درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار دارند.

Fig. 2. Mean comparisons of the main effects of salinity levels ($dS\ m^{-1}$) (a) and microbial inoculation (b) on root colonization; Columns with dissimilar letters are significantly different at 5% probability level according to the Duncan test.

قرار گرفتند. شوری باعث کاهش غلظت عناصر غذایی و نسبت‌های آن‌ها (به‌استثنای سدیم) در بخش هوایی شد. درحالی که تلقیح میکروبی به ویژه تلقیح با باکتری‌های PGP و قارچ‌های میکوریزی احتمالاً با کمک به تعادل یونی و ایجاد محیط مناسب میکروبی در ریشه با ترشح آنزیم‌ها و انواع هورمون‌ها از آثار شوری بر گیاه کاسته و در نتیجه سبب افزایش غلظت برخی عناصر غذایی در اندام هوایی گیاه شد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که می‌توان از توان بیولوژیک خاک (با ویژگی‌های مختلف (مانند شور، خشک، و آلوده) برای شناسایی و جداسازی سویه و گونه‌های برتر و مقاوم به تنش باکتری و قارچ نسبت به آن شرایط برای تولید انواع کودهای زیستی گامی اساسی برداشت (البته پس از آزمایش‌های مزرعه‌ای) و امکان استفاده از این ریزجانداران را در زمین‌های زراعی مسئله‌دار در قالب کود زیستی فراهم کرد.

منابع مورد استفاده

1. Ahmadi Geshlagi, S., Aliasgharzad, N., Tavassoli, A., 2014. Evaluation of nutrients uptake and yield of mycorrhizal corn under salt stress condition. *Water and Soil Science* 25 (1): 79–89. (in Persian with English abstract)
2. Alexander, D.B., Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12: 39–45.

3. Aliasgharzadeh, N., Hajboland, R., Farsad Laiegh, S.H., Poschenieder, C.H., 2009. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) plants. *Plant and Soil* 331: 313–327.
4. Alipour, Z.T., Sobhanipour, A., 2012. The effect of *Thiobacillus* and *Pseudomonas fluorescent* inoculation on maize growth and Fe uptake. *Annals of Biological Research* 3: 1661–1666.
5. Al-Karaki, G.N., 2006. Nursery inoculation of tomato with arbuscular mycorrhizal fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Scientia Horticulturae* 109: 1–7.
6. Almas, Z., Saghir, K., 2005. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on growth, yield and nutrient uptake of wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 28: 2079–2092.
7. Altomare, C., Norvell, W.A., Bjorkman, T., Harman, G.E., 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* rifai1295–22. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2926–2933.
8. Anagholi, A., Galeshi, S., 2017. Comparison of salinity response in tolerant wheat cultivars with introduced cultivars for non-saline condition. *Electronic Journal of Crop Production* 10(1): 203–226. (in Persian with English abstract)
9. Ashraf, M., McNeilly, T., 2004. Salinity tolerance in Brassica oilseeds. *Plant Science* 23: 157–174.
10. Auge, R. M., 2004. Arbuscular mycorrhizae and soil/plant water relations, Canadian. *Soil Science* 84: 373–381.
11. Barin, M., Aliasgharzad, N., Olsson, P.A., Rasouli Sadeghiani, M.H., Moghddam, M., 2013. The abundance of arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil salinity around Lake Urmia in northern Iran. *Pedobiologia* 56(4–6): 225–232.
12. Barin, M., Aliasgharzad, N., Samadi, A., 2006a. Influence of mycorrhization on the mineral nutrition and yield of tomato under sodium chloride and salts mixture induced salinity levels. *Iranian Journal of Soil and Water Sciences* 20 (1): 94–105. (in Persian with English abstract)
13. Barin, M., Aliasgharzad, N., Samadi, A., 2006b. Effect of salinity from sodium chloride and salts mixture on proline concentration and some tomato growth indices in arbuscular mycorrhizal fungi symbiosis. *Iranian Journal of Agriculture Science* 37: 139–147. (in Persian with English abstract)
14. Barin, M., Rasouli Sadaghiani, M.H, Ashrafi Saeidlou, S., Shakouri, F., 2019. Effects of salinity and microbial inoculation on the yield and phosphorous efficiency indicators of corn. *Applied Soil Research* 7(1): 148–165. (in Persian with English abstract)
15. Barin, M., Sadeghi, S., Rasouli-Sadaghiani, M., Sepehr, E., Dovlti, B., Vahedi, R., 2018. Influence of K-solubilizing fungi on potassium release from silicate minerals and some growth indexes on corn (*Zea mays L.*). *Applied Soil Research* 6(2): 96–108. (in Persian with English abstract)
16. Barin, M., Aliasgharzad, N., Olsson, P.A., Rasouli-Sadaghiani, M.H., 2015. Salinity-induced differences in soil microbial communities around the hypersaline Lake Urmia. *Soil Research* 53: 494–504.
17. Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C.P., Enebak, S., 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 793–800.
18. Brundrett, M., 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research* 21: 171–313.
19. Çakmakçı, R., Erat, M., Erdoğan, Ü., Dönmez, M.F., 2007. The influence of plant growth–promoting rhizobacteria on growth and enzyme activities in wheat and spinach plants. *Plant Nutrition and Soil Science* 170: 288–295.
20. Chinnusamy, V., Jagendorf, A., Zhu, J.K. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45: 437–448.
21. Cotteni, A. 1980. Methods of plant analysis. In: Soil and Plant Testing FAO Soils Bulletin. 38(2): 64–100.
22. Ebrahimi Karim Abad, R., Rasouli Sadaghiani, M.H., Barin, M., 2016. Isolation of phosphate-solubilizing microorganisms from wheat rhizosphere and evaluation of their solubilizing potential in presence of two insoluble phosphate sources. *Applied Soil Research* 3(2): 29–41. (in Persian with English abstract)
23. Evelin, H., Kapoor, R., Giri, B., 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany*, 104(7): 1263–1280.
24. Garcia, C., Hernandez, T., 1996. Influence of salinity on the biological and biochemical activity of a calciorthid soil. *Plant and Soil* 178: 255–263.
25. Giri, B., Kapoor, R., Mukerji, G., 2003. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on growth, biomass, and mineral nutrition of Acacia auriculiformis. *Biology and Fertility of Soils* 38: 170–175.
26. Giri, B., Kapoor, R., Mukerji, K.G., 2007. Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microbiology and Ecology* 54: 753–760.
27. Hajinia, S., Zare, M.J., Mohammadi Gol Tappeh, A., Rajali, F., 2011. Evaluation of the usefulness of endiform fungus *Piriformospora indica* and *Azospirillum Sp*. in increasing the tolerance of wheat cultivar Sardari (*Triticum aestivum*) to salinity stress. *Journal of Environmental Stresses in Crop Sciences* 4 (1): 31–21. (in Persian with English abstract)

28. Hamdia, M.A., Shaddad, M.A.K., Doaa, M.M., 2004. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regulators* 44: 165–17.
29. Hammer, E.C., Nasr, H., Pallon, J., Olsson, P.A., Wallander, H., 2011. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. *Mycorrhiza* 21: 117–129.
30. Hosseini, Y., Homayi, M., Karimian, N., Saadat, Y.S., 2008. Modeling of rapeseed stress to both salinity and nitrogen deficiency stresses. *Agricultural Science and Technology and Natural Resources* 46: 721–734. (in Persian with English abstract)
31. Hu, X.F., Chen, J., Guo, J.F., 2006. Two phosphate and potassium solubilizing bacteria isolated from Tiannu mountain, Zhejiang, China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22: 983–990.
32. Juniper, S., Abbott, L.K., 2006. Soil salinity delays germination and limits growth of hyphae from propagules of arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* 16: 371–379.
33. Karlidag, H., Esitken, A., Yildirim, E., Figen-Donmez, M., Turan, M., 2011. Effects of plant growth promotingbacteria on yield, growth, leaf water content, membrane permeability andionic composition of strawberry under saline conditions. *Journal of Plant Nutrition* 34: 34–45.
34. Karlidag, H., Yildirim, E., Turan, M., Pehluvan, M., Donmez, F., 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria mitigate deleterious effects of salt stress on strawberry plants (*Fragaria×ananassa*). *Horticultural Science* 48: 563–567.
35. Kazemi, G.A., Tajabadi Ebrahimi, M., Jalili, H., Damascus, M., Sharifpour, L., 2014. Isolation, identification and investigation of antagonistic properties of hot and acidic spring bacteria in Bushehr Province. *New Journal of Cellular-Molecular Biotechnology*, 14: 65–72. (in Persian with English abstract)
36. Khodabandeloo, M., Amanifar, S., Mohsenifard, E., Askari, M., 2019. Evaluation of symbiosis efficiency of arbuscular mycorrhiza (*Rhizophagus intraradices*) and root endophyte *Piriformospora indica* under salinity stress in *Glycirrhiza glabra* L. *Applied Soil Research* 7(3): 40–53. (in Persian with English abstract)
37. Llop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C., López, M.M., 1999. A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 37(1): 23–31.
38. Malakouti, M.J., Keshavarze, P., Kholde Barin, B., 2002. Plant Nutrition in Saline Conditions. First ed., Sana Publications, Tehran. (in Persian)
39. Mayak, S., Tirosh, T., Glick, B.R., 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(6): 565–572.
40. Meunchang, S., Thongra-Ar, P., Sanoh, S., Kaewsuralikhit, S., Ando, S., 2006. Development of rhizobacteria as a biofertilizer for rice production. In: International Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Bangkok, Thailand, October 16–20.
41. Mizrahi-Man, O., Davenport, E.R., Gilad, Y., 2013. Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: evaluation of effective study designs. *PloS One* 8: 53608
42. Moira, E.K., Henderson, M.E.K., Duff, R.B., 1963. The release of metallic and silicates ions from minerals, rocks and soils by fungal activity. *Journal of Soil Science* 14: 237–245.
43. Mousavi, R., Rasouli Sadaghiani, M.H, Sepehr, E., Barin, M., 2020. Effect of various enriched biochars and PSB on phosphatase activity, phosphorus availability, and wheat growth in saline soils around Lake Urmia. *Iranian Journal of Soil Research* 34(1): 29–45. (in Persian with English abstract)
44. Nakbanpote, W., Panitlurtumpai, N., Sangdee, A., Sakulpone, N., Sirisom, P., Pimthong, A., 2014. Salt-tolerant and plant growth-promoting bacteria isolated from Zn/Cd contaminated soil: identification and effect on rice under saline conditions. *Plant Interactions* 9(1):379–387.
45. Netondo, G.W., Onyango, J.C., Beck, E., 2004. Sorghum and salinity. I: Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. *Crop Science* 44: 797–805.
46. Paul, E. A. & F. E. Clark, 1989. Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press, London, 275 p.
47. Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for cleaning and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55: 158–160
48. Prakash, R.P., Sushil, S.K., Vinay, R.P., Vimal, J.P., Sunil, M.K., 2010. Impact of salt stress on nutrient uptake and growth of cowpea. *Brazilian Society of Plant Physiology* 22: 43–48.
49. Rabie, G. H., Almadini, A.M., 2005. Role of bioinoculants in development of salt-tolerance of *Vicia faba* plants under salinity stress. *African Journal of Biotechnology* 4: 210–222.
50. Rameeh, V., Rezai, A., Saeidi, G., 2004. Study of salinity tolerance in rapeseed. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 35: 2849–2866.
51. Rasouli Sadghiani, M.H., Rahimian, H., Khavazi, K., Malakouti, M.J., Asadi Rahmani, H., 2005. Population density and identification of fluorescent pseudomonads associated with rhizosphere of wheat. *Iranian Journal of Soil and Waters Sciences* 19(2): 225–234. (in Persian with English abstract)

52. Sajedi, N.A., Rejali, F., 2011. Effects of drought stress, zinc application and mycorrhiza inoculation on uptake of micronutrients in maize. *Iranian Journal of Soil Research* 25(2): 83–92. (in Persian with English abstract)
53. Schaad, N.W., Jones, J.B., Chun, W., 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third ed., American Phytopathological Society APS Press, pp. 373
54. Sepahri, M., Saleh Rastin, N., Hossieni Salkedeh, G., Khayam Nekouie, M., 2009. Effect of endophytic fungus, *Piriformospora indica*, on growth and resistance of *Hordeum vulgare* L. to salinity stress. *Rangeland* 3: 508–518. (in Persian with English abstract)
55. Siddikee, M.A., Glick, B.R., Chauhan, P.S., jong Yim, W., Sa, T., 2011. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum L.*) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(4): 427–434.
56. Sparks, D.L., Page, A.L., Helmke, P.A., Loeppert, R.H., Soltanpour, P.N., Tabatabai, M.A., Johnston, C.T., Sumner, M.E., 1996. Methods of Soil Analysis Part 3- Chemical Methods. ASA/SSSA Book Series 5, Madison, WI, USA.
57. Stajkovic, O., Delic, D., Josic, D., Kuzmanovic, D., Rasulic, N., Knezevic-Vukcevic, J., 2011. Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. *Romanian Biotechnological Letters* 16(1): 5919–5926.
58. Talei, D., Kadir, M.A., Yusop, M.K., Valdiani, A., Abdullah, M.P., 2012. Salinity effects on macro and micronutrients uptake in medicinal plant King of Bitters (*Andrographis paniculata Nees*.). *Plant Omics* 5: 271–278.
59. Tallapragada, P., Seshachala, U., 2012. Phosphate-solubilizing microbes and their occurrence in the rhizospheres of *Piper betel* in Karnataka, India. *Turk Biology* 36: 25–35.
60. Talwar, H.S., Kumari, A., Surwenshi A., Seetharama, N., 2011. Sodium:potassium ratio in foliage as an indicator of tolerance to chloride-dominant soil salinity in oat. *Indian Journal of Agricultural Science* 85: 481–484.
61. Taurian, T., Anzuay, M.S., Angelini, J.G., Tonelli, M.L., Luduena, L., Pena, D., Ibanez, F., Fabra, A., 2009. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: screening for plant growth-promoting activities. *Plant and Soil* 329: 421–431.
62. Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., De, R., Saxena, A.K., Nautiyal, C.S., Johri, B. N., 2005. Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science* 89: 136-150.
63. Valverde, A., Burgos, A., Fiscella, T., Rivas, R., Velazquez, E., Rodríguez-Barrueco, C., Cervantes, E., Chamber, M.,Igual, J.M., 2007. Differential effects of coinoculations with Pseudomonas jesseniiPS06 (a phosphate-solubilizing bacterium) and Mesorhizobium ciceriC-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. In: First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization, Salamanca, Spain, July 16–19.
64. Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173(2): 697–703.
65. Westerman, R.L., 1990. Soil Testing and Plant Analysis. SSSA Book Series, Number 3, Madison, WI, USA.
66. Yang, M.M., Mavrodi, D.V., Mavrodi, O.V., Bonsall, R.F., Parejko, J.A., Paulitz, T.C., Thomashow, L.S., Yang, H.T., Weller, D.M., Guo, J.H., 2011. Biological control of take-all by fluorescent *Pseudomonas* spp. from Chinese wheat fields. *Phytopathology* 101: 81–91.
67. Zahir, Z.A., Ghani, U., Naveed, M., Nadeem, S. M., Asghar H.N., 2009. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. *Archives of Microbiology* 191: 415–424.
68. Zarei, M.., Hajinia, S., Karimi, N., Goltapeh, E.M., Rejali, F., Varma, A., 2012. Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. *Soil Biology and Biochemistry* 45: 139–146.

Isolation and Identification of PGP Rhizobacteria from Saline Soils and Their Effect on Nutrients Uptake in Wheat under Salinity Stress

Z. Royodel[1], M. Barin[1], M.H. Rasouli Sedghiani[1] and M. Khezri[2]

(Received: 9 November 2020; Accepted: 17 January 2021)

Abstract

This study was carried out to isolate and identify plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) from saline soils and to evaluate the effect of isolated rhizobacteria, as well as symbiotic and endophytic fungi on the concentration of some nutrient elements in wheat plants under salinity stress in greenhouse conditions. Factors included microbial treatments (rhizobacteria, mycorrhizal fungi, endophytic fungus, and control) and salinity levels (no salinity, 8 and 14 dS m^{-1}). At the end of the growth period, the concentrations of nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), iron (Fe), zinc (Zn) and manganese (Mn) in the shoot of the wheat plant, as well as the percentage of root colonization were measured. Based on growth-promoting trails, three isolates among the ten purified rhizobacteria were selected for phenotypic and molecular identification. Two identified isolates belonged to Pseudomonas genus (*Pseudomonas aeruginosa* Ur743 and *Pseudomonas fluorescens* Ur745), and the last one was *Stenotrophomonas maltophilia* Ur840. When the concentrations of nutrient elements were at the non-salinity level, mycorrhizal fungi were better than other microbial treatments in terms of absorbing P, Fe, and Mn, However, at the highest salinity level (i.e., 14 dS m^{-1}), rhizobacteria significantly improved concentrations of N, P, Fe, and Mn in the plant shoot, compared to the control. Besides, the PGP bacteria increased the concentrations of K and Zn, as well as K:Na ratio by 1.99, 1.71, and 1.37 times, respectively, as compared to the control. In general, native microorganisms isolated from saline soil, as compared to other microorganisms in this study, improved the nutrient uptake and increased the wheat plant biomass under salinity stress.

Keywords: Microbial inoculation, Plant growth-promoting rhizobacteria, Root colonization, Mycorrhizal fungus, Endophytic fungus.

Background and Objective: Salinity and its resulting stress is one of the most important and common environmental stresses that has limited agricultural production. The toxicity of ions such as sodium and chloride as well as the reduction of water potential in saline soils affect the cultivation of plants in these soils. Inoculation of microorganisms such as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and endophytes for crops grown in saline soils can reduce the salinity effect and improve plant growth. Wheat plant with a threshold of about 6 dS m^{-1}, is known as one of the strategic crops in the world (2, 4). In recent years, the regression of Lake Urmia has led to an increase in the area of the surrounding salt marshes, which has led to climate change and many environmental impacts in the region. This study was conducted assuming that PGPR isolated from saline soil can improve plant growth under saline conditions. Therefore, the purpose of this study was to isolate the PGPR from saline soils around Lake Urmia and evaluate the effect of these bacteria along with symbiotic fungi and endophytes on improving the uptake of some nutrients in wheat under salinity stress.

Methods: In order to isolate PGPR bacteria, 30 soil samples were collected from saline lands along Lake Urmia,

1. Department of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, Urmia University
2. Plant Protection Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran
* Corresponding Author, Email: m.barin@urmia.ac.ir

located in West Azerbaijan Province. Fifteen bacterial colonies with different morphological characteristics were purified. Then, the solubility of insoluble phosphate and mica, and production of indole acetic acid (IAA) (3), siderophore (1) and salinity test were evaluated. This factorial study was conducted in a completely randomized design with three replications. Factors included microbial treatments (rhizobacteria, mycorrhizal fungi, endophytic fungus, and control) and salinity levels (no salinity, 8 and 14 dS m^{-1}). Some physical and chemical properties of the soil were measured by standard methods. For microbial inoculation of rhizobacteria isolated from rhizosphere soil containing PGPR (combination of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Stenotrophomonas maltophilia*). Endophytic fungus (*S. indica*) and AMF (*Rhizophagus irregularis*, *Rhizophagus fasciculatus* and *Diversispora versiformis*) from the microbial bank of the Department of Soil Science of Urmia University were used. The seeds of wheat were treated with microbial inoculation. Different salinity levels were produced by adding sodium chloride in a certain amount and volume for each treatment. At the end of the growth period (60 days), the concentrations of some macro and micro nutrients in the shoot of the wheat plant, as well as the percentage of root colonization were measured.

Results: The results showed that, based on growth-promoting trails, three isolates among the ten purified rhizobacteria were selected for phenotypic and molecular identification. Two identified isolates have belonged to Pseudomonas genus (*Pseudomonas aeruginosa* Ur743 and *Pseudomonas fluorescens* Ur745), and the last one was *Stenotrophomonas maltophilia* Ur840. The results of greenhouse experiments showed that the effect of salinity levels and microbial inoculation were significant on concentrations of most nutrients in the shoot. The interaction effects of the treatments on N and P concentrations ($p < 0.01$) and Fe and Mn concentrations were significant ($p < 0.05$). When the concentrations of nutrient elements were at non-salinity level, mycorrhizal fungi were better than other microbial treatments in absorbing P, Fe, and Mn. However, at the highest salinity level (i.e., 14 dS m^{-1}), rhizobacteria significantly improved concentrations of N, P, Fe, and Mn in the plant shoot, compared to the control. In addition, the PGP bacteria increased the concentrations of K and Zn, as well as K:Na ratio, 1.99, 1.71, and 1.37 times, respectively, compared to the control.

Conclusions: The results of this study showed that using the beneficial native microorganisms can improve the uptake of nutrient elements and plant growth in saline conditions.

References:

1. Alexander, D.B., Zuberer, D.A., 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils 12: 39–45.
2. Anagholi, A., Galeshi, S., 2017. Comparison of salinity response in tolerant wheat cultivars with introduced cultivars for non-saline condition. Electronic Journal of Crop Production 10(1): 203–226. (in Persian with English abstract)
3. Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C.P., Enebak, S., 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology 47: 793–800.
4. Hammer, E.C., Nasr, H., Pallon, J., Olsson, P.A., Wallander, H., 2011. Elemental composition of arbuscular mycorrhizal fungi at high salinity. Mycorrhiza 21: 117–129.