جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* از ریزوسفر درختان پسته و تعیین برخی خصوصیات محرک رشدی آن‌ها

فرهاد آذرمی[1]، وحید مظفری، پیمان عباس‌زاده دهجی و محسن حمیدپور

دانشجوی دکتری علوم‌خاک، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ farhadazarmi@yahoo.com

دانشیار گروه علوم‌خاک، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ vmozafary@yahoo.com

استادیار گروه علوم‌خاک، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ p.abbaszadeh@vru.ac.ir

دانشیار گروه علوم‌خاک، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان؛ mohsen_hamidpour@yahoo.com

دریافت: 92/4/21 و پذیرش: 93/11/29

چکیده

باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* از مهم‌ترین ریزجانداران خاکزی هستند که با داشتن خصوصیات محرک رشدی متعدد می‌توانند موجب بهبود رشد گیاه گردند. این پژوهش به‌منظور جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* از ریزوسفر درختان پسته و تعیین برخی از خصوصیات محرک رشدی آن‌ها انجام شد. ابتدا 34 جدایه *سودوموناس فلورسنس* از 80 نمونه خاک ریزوسفری جمع‌آوری شده از مناطق پسته‌کاری رفسنجان جداسازی و خالص‌سازی شد. سپس توانایی تولید سیدروفور، اکسین، سیانید هیدروژن، انحلال نمک‌های کم محلول تری-کلسیم‌فسفات، ZnO و $ZnCO_3$ در محیط جامد و مایع بررسی شد. نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد مطالعه توانایی تولید سیدروفور در محیط CAS آگار را دارا بودند. متوسط تولید سیدروفور و نسبت هاله به کلنی به ترتیب 2/05 و 2/86 (جدایه D9) بود. 96/88 درصد جدایه‌ها قادر به تولید اکسین در غلظت 100 پی‌پی‌ام ال- تریپتوفان بودند. بیشترین اکسین تولید شده 16/64 میکروگرم بر میلی لیتر مربوطه به جدایه D15 بود. ارزیابی تولید HCN با استفاده از دفترچه مانسل رنگ نشان داد که جدایه D24 بیشترین HCN را تولید کرد و هم‌چنین 75 درصد جدایه‌ها توانایی تولید HCN را داشتند. نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به انحلال تری‌کلسیم‌فسفات در محیط PKV جامد و مایع هستند. بیشترین مقدار فسفر حل شده برابر 705 میکروگرم بر میلی‌لیتر و مربوط به جدایه D_6 بود. هم‌چنین به‌ترتیب 75 و 48 درصد جدایه‌ها قادر به انحلال نمک‌های نامحلول ZnO و $ZnCO_3$ در محیط PKV بودند. متوسط روی حل شده توسط جدایه های سودوموناس فلورسنت از منبع ZnO و ZnCO3 به ترتیب برابر 8/47 و 2/48 میکروگرم بر میلی لیتر بود. بیشترین روی حل شده از منبع ZnO و $ZnCO_3$ به ترتیب برابر 67/37 و 7/70 میکروگرم بر میلی‌لیتر و مربوط به جدایه‌های D_{14} و D_{25} مربوط بود.نتایج نشان داد که تلقیح با جدایه‌های برتر مورد آزمایش موجب افزایش معنی‌دار ارتفاع نهال، سطح برگ، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه و هم‌چنین غلظت فسفر، آهن، روی، منگنز و مس در اندام‌هوایی نهال‌های پسته شد. با توجه به نتایج، جدایه‌های منتخب می‌تواند برای تهیه زاد مایه مناسب استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: اکسین، باکتری‌های محرک رشد گیاه، روی، سیدروفور، فسفر

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، دانشگاه ولی‌عصر (عج)، دانشکده کشاورزی، گروه علوم‌خاک

مقدمه

خاک یک سیستم ناهمگن است که ترکیب مواد معدنی، شوری، pH، فراهمی عناصر غذایی، مقدار مواد آلی، درجه حرارت، مقدار آب، شرایط اقلیمی و جغرافیایی و تاثیرات انسانی تعیین کننده نوع جانداران موجود در آن می‌باشد (لی‌ساک و همکاران، 1997). بخشی از خاک که فعالیت ریزجانداران در آن بیشتر بوده ریزوسفر (کریتسوف و همکاران، 2007) نامیده می‌شود. ریزوسفر، لایه نازکی از خاک اطراف ریشه است (1 تا 3 میلی‌متر) که موجودات زنده در آن ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تاثیر فعالیت ریشه مانند تنفس و ترشحات ریشه‌ای قرار دارند (بوون و راویرا، 1999). به گروهی از باکتری‌های مفید ریزوسفری خاک که باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند باکتری‌های محرک رشد گیاه[1](PGPR) گفته گفته می‌شود. این باکتری‌ها می‌توانند با استفاده از روش-های مختلف شامل انحلال ترکیبات کم‌محلول و نامحلول عناصر غذایی و در نتیجه افزایش فراهمی آن‌ها، تثبیت نیتروژن، کنترل بیمارگرهای گیاهی با تولید سیانید هیدروژن، ترکیبات ضد میکروبی و رقابت برای جذب عناصر غذایی، تولید سیدروفور، افزایش تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی و سمیت عناصر و تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول‌استیک‌اسید (IAA) باعث افزایش رشد گیاه شوند (گلیک، 2014). امروزه استفاده از PGPRها در کشاورزی به‌عنوان روشی جایگزین برای کودهای شیمیایی، آفت‌کش‌ها و مکمل‌ها در راستای جلوگیری از آلودگی محیط زیست در حال افزایش می‌باشد (اشرف‌الزمان، و همکاران، 2009).

سودوموناس‌ها از مهم‌ترین باکتری‌های ریزوسفری و فیلوسفری هستند که به‌دلیل توانایی بالای آن‌ها در رقابت با سایر ریزجانداران برای عناصر غذایی و سازگاری سریع با شرایط محیطی مختلف، در بیشتر محیط‌ها مشاهده می‌شوند (ویاس و گولاتی، 2009). مؤثرترین گروه از *سودوموناس‌ها*، *سودوموناس‌های فلورسنس* هستند که به‌دلیل خصوصیات متابولیکی و عملکردی متنوع، نقش بارزی در سلامت خاک ایفا می‌کنند (ساهاران و نحرا، 2011). یکی از خصوصیات بارز باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* تولید هورمون-های گیاهی است. از مهم‌ترین هورمون‌های گیاهی که بر رشد و توسعه گیاه موثرند اکسین‌ها هستند (استپانووا و همکاران، 2008). شناخته شده‌ترین اکسین‌ها، ایندول- 3- استیک اسید (IAA) است. هورمون IAA از طریق متابولیسم ال- تریپتوفان به‌عنوان پیش ماده توسط گیاهان و بسیاری از ریزجانداران خاک از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها وجلبک‌ها تولید می‌شود (سارور و کرمر، 1995). بر اساس مطالعات 80 درصد باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر گیاهان مختلف توانایی تولید اکسین را دارا بودند (دوبلاره و همکاران، 2003).

از دیگر ترکیباتی که توسط ریزجانداران خاک ترشح شده و بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارد "سیدروفور" می‌باشد. سیدروفورها ترکیباتی با وزن مولکولی کم هستند که در شرایط کمبود آهن توسط برخی ریزجانداران خاک ترشح شده و میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای کمپلکس شدن با آهن فریک (Fe^{3+}) دارند (میلاگرس و همکاران، 1999). به‌دلیل وجود گیرنده‌های اختصاصی در غشا سلولی باکتری‌ها، آن‌ها قادر به جذب کمپلکس‌های آهن-سیدروفور می‌باشند. *سودوموناس‌ها* با تولید سیدروفورها و ایجاد رقابت برای سوبستراهای مختلف به‌ویژه آهن، اثر بازدارندگی زیادی علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی دارند (بویسنس و همکاران، 1996).

یکی از مهم‌ترین سازوکارهای کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه، تولید سیانید هیدروژن (HCN) است (نادین و همکاران، 2010). سیانید هیدروژن یک متابولیت ثانویه است که توسط برخی باکتری‌های گرم‌منفی مانند *سودوموناس‌های فلورسنس* تولید می‌شود. سیانید هیدروژن تولید شده توسط *سودوموناس‌های فلوروسنس* بوسیله یک فلاووآنزیم متصل به غشا انجام می‌گیرد که با تولید HCN و CO_2 موجب اکسید شدن گلایسین می‌شود (کاستریک، 1977). تولید HCN توسط *سودوموناس‌ها* می‌تواند رشد گیاه را از طریق کنترل بیمارگرهای گیاهی افزایش دهد.

باکتری‌های محرک رشد گیاه از جمله *سودوموناس‌ها*، قادر به انحلال ترکیبات معدنی کم‌محلول عناصر مختلف از جمله فسفر و روی می‌باشند. این باکتری‌ها با سازوکارهای مختلفی از جمله تولید اسیدهای آلی، اسیدهای معدنی و ترشح پروتون موجب کاهش pH ریزوسفر شده و در نتیجه فراهمی عناصر غذایی برای گیاه را افزایش می‌دهند (ساندارا و همکاران، 2002). فسفر و روی غیر قابل استفاده برای گیاه را می‌توان با استفاده از باکتری‌های حل کننده فسفر[2](PSB) و روی[3](ZnSB) به شکل قابل استفاده درآورد. باکتری‌های حل کننده روی با کاهش pH به 5 یا کمتر باعث افزایش انحلال روی و

1. Plant Growth Promoting Rhizobacteria

2. Phosphate Solubilizing Bacteria

3. Zinc Solubilizing Bacteria

افزایش فراهمی آن می‌شوند. عباس‌زاده و همکاران (1391) نشان دادند که 20 درصد از سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* جدا شده از ریزوسفر گیاهان مختلف توانایی انحلال نمک‌های ZnO و $ZnCO_3$ را دارا بودند. تلقیح با باکتری‌های حل کننده فسفات موجب افزایش معنی‌دار عملکرد دانه گندم و ذرت، جذب فسفر، کربن آلی خاک، فراهمی فسفر، فعالیت آنزیم‌ها و جمعیت باکتری‌های حل کننده فسفات شد (کائور و ردی، 2014). همچنین نتایج رامش و همکاران (2014) نشان داد که کاربرد باکتری‌های حل کننده روی موجب افزایش معنی‌دار آنزیم‌های دهیدروژناز و بتا-گلوکوزیداز، اکسین، تنفس میکروبی و زیتوده میکروبی در ریزوسفر گندم و سویا شد. همچنین این باکتری‌ها pH ریزوسفر را کاهش دادند.

با توجه به خصوصیات محرک رشدی بارز *سودوموناس فلورسنس* و نقش آن‌ها در انحلال ترکیبات کم‌محلول و نامحلول عناصر مختلف از جمله فسفر و روی و در نتیجه افزایش فراهمی آن‌ها برای گیاه، هدف از این پژوهش جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس* از ریزوسفر مناطق مختلف پسته‌کاری رفسنجان و حومه، بررسی برخی از مهم-ترین خصوصیات محرک رشدی آن‌ها و تاثیر جدایه-های منتخب بر برخی پارامترهای رشدی و غلظت عناصر غذایی نهال‌های پسته می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس*

به منظور جداسازی باکتری‌های *سودوموناس فلوروسنس*، 80 نمونه خاک از ریزوسفر درختان پسته مناطق مختلف رفسنجان، کوثر ریز، کشکوئیه، انار، کبوترخان و نوق جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد (شکل 1). سپس 10 گرم از خاک ریزوسفری همراه با ریشه به ارلن‌های حاوی 90 میلی‌لیتر محلول بافر استریل (کلرید سدیم 0/9 درصد) منتقل و به‌مدت 30 دقیقه با سرعت 150 دور در دقیقه شیک داده شدند. پس از آن با تهیه سری رقت از خاک و با استفاده از محیط کشت King B باکتری‌ها جداسازی شدند. پس از آن عملیات خالص‌سازی باکتری‌ها بر اساس پرتوافشانی زیر لامپ UV تکرار شده و 34 جدایه انتخاب و بر روی محیط کشت شیب‌دار ذخیره‌سازی (در دمای 4-1 درجه سانتی-گراد) شدند. در نهایت جدایه‌های D_{17} و D_{30} به‌دلیل نداشتن خاصیت فلورسانس حذف و 32 جدایه از نظر خصوصیات محرک رشدی مختلف بررسی شدند.

توان تولید سیدروفور به روش CAS[1]

این آزمون با استفاده از روش اصلاح شده الکساندر و زوبرر (1991) انجام شد. برای تهیه این محیط چهار محلول شامل معرف Fe-CAS، بافر، محلول غذایی و کازو آمینو اسید باهم مخلوط شد. ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت NB[2] به‌مدت 48 ساعت کشت داده شده، سپس 15 میکرولیتر تعلیق تازه باکتری با جمعیت 10^8 ($CFU\ ml^{-1}$) به‌روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط CAS کشت داده شده و تولید هاله نارنجی رنگ بیانگر تولید سیدروفور بود. در فواصل زمانی 2، 4 و 6 روز نسبت قطر هاله به کلونی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان تولید اکسین

به‌منظور بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها، ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت درمحیط کشت NB کشت داده و سپس 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط NB حاوی 100 میلی‌گرم در لیتر ال – تریپتوفان منتقل شد. بعد از 48 ساعت سوسپانسیون باکتری سانتریفیوژ و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با 2 میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5 میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ 0/5 مولار) مخلوط شد. سپس به مدت 25 دقیقه در دمای اتاق نگهداری و بلافاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج 535 نانومتر قرائت شد (بنت و همکاران، 2001). مقدار تولید اکسین با مقایسه این جذب با نمودار استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه شد.

توان تولید سیانید هیدروژن

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن بر اساس روش دونیت-کوریا و همکاران (2004) انجام شد. برای این منظور ابتدا جدایه‌ها در پلیت‌های حاوی محیط NB غنی شده با گلایسین (4/4 گرم در لیتر) کشت داده شدند. بدین ترتیب که هر پلیت با 100 میکرولیتر سوسپانسیون باکتری که 48 ساعت انکوبه شده بود تلقیح، سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم 2 درصد و اسید پیکریک 0/5 درصد در داخل در پلیت قرار داده شد. سپس پلیت‌ها با استفاده از پارافیلم درز بندی شده تا از خروج گاز سیانید هیدروژن جلوگیری شود، آنگاه 5 روز در انکوباتور نگهداری و براساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (کم)، نارنجی (نسبتا کم)، قهوه‌ای روشن (نسبتا زیاد) و آجری (زیاد) که به‌ترتیب از 1 تا 5 درجه‌بندی شدند،

1. Chrome Azurol S
2. Nutrient Broth

میزان تولید سیانید هیدروژن تعیین شد. هم‌چنین رنگ تولید شده برای اولین بار با استفاده از دفترچه رنگ مانسل بررسی و براساس Hue، Vlaue و Chroma گزارش شد. به‌طوری‌که با تغییر Hue از سمت 10Y به YR و 10R تولید HCN افزایش یافته و در یک Hue برابر، هرچه عدد Value و Chroma بزرگتر، تولید HCN کمتر است.

اندازه‌گیری توان حل فسفات‌های معدنی در محیط جامد

در این روش ابتدا باکتری‌ها به مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده شدند. برای تشخیص نیمه کمی توان حلالیت فسفر، 15میکرولیتر تعلیق تازه باکتری با جمعیت 10^8(CFU ml^{-1}) با روش لکه‌گذاری و با سه تکرار روی پلیت‌های حاوی محیط جامد PKV[1] (0/5 گرم $(NH_4)_2SO_4$، 0/5 گرم $MgSO4.7H_2O$، 0/3 گرم NaCl، 0/3 گرم KCl، 0/03 گرم $FeSO_4.7H_2O$، 0/02 گرم $MnSO_4.H_2O$ و 10 گرم گلوکز) که حاوی 5 گرم در لیتر نمک نامحلول تری‌کلسیم‌فسفات بود، کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده در دمای 28 درجه سانتی‌گراد نگهداری و هاله شفاف اطراف کلونی به عنوان حلالیت تری‌کلسیم‌فسفات درنظرگرفته شد. نسبت قطر هاله بر قطر کلنی پس از گذشت 5 روز اندازه‌گیری شد (راشید و همکاران، 2004).

اندازه‌گیری توان حل فسفات‌های معدنی در محیط مایع

برای این منظور از محیط PKV که حاوی نمک نامحلول تری‌کلسیم‌فسفات بود استفاده شد. در این روش ابتدا باکتری‌ها به‌مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده شده، سپس 200 میکرولیتر از تعلیق باکتری با جمعیت 10^8(CFU ml^{-1}) به 25 میلی‌لیتر محیط PKV حاوی 5 گرم در لیتر تری‌کلسیم‌فسفات منتقل شد. سپس ارلن‌های تلقیح شده همراه با یک شاهد به‌مدت 120 ساعت شیکر شده و بعد از آن pH آن‌ها قرائت شد. هم‌زمان با عملیات فوق تعلیق باکتری سانتریفوژ (با دور 10000 به‌مدت 15 دقیقه) و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با 3 میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات-وانادات مخلوط شد. پس از 10 دقیقه خواباندن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 470 نانومتر قرائت شده و میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با استفاده از KH_2PO_4 محاسبه شد (جیون و همکاران، 2003).

اندازه‌گیری توان حل کنندگی ترکیبات کم‌محلول روی در محیط جامد

در این روش ابتدا باکتری‌ها به‌مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده شده سپس 15 میکرولیتر از تعلیق تازه باکتری با جمعیت 10^8(CFU ml^{-1}) به روش لکه‌گذاری در 3 تکرار روی پلیت‌های حاوی محیط جامد PKV که حاوی 0/1 درصد (1 گرم در لیتر) نمک‌های $ZnCO_3$ و ZnO و 5 گرم در لیتر KH_2PO_4 (منبع فسفر محلول) بودند کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده به‌مدت 5 روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری و هاله شفاف اطراف کلونی به عنوان انحلال ترکیبات کم محلول روی درنظرگرفته شد. سپس نسبت قطر هاله به کلونی اندازه‌گیری شد (ساراوانان و همکاران، 2003).

اندازه‌گیری توان حل کنندگی ترکیبات کم‌محلول روی در محیط مایع

برای این منظور از محیط مایع PKV که حاوی 1 گرم در لیتر نمک‌های $ZnCO_3$ و ZnO بود، استفاده شد. ابتدا باکتری‌ها به‌مدت 48 ساعت در محیط NB کشت داده سپس 200 میکرولیتر از تعلیق تازه باکتری با جمعیت 10^8(CFU ml^{-1}) به 25 میلی‌لیتر محیط PKV منتقل شد. نمونه‌ها برای مدت 120 ساعت شیکر شده و پس از آن pH آن‌ها قرائت شد. هم‌زمان با عملیات فوق تعلیق باکتری سانتریفوژ (با دور 10000به‌مدت 15 دقیقه) و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با محیط PKV به نسبت 30:1 رقیق شده و مقدار روی قابل دسترس در نمونه‌های تلقیح شده با باکتری و شاهد با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد (ساراوانان و همکاران، 2003).

آزمون گلخانه‌ای

پس از انجام تست‌های مختلف در شرایط آزمایشگاه، در نهایت سه جدایه (D_6، D_{10} و D_{15}) با خصوصیات محرک رشدی مناسب انتخاب و تاثیر آن‌ها بر برخی پارامترهای رشدی و جذب عناصر غذایی نهال‌های پسته در قالب طرح کامل تصادفی با 3 تکرار مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه خاک مناسب و تعیین برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن (علی‌احیایی و بهبهانی‌زاده، 1372) (جدول 4). در هر گلدان 5 کیلوگرم خاک ریخته شد پس از ضدعفونی کردن بذور پسته رقم بادامی، در هر گلدان 8 بذر جوانه‌دار کشت شده و هر بذر با 200 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر تلقیح گردید. دو هفته پس از کشت تعداد نهال‌ها در هر گلدان به 5 عدد تقلیل یافته و عناصر غذایی نیتروژن از منبع اوره (50 میلی‌گرم در کیلوگرم)، فسفر از منبع KH_2PO_4 (20 میلی‌گرم در کیلوگرم)، آهن از منبع Fe-EDTA (10 میلی-

[1] Pikovskaya

گرم در کیلوگرم) و منگنز از منبع $MnSO_4.H_2O$ (5 میلی-گرم در کیلوگرم) بر اساس آزمون خاک به هر گلدان اضافه شد. پس از طی دوره رشد (24 هفته)، نهال‌ها برداشت و پارامترهای ارتفاع نهال، سطح برگ، وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه و همچنین غلظت فسفر، آهن، روی، منگنز و مس (امامی، 1375) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS به‌صورت طرح کاملا تصادفی با 3 تکرار و مقایسه میانگین‌ها نیز به‌روش دانکن انجام شد.

نتایج

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به نسبت قطر هاله به کلونی جدایه‌ها در رابطه با تولید سیدروفور در سطح 0/1 درصد معنی‌دار شد (جدول 1). مقدار تولید سیدروفور با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلونی جدایه‌ها ارزیابی شد. نتایج حاصل از بررسی توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* مورد مطالعه در این تحقیق نشان داد که تمام جدایه‌ها توانایی رشد و تولید سیدروفور در محیط CAS را دارا بودند. بیشترین نسبت قطر هاله به کلونی در زمان-های 2، 4 و 6 روز به‌ترتیب به جدایه‌های D_{22} با 3/08، D_9 با 3/21 و D_9 با 2/86 تعلق داشت. کمترین نسبت قطر هاله به کلونی در زمان‌های فوق به‌ترتیب به جدایه‌های D_{16} با 1/29، D_{20} با 1/18 و D_{16} با 1/81 مربوط بود (جدول 2). در این پژوهش از سویه *سودوموناس فلوروسنس* Cf_{23} (تولید سیدروفور با نسبت قطر هاله به کلونی 2/73، انحلال فسفر در محیط مایع 338/3 میکروگرم بر میلی‌لیتر، تولید اکسین در سطح 100پی-پی‌ام ال-تریپتوفان 10/45 میلی‌گرم بر لیتر) به‌عنوان شاهد مثبت در تولید سیدروفور استفاده شد (عباس-زاده و همکاران، 2010).

بررسی نتایج نشان داد که تجزیه واریانس داده-های مربوط به تولید اکسین توسط جدایه‌های مختلف در سطح 0/1 درصد معنی‌دار شد (جدول 1). توانایی جدایه-های مورد مطالعه در این تحقیق از نظر تولید اکسین متفاوت بود. بر اساس نتایج به‌جز جدایه D_4، بقیه جدایه‌ها (96/88 درصد) قادر به تولید اکسین در غلظت 100 پی-پی‌ام ال- تریپتوفان بودند. مقدار تولید اکسین توسط جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* در غلظت 100 پی‌پی‌ام ال- تریپتوفان بین 0 تا 16/64 میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود که بیشترین مقدار آن مربوط به جدایه D_{15} بود و اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها داشت ($p<0.05$). مقدار متوسط تولید اکسین توسط این جدایه‌ها برابر 4/65 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. هم‌چنین بر اساس نتایج 50 درصد جدایه‌ها قادر به تولید اکسین در دامنه 4-0، 40/62 درصد در دامنه 8-4، 6/25 درصد در دامنه 12-8 و 3/13 درصد در دامنه 17-12 پی‌پی‌ام بودند (جدول 2).

نتایج نشان داد که 75 درصد جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق توانایی تولید سیانید هیدروژن را دارا بودند. همچنین 28 درصد جدایه‌ها توانایی تولید HCN با درجه زیاد (5)، 6/25 درصد با درجه نسبتا زیاد (4)، 31 درصد با درجه نسبتاً کم (3) و 9/37 درصد با درجه کم (2) را داشتند. (جدول 2).

با توجه به جدول تجزیه واریانس، نسبت قطر هاله به کلونی جدایه‌ها در محیط جامد حاوی نمک نامحلول تری کلسیم فسفات در سطح 0/1 درصد معنی‌دار شد (جدول 1). نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به رشد و انحلال فسفات بودند هرچند توانایی آن‌ها در این مورد متفاوت بود. نسبت قطر هاله به کلونی جدایه‌ها در محیط کشت جامد در دامنه 2/09 و 1/23 متغیر و به‌طور متوسط برابر با 1/62 بود. بیشترین و کمترین نسبت قطر هاله به کلونی به‌ترتیب به جدایه‌های D_8 و D_{12} مربوط بود. جدایه D_8 با 81/25 درصد جدایه‌ها اختلاف معنی-داری در سطح 5 درصد داشت (جدول 2).

انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول توسط جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* و هم‌چنین تغییرات pH محیط کشت در سطح 0/1 درصد معنی‌دار شد. نتایج ارزیابی انحلال تری کلسیم فسفات در محیط مایع توسط جدایه‌ها نشان داد که همه جدایه‌ها قادر به انحلال آن بودند. بیشترین مقدار انحلال فسفات متعلق به جدایه D_6 (705 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین آن به جدایه D_4 (187 میکروگرم بر میلی‌لیتر) مربوط بود. هم‌چنین متوسط انحلال فسفات توسط جدایه‌ها در محیط مایع برابر 496 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. مقایسه pH تعلیق جدایه‌های مختلف با تیمار شاهد بدون باکتری نشان داد که تمامی جدایه‌ها موجب کاهش معنی‌دار pH شدند. دامنه تغییرات pH توسط جدایه‌ها نیز از 3/27 تا 4/82 متغیر بود. کمترین مقدار pH مربوط به جدایه D_{13} مربوط و pH تیمار شاهد برابر 5/68 بود (جدول 2).

نتایج نشان داد که در محیط حاوی اکسید روی حدود 75 درصد جدایه‌ها قادر به رشد و تشکیل هاله شفاف اطراف کلونی شدند. توانایی حل کنندگی ZnO در محیط جامد براساس نسبت قطر هاله به کلونی ارزیابی شد. با توجه به نتایج حاصله، نسبت قطر هاله به کلونی در این محیط در دامنه 1/25 تا 3/54 متغیر و به‌طور متوسط برابر 1/83 بود. بیشترین و کمترین نسبت قطر هاله به

کلونی به جدایه‌های D_{10} و D_{21} مربوط بود. هم‌چنین نتایج نشان داد که فقط 12/5 درصد جدایه‌ها (D_{10}، D_{25}، D_{26} و D_{29}) توانایی تشکیل هاله شفاف در محیط جامد حاوی $ZnCO_3$ را دارا بودند. هم‌چنین نسبت قطر هاله به‌کلونی در محیط حاوی نمک نامحلول کربنات‌روی از 1/83 تا 3/98 متغیر بود. بیشترین نسبت قطر هاله به‌کلونی مربوط به جدایه D_{10} بود که با جدایه‌های دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (جدول 3). تجزیه واریانس انحلال روی و تغییرات pH در محیط مایع حاوی نمک‌های نامحلول ZnO و $ZnCO_3$ در سطح 0/1 درصد معنی‌دار شد (جدول 1). در محیط حاوی اکسید روی 75 درصد جدایه‌ها قادر به انحلال روی بودند. انحلال روی در این محیط از 0 تا 68/37 میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. در این محیط بیشترین و کمترین انحلال روی به جدایه‌های D_{14} و D_{26} مربوط بود که به‌ترتیب برابر 67/4 و 2/60 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. جدایه D_{14} از نظر انحلال روی در محیط حاوی اکسید روی اختلاف معنی‌داری با دیگر جدایه‌ها داشت. هم‌چنین تغییرات pH در این محیط از 4/95 تا 7/00 متغیر بود. بیشترین کاهش pH در این محیط به جدایه D_{14} تعلق داشت (جدول 3). در محیط مایع حاوی $ZnCO_3$ حدود 46/8 درصد جدایه‌ها توانایی انحلال روی را دارا بودند. انحلال روی در این محیط از 0 تا 7/70 میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر و به‌طور متوسط برابر 2/48 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بیشترین روی حل شده به جدایه D_{25} مربوط بود هم‌چنین تغییرات pH در این محیط از 6/26 تا 7/00 متغیر بود (جدول 3).

تأثیر جدایه‌های منتخب بر پارامترهای رشدی و غلظت عناصر غذایی در سطوح 1 و 5 درصد معنی دار شد (جدول 5). نتایج نشان داد که تلقیح با جدایه‌های منتخب ارتفاع نهال پسته را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. بیشترین مقدار ارتفاع نهال مربوط به جدایه D_{16} برابر با 17/3 سانتی‌متر بر نهال بود که اختلاف معنی‌داری با دیگر جدایه‌ها داشت ($p<0.05$). هم‌چنین سطح برگ نهال‌های تلقیح شده با جدایه‌های D_5 و D_{10} اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد ($p<0.05$). تلقیح با جدایه‌های مورد آزمایش وزن خشک اندام‌هوایی و ریشه نهال‌ها را به‌طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. هرچند جدایه D_{16} تاثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه نداشت (جدول 6).

بر اساس نتایج بدست آمده غلظت فسفر اندام‌هوایی نهال‌های تلقیح شده با جدایه‌های D_6، D_{10}، و D_{16} به ترتیب 47، 26، و 16 درصد نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. بیشترین غلظت فسفر مربوط به جدایه D_6 برابر با 0/28 درصد بود. هم‌چنین نتایج نشان داد که غلظت عناصر آهن، روی، منگنز و مس در نهال‌های تلقیح شده با جدایه‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری ($p<0.05$) نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت. بیشترین غلظت عناصر آهن، روی، منگنز و مس در اندام‌هوایی نهال‌ها به‌ترتیب برابر 132/9، 13/43، 27/40 و 13/67 میکروگرم بر گرم وزن خشک بود که به جدایه‌ی D_{10} تعلق داشت (جدول 6).

بحث و نتیجه‌گیری

باکتری‌های جنس *سودوموناس* و به‌ویژه *سودوموناس‌های فلورسنس* به‌دلیل داشتن خصوصیات محرک رشدی (PGP) مختلف و هم‌چنین اثرات مثبت تلقیح آن‌ها بر رشد گیاه، بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند. بررسی خصوصیات محرک رشدی 32 باکتری *سودوموناس‌های فلورسنس* جدا شده از ریزوسفر درختان پسته در این پژوهش نشان داد که تمامی جدایه‌ها توانایی تولید سیدروفور در محیط CAS آگار و انحلال تری کلسیم فسفات را دارا بودند. همچنین به‌ترتیب 96/88، 75، 75 و 46/88 درصد جدایه‌ها قادر به تولید اکسین، HCN، انحلال اکسید روی و انحلال کربنات روی بودند. داشتن خصوصیات PGP *سودوموناس‌ها* توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (سلطانی طولارود و همکاران، 1386؛ عباس‌زاده و همکاران، 2010؛ نورین و همکاران، 2012).

ریزجانداران خاک در شرایط کمبود آهن ($Fe^{+3}<10\mu M$) با ترشح سیدروفور که کمپلکس پایداری با آهن (III) می‌دهد، آن‌را به‌صورت محلول و قابل دسترس درمی‌آورند (لیونی و همکاران، 2002). *سودوموناس‌های* تولید کننده سیدروفور مانع جذب آهن توسط بیمارگرهای گیاهی شده و رشد گیاه را بهبود می‌بخشند (اسیلوان و اگارا، 1992). توانایی تولید سیدروفور توسط سویه‌های مختلفی از *سودوموناس‌ها* گزارش شده است (رسولی و همکاران، 1384؛ مه‌یر، 2000). قطر هاله می‌تواند به‌عنوان معیاری از میزان تولید سیدروفور به‌کار رود (لوپر و هنکلس، 1999). در این مطالعه رنگ هاله اطراف کلونی از زرد تا نارنجی تیره متغیر بود. بر اساس نتایج رسولی و همکاران (1384) 100 درصد جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* جدا شده از ریزوسفر گندم توانایی تولید سیدروفور در محیط CAS آگار را داشتند. هم‌چنین عباس‌زاده و همکاران (2010) گزارش کردند که تمامی 40 جدایه *سودوموناس* قادر به تولید سیدروفور بودند که متوسط تولید آن براساس نسبت قطر هاله به کلونی برابر 1/79 بود. در این پژوهش نیز

نتایج نشان داد که 100 درصد جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* توانایی تولید سیدروفور در محیط CAS آگار را دارا بودند. دامنه تولید سیدروفور توسط این جدایه‌ها براساس نسبت قطر هاله به کلونی از 1/81 تا 2/86 متغیر بود.

اکسین از مهم‌ترین هورمون‌های گیاهی است که به‌عنوان تنظیم کننده رشد گیاه شناخته شده و بر رشد، نمو و تمایز گیاه موثر است (گلیک، 1995). ایندول استیک اسید مهم‌ترین نوع اکسین است که از طریق متابولیسم ال-تریپتوفان توسط گیاهان و ریزجانداران مختلف مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها تولید می‌شود. *سودوموناس-ها* از فراوانترین و مهم‌ترین ریزجانداران تولید کننده اکسین هستند که تاثیر زیادی بر رشد گیاه دارند (خاکی-پور و همکاران، 2008). در پژوهش حاضر، به‌جز جدایه D_4 تمامی آن‌ها توانایی تولید اکسین را دارا بودند. متوسط تولید اکسین در غلظت 100 پی‌پی‌ام ال- تریپتوفان برابر 4/65 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. هم‌چنین بیشتر جدایه‌ها قادر به تولید اکسین در دامنه 4-0 میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. نتایج پژوهش‌های احمد و همکاران (2005) نشان داد که اکسین تولید شده توسط *سودوموناس‌ها* در دامنه 5/34 تا 53/2 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. هم‌چنین خاکی-پور و همکاران (2008) گزارش کردند که 72 درصد از سویه‌های *سودوموناس* توانایی تولید ترکیبات اکسینی را داشتند. تولید اکسین توسط سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* از 0 تا 31/6 و توسط *سودوموناس پوتیدا* از 0 تا 24/08 میلی‌گرم در لیتر متغیر بود.

سیانید هیدروژن (HCN) از متابولیت‌های ثانویه بسیاری از ریزجانداران است که به‌طور مستقیم از پرولین، گلایسین و یا گلیکوزیدهای سیانوژنیک ساخته می‌شود. تولید HCN توسط *سودوموناس‌ها* به مقدار آهن (III) قابل جذب بستگی دارد. این ترکیب از طرفی برای قارچ-ها سمی و از طرف دیگر تولید آن توسط باکتری‌ها موجب تشکیل ریشه‌های مویین می‌گردد (اسچیپرز و همکاران، 1987). مطابق نتایج حاصله از این پژوهش، 75 درصد جدایه‌ها توانایی تولید HCN را داشتند که از درجه نسبتا کم تا زیاد متغیر بود. در این رابطه ناگاراج‌کومار و همکاران (2004) بیان داشتند که سویه‌های *سودوموناس* مورد مطالعه قادر به تولید HCN بودند.

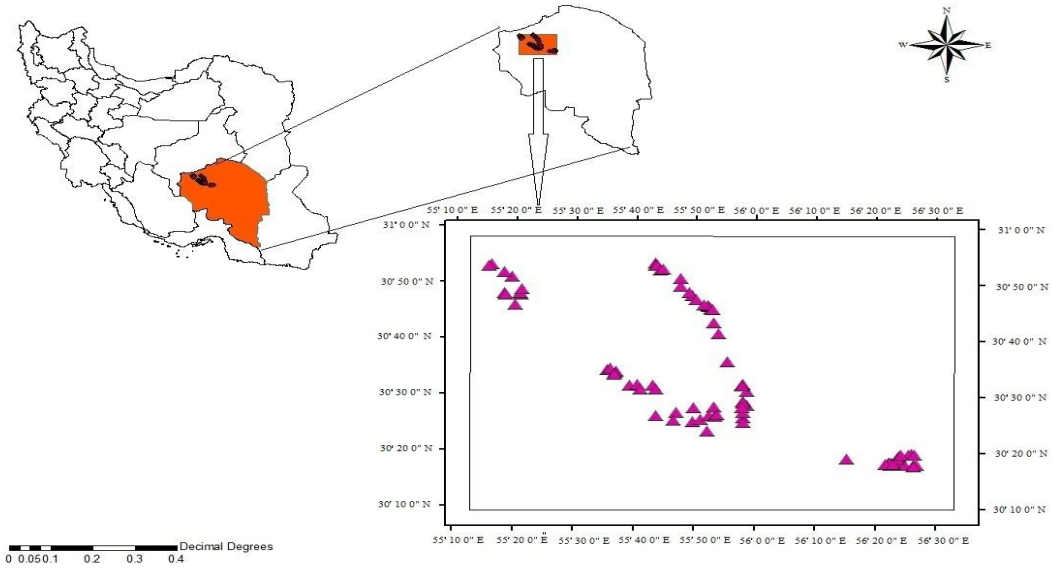
از دیگر خصوصیات مهم باکتری‌های جنس *سودوموناس*، توانایی انحلال فسفات‌های معدنی می‌باشد. نوری و سعود (2012) گزارش کردند که تمامی جدایه-های *سودوموناس فلورسنس* مورد مطالعه قادر به انحلال تری کلسیم فسفات در محیط جامد بودند. هم‌چنین نتایج مقامی و همکاران (1392) نشان داد که جدایه‌های *سودوموناس فلورسنس* جدا شده از ریزوسفر سویا توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول را دارا بودند. در پژوهش حاضر نیز تمامی جدایه‌ها موجب انحلال تری‌کلسیم فسفات و کاهش pH در محیط مایع و جامد شدند. متوسط فسفر حل شده توسط این جدایه‌ها برابر 496 میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. با توجه به تثبیت بخش اعظم فسفر در خاک و غیرقابل استفاده شدن آن برای گیاه، استفاده از باکتری‌های حل کننده فسفات می‌تواند به فراهمی و تغذیه فسفر گیاه کمک کند.

باکتری‌های مختلفی مانند *Bacillus spp.* و *Pseudomanas fluorescens* با مکانیسم‌هایی از قبیل ترشح اسیدهای آلی، پروتون، ترکیبات کلات کننده و هم-چنین اسیدهای معدنی (سولفوریک، کربنیک و ...) می‌توانند موجب افزایش انحلال ترکیبات کم‌محلول روی گردند (شهاب و احمد، 2008). در حالت کلی، حلالیت روی با افزایش pH کاهش یافته و فعالیت آن با تغییرات pH از حالت اسیدی به قلیایی با رسوب به‌صورت هیدروکسید، فسفات، کربنات و سیلیکات‌ها کاهش می‌یابد (باروا و بارتاکور، 1999). در پژوهش حاضر به‌ترتیب حدود 75 و 47 درصد جدایه‌ها توانایی انحلال ZnO و $ZnCO_3$ را داشتند که دلیل آن می‌تواند تولید اسیدهای آلی و یون H^+ توسط این جدایه‌ها باشد، به‌طوری که با کاهش pH محیط کشت، انحلال روی افزایش یافت. هم‌چنین همبستگی منفی معنی‌داری بین انحلال روی و تغییرات pH در هر دو محیط مشاهده شد. در این رابطه عباس‌زاده و همکاران (1391) بیان داشتند که 20 درصد از سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* جدا شده از ریزوسفر گیاهان مختلف توانایی انحلال نمک-های ZnO و $ZnCO_3$ را دارا بودند.

باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق تولید هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین و سیتوکینین، تولید سیدروفور و تولید اسیدهای آلی می‌توانند رشد گیاه را افزایش دهند. در این پژوهش تلقیح با جدایه‌های منتخب موجب بهبود پارامترهای رشدی گیاه از جمله وزن خشک، ارتفاع نهال و سطح برگ نهال‌های پسته شد. با توجه به تولید هورمون IAA، سیدروفور و انحلال فرم-های نامحلول فسفر و روی توسط جدایه‌های مورد آزمایش، می‌توان بهبود رشد نهال‌ها را به آن‌ها نسبت داد. شاهارونا و همکاران (2006) گزارش کردند که تلقیح با باکتری‌های محرک رشد گیاه تولید کننده IAA موجب افزایش وزن ریشه، رشد طولی و انشعابات فرعی ریشه و تولید ریشه‌های نازک‌تر شده و در نتیجه جذب آب و

عناصر غذایی را افزایش می‌دهند. تلقیح با *سودوموناس-های فلوروسنس* موجب افزایش وزن ریشه و اندام‌هوایی کلزا در محیط کشت هیدروپونیک شد (ون‌پیر و اسچیپر، 1998). هم‌چنین غلظت عناصر غذایی مورد مطالعه در نهال‌های تلقیح شده با جدایه‌های منتخب به‌طور معنی-داری افزایش یافت. ساندرا و همکاران (2002) گزارش دادند باکتری‌های حل کننده فسفات، pH خاک را از طریق تولید انواع اسیدهای آلی کاهش می‌دهند و از این طریق سبب دسترسی بیشتر به عناصری از قبیل فسفر می‌شوند. کلوپر و همکاران (1980) گزارش کردند که سیدروفورهای میکروبی می‌توانند با افزایش فراهمی آهن در خاک اطراف ریشه، رشد ریشه و جذب آهن را افزایش دهند. سیدروفور ترشح شده توسط باکتری‌ها، با آهن فریک خاک تشکیل کمپلکس پایدار داده و با جلوگیری از تثبیت و غیرفعال شدن آن در خاک، تغذیه آهن گیاه را بهبود می‌بخشد (اسولیوان و اگارا، 1992). نتایج مطالعات چن و همکاران (1994) نشان داد که سیدروفور تولید شده توسط باکتری *سودوموناس پوتیدا* حلالیت آهن، روی، منگنز و مس را افزایش داد. نقش اصلی باکتری‌ها در انحلال روی، کاهش pH به 5 یا کم‌تر، انحلال روی و به‌دنبال آن افزایش فراهمی این عنصر می‌باشد (ساراتامبالم و همکاران، 2010).

با توجه به نتایج حاصله، داشتن خصوصیات محرک رشدی مختلف از قبیل تولید سیدروفور، اکسین و انحلال ترکیبات نامحلول فسفر و روی توسط این جدایه-ها و بهبود پارامترهای رشدی و غلظت عناصر غذایی در نهال‌های پسته، می‌توان از این جدایه‌ها برای تهیه مایه تلقیح مناسب پس از انجام آزمون‌های باغی در راستای افزایش فراهمی عناصر غذایی و بهبود رشد گیاهان مختلف از جمله پسته استفاده کرد.



شکل 1- نقشه نقاط نمونه‌برداری شده

جدول 1- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های *سودوموناس فلوروسنس* بر انحلال فسفر، روی، تولید سیدروفور و اکسین

منابع تغییر	درجه آزادی	حل کنندگی فسفر			حل کنندگی روی (ZnO)			حل کنندگی روی ($ZnCO_3$)			سیدروفور (قطر هاله به کلونی)			اکسین
		(قطر هاله به کلونی)	محیط مایع	pH	(قطر هاله به کلونی)	محیط مایع	pH	(قطر هاله به کلونی)	محیط مایع	pH	روز دوم	روز چهارم	روز ششم	
جدایه	31	0/11***	53407***	0/76***	0/32***	622***	0/62***	3/05***	24/20***	0/17***	0/57***	0/94***	0/72***	31/10***
خطا	64	0/03	2674	0/04	0/04	9/34	0/06	0/06	0/20	0/01	0/04	0/06	0/06	0/99
ضریب تغییرات		10/60	10/40	5/19	11/50	36/10	3/71	9/47	17/90	1/44	9/51	11/00	12/20	21/30

***: معنی‌دار در سطح 0/1درصد

جدول 2- توان انحلال فسفر (تری‌کلسیم‌فسفات) و تولید سیدروفور، سیانید هیدروژن (HCN) و اکسین توسط جدایه‌های *سودوموناس فلوروسنس* مورد مطالعه

جدایه	انحلال فسفر			سیدروفور قطر هاله به کلونی			HCN رنگ کیفی	اکسین ($\mu g\ ml^{-1}$)
	قطر هاله به کلونی	محیط مایع ($\mu g\ ml^{-1}$)	pH	روز دوم	روز چهارم	روز ششم		
D_1	1/62 df	650 ac	3/58 hi	2/20 di	2/18 gi	2/01 fj	5	1/17 ln
D_2	2/04 ab	496 dh	3/70 gh	1/97 hl	1/68 kl	1/50 ln	3	5/70 df
D_3	1/61 df	518 dg	4/08 dg	2/61 bc	2/50 cg	2/15 di	3	3/81 fk
D_4	1/63 df	187 l	4/35 cd	1/35 n	1/38 lm	1/27 n	1	0/00 n
D_5	1/54 dh	542 df	4/09 dg	2/25 ch	2/14 gj	2/17 di	3	3/82 fk
D_6	1/78 ae	705 a	4/01 dg	2/14 fk	2/32 di	2/09 ei	3	2/99 hl
D_7	1/44 eh	532 df	3/93 dh	1/85 Im	1/86 ik	1/54 kn	5	2/97 hl
D_8	2/09 a	510 dg	3/98 dh	2/06 gk	1/89 hk	1/97 gk	5	2/55 im
D_9	1/61 df	498 dh	4/01 dg	2/79 ab	3/21 a	2/86 a	2	5/15 eg
D_{10}	1/86 ad	412 hi	3/97 dh	2/17 fj	2/66 cf	2/67 ac	1	1/21 ln
D_{11}	1/40 fh	595 bd	4/12 df	1/62 ln	1/70 jl	1/94 hl	3	3/98 ek
D_{12}	1/57 dh	656 ab	3/28 ij	2/60 bd	2/71 ce	2/41 ah	3	2/38 jm
D_{13}	1/27 gh	676 ab	3/27 ij	1/78 km	2/13 gj	1/83 im	3	2/42 jm
D_{14}	1/62 df	482 eh	3/91 eh	1/58 mn	1/46 km	1/37 n	1	0/74 mn
D_{15}	1/47 eh	403 hi	4/06 dg	1/78 km	1/65 kl	1/47 mn	1	16/64 a
D_{16}	1/45 eh	216 kl	4/82 b	1/29 n	1/39 lm	1/18 n	1	9/72 b
D_{18}	1/53 dh	188 l	4/34 cd	1/37 n	1/33 lm	1/28 n	1	7/77 c
D_{19}	1/66 cf	664 ab	3/16 j	2/19 ej	2/22 fi	2/03 fi	3	3/41 gk
D_{20}	1/86 ac	523 dg	4/03 dg	1/41 n	1/18 m	1/36 n	3	4/07 ej
D_{21}	1/52 dh	463 fh	4/08 dg	2/17 fj	2/27 ei	2/34 bh	1	2/08 jm
D_{22}	1/96 ac	338 ij	4/60 bc	3/08 a	3/17 ab	2/78 ab	2	5/81 de
D_{23}	1/23 h	293 jk	4/32 ce	2/13 fk	2/48 cg	2/18 di	1	6/59 cd
D_{24}	1/50 eh	499 dh	4/23 ce	2/42 cg	2/75 bd	2/47 af	5	6/59 cd
D_{25}	1/63 df	428 gi	4/04 dg	2/43 bg	2/93 ac	2/54 ae	2	6/63 cd
D_{26}	1/58 dg	521 dg	3/98 dh	1/76 km	1/58 km	1/56 jn	3	4/00 ek
D_{27}	1/73 bf	520 dg	3/80 fh	2/56 be	2/90 ac	2/78 ab	5	10/17 b
D_{28}	1/50 eh	543 df	3/94 dh	2/18 ej	2/70 ce	2/23 ci	4	5/76 de
D_{29}	1/56 dh	557 cf	3/97 dh	2/37 cg	2/56 cg	2/43 ag	5	4/54 eh
D_{31}	1/68 cf	583 be	3/97 dh	2/50 bf	2/33 dh	2/12 di	5	4/41 ei
D_{32}	1/67 cf	581 be	3/95 dh	2/25 ch	2/59 cg	2/59 ad	4	5/45 df
D_{33}	1/63 df	542 df	3/95 dh	1/83 jm	1/89 hk	2/06 ei	5	3/01 hl
D_{34}	1/61 df	554 cf	3/91 eh	2/32 ch	2/25 ei	2/28 ci	5	3/31 gk
شاهد	-	-	5/68 a					

در هرستون میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد می‌باشند.

جدول 3- توان انحلال نمک‌های کم محلول روی توسط جدایه‌های مختلف *سودوموناس فلوروسنس* در محیط جامد و مایع

جدایه	قطر هاله به کلونی	مقدار روی ($\mu g\ ml^{-1}$)	pH	قطر هاله به کلونی	مقدار روی ($\mu g\ ml^{-1}$)	pH
	ZnO			$ZnCO_3$		
D_1	1/78 cf	5/71 eg	6/65 ab	-	0/00 g	7/00 a
D_2	2/11 bc	0/00 g	6/91 a	-	0/00 g	7/00 a
D_3	1/72 dg	0/00 g	6/85 a	-	0/00 g	7/00 a
D_4	1/57 ei	8/20 df	6/81 ab	-	0/00 g	7/00 a
D_5	1/65 dh	7/91 df	6/67 ab	-	0/00 g	7/00 a
D_6	1/50 fi	0/00 g	6/96 a	-	0/00 g	7/00 a
D_7	1/71 dg	0/00 g	6/88 a	-	0/00 g	7/00 a
D_8	2/01 bd	0/00 g	6/93 a	-	4/40 e	6/64 eg
D_9	2/24 b	0/00 g	6/81 a	-	0/00 g	7/00 a
D_{10}	3/54 a	54/53 b	5/33 f	3/98 a	6/34 bc	6/34 hi
D_{11}	1/30 hi	4/45 eg	6/88 a	-	0/00 g	7/00 a
D_{12}	1/67 dh	4/52 eg	6/76 a	-	4/65 e	6/76 be
D_{13}	-	5/88 eg	6/81 a	-	4/52 e	6/69 bf
D_{14}	3/45 a	67/37 a	4/95 f	-	0/00 g	7/00 a
D_{15}	1/94 be	8/25 df	6/56 ad	-	0/00 g	7/00 a
D_{16}	1/70 dg	0/00 g	6/95 a	-	4/33 e	6/72 bf
D_{18}	1/30 hi	0/00 g	7/00 a	-	0/00 g	7/00 a
D_{19}	-	4/22 eg	6/81 a	-	0/00 g	7/00 a
D_{20}	-	9/47 df	6/16 de	-	0/00 g	7/00 a
D_{21}	1/25 i	4/90 eg	6/67 ab	-	0/00 g	7/00 a
D_{22}	1/51 fi	12/80 cd	6/19 ce	-	0/00 g	7/00 a
D_{23}	2/00 bd	15/93 c	5/97 e	-	0/00 g	7/00 a
D_{24}	1/30 hi	4/46 eg	6/77 a	-	4/39 e	6/48 gh
D_{25}	1/76 cf	3/99 eg	6/69 a	1/83 b	7/70 a	6/26 i
D_{26}	1/36 gi	2/60 fg	6/78 a	2/22 b	7/66 a	6/26 i
D_{27}	1/95 be	6/07 eg	6/79 a	-	6/63 b	6/58 eg
D_{28}	-	5/95 eg	6/66 ab	-	5/66 cd	6/68 bf
D_{29}	-	7/91 df	6/66 ab	1/92 b	3/22 f	6/83 ab
D_{31}	1/61 ei	5/65 eg	6/63 ac	-	4/52 e	6/77 bd
D_{32}	-	10/02 de	6/21 be	-	6/03 bd	6/63 dg
D_{33}	-	4/25 eg	6/74 a	-	5/47 d	6/57 fg
D_{34}	-	6/11 eg	6/62 ac	-	4/22 e	6/82 ac
شاهد	-	-	7/00 a	-	-	7/00 a

در هرستون میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد می باشند؛ (-): عدم رشد کلونی.

جدول 4- برخی از خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده

Texture	Cu	Mn	Zn	Fe	K	P	OM	EC	pH	CEC
	mg kg^{-1}						%	$dS\ m^{-1}$		$Cmol_+\ kg^{-1}$
لوم‌شنی	1/44	3/14	0/35	1/67	147/6	9/16	0/34	1/07	7/82	11/25

جدول 5- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های منتخب *سودوموناس فلوروسنس* بر پارامترهای رشدی و غلظت عناصر در نهال‌های پسته

منابع تغییر	درجه آزادی	ارتفاع نهال	سطح برگ	وزن خشک اندام‌هوایی	وزن خشک ریشه	فسفر	آهن	روی	منگنز	مس
جدایه	3	12/44**	389/53*	0/35*	0/17*	0/0043*	375/45**	8/51**	64/73**	19/07**
خطا	8	0/61	75/19	0/07	0/03	0/0001	54/41	0/25	3/07	0/85
ضریب تغییرات		5/91	3/61	4/84	4/21	5/6897	6/21	4/23	8/07	8/58

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح 5 درصد و معنی‌دار در سطح 1 درصد.

جدول 6- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های منتخب *سودوموناس فلوروسنس* بر پارامترهای رشدی و غلظت عناصر در نهال‌های پسته

جدایه	ارتفاع نهال	سطح برگ	وزن خشک اندام‌هوایی	وزن خشک ریشه	فسفر	آهن	روی	منگنز	مس
	(cm plant^{-1})	(cm^2 pot^{-1})	(g pot^{-1})	(g pot^{-1})	(%)	(μg g^{-1} DW)			
شاهد	12/14 c	226/3 b	4/83 b	4/02 b	0/19 c	106/3 c	9/49 c	16/9 c	8/14 c
D_6	15/6 b	253/7 a	5/64 a	4/54 a	0/28 a	121/1 ab	12/51 ab	23/37 b	9/20 c
D_{10}	14/9 b	244/5 a	5/43 a	4/49 a	0/24 b	132/9 a	13/43 a	27/40 a	13/67 a
D_{16}	17/3 a	237/8 ab	5/27 ab	4/39 a	0/22 b	114/9 bc	12/00 b	19/17 c	11/90 b

در هرستون میانگین‌های دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد می باشند.

فهرست منابع:

1. امامی، ع. 1375. روش‌های تجزیه گیاه. موسسه تحقیقات خاک و آب. نشریه فنی شماره 982، کرج، ایران.
2. رسولی‌صدقیانی، ح. خاوازی، ک. رحیمیان، ح. ملکوتی، م. ج. و اسدی‌رحمانی، ه. 1384. بررسی تراکم جمعیت و شناسایی *سودوموناس‌های فلورسنت* در ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران. مجله علوم خاک و آب. جلد 26، 206-195.
3. سلطانی طولارود، ع. صالح راستین، ن. خاوازی، ک. اسدی رحمانی، ه و عباس‌زاده دهجی، پ. 1386. جداسازی و بررسی صفات محرک رشد گیاهی برخی از *سودوموناس‌های فلورسنت* بومی خاک‌های ایران. مجله علوم خاک و آب. جلد 21، 289-277.
4. عباس‌زاده دهجی، پ. ثواقبی، غ. اسدی‌رحمانی، ه. رجالی، ف. فرحبخش، م. متشرع‌زاده، ب. و امیدواری، م. 1391. تأثیر *سودوموناس‌های فلورسنت* بر افزایش انحلال ترکیبات روی و بهبود جذب آن توسط لوبیا. مجله علوم خاک و آب. جلد 19، 233-224.
5. علی‌احیایی، م. و بهبهانی‌زاده، ع. ا. 1372. شرح روش‌های تجزیه خاک (جلد اول). موسسه تحقیقات خاک و آب. نشریه فنی شماره 893، کرج، ایران.
6. مقامی، م. علمایی، م. رسولی‌صدقیانی، ح. و دردی‌پور. ا. 1392. جداسازی و بررسی برخی از صفات محرک رشد گیاهی *سودوموناس‌های فلورسنت* بومی مزارع سویای استان گلستان. نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار. جلد 3، 264-251.
7. Abbas-Zadeh, P., Saleh-Rastin, N., Asadi-Rahmani, H., Khavazi, K., Soltani, A., Shoary-Nejati, R. and Miransari. M. 2010. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. Acta Physiologiae Plantrum 32:281-288.
8. Ahmad, F., Ahmad, L. and Saghir. M. 2005. Indol acetic acid production by the indogenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of Tryptophan. Turkish Journal of Biology 29: 29-34.
9. Alexander, D.B. and Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of Soils 12: 39-45.

10. Ashrafuzzaman, M., Hossen, F. A., Ismail, M. R., Hoque, M. A. and Islam, M. Z. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancementof rice growth. African Journal of Biotechnology 8: 1247-1252.
11. Baruah, T. C. and Barthakur, H. P. 1999. A Text Book of Soil Analysis, 2nd Ed., Vikal Publishing House Pvt. Ltd., NewDelhi.
12. Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C. P. and 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.
13. Boven, G. D. and Rovira, A. D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. Advanced in Agronomy 66: 1-102.
14. Buysens, S., Heungens, K., Joseph, P. and Hofte, M. 1996. Involvementof pyochelin and pyoverdin in suppression of pythium-induceddamping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa*7NSK2. Applied and Environmental Microbiology 62: 865–871.
15. Castric, P.A. 1977 Glycine metabolism by Pseudomonas aeruginosa: hydrogen cyanide biosynthesis. Journal of Bacteriology 130: 826- 831.
16. Chen, Y., Jurkevitch, E., Bar-Ness, E. and Hadar, Y. 1994. Stability constants of pseudobactin complexes with transition metals. Soil Science Society of America Journal 58:390-396.
17. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Science 22: 107-149.
18. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M. and Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage treeshrub legume endemic to the Canary Island. Plant Soil 266: 261-272.
19. Glick, B. R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help tofeed the world. Microbiological Research 169: 30- 39.
20. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-117.
21. Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S. and Song, H. G. 2003. Plant growth promoting in soil by some inoculated microorganism. Journal of Microbiology 271-276.
22. Kaur, G. and Reddy, M. SH. 2014. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multilocational sites. Eur. J. Soil Biol. 1-6.
23. Khakipour, N., Khavazi, K., Mojallali, H., Pazira, E. and Asadirahmani, H. 2008. Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science 4: 687-692.
24. Kloepper, J., Leong, W. J., Teintze, M. and Schroth, M. N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286: 885-886.
25. Krivtsov, V., Garside, A., Brendler, A., Liddell, K., Griffiths, B. S. and Staines, H. J. 2007. A study of population numbers and ecological interactions of soil and forest floormicrofauna. Animal Biology 57: 467-484.
26. Leoni, L., Amborsi, C., Petrucca, A. and Visca, P. 2002. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth promoting pseudomonas B10. FEMS Microbiology Letter 208: 219-225.
27. Liesack, W., Janssen, P. H., Rainey, F. A., Ward-Rainey, B. I. and Stackerbrandt, E. 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular andcultivation techniques, p. 375439. In T. J. T. Van Elsas J.D., and Wellington E.M.H (ed.), Modern Soil Microbiology. Marcel Dekber, New-York.
28. Loper, J. E. and Henkels, M. D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances level of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 65: 5357-5363.

29. Meyer, D. M. 2000. Pyoverdins: Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent *pseudomonas* species. Archives of Microbiology 174: 135-142.
30. Milagers, M. F., Machuca, A. and Napoleao, D. 1999. Detection of siderophore production from sevrel fungi and bacteria by chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of Microbiological Methods 37: 1-6.
31. Nadine, J., Coste De, V., Gadkar, J. and Filion, M. 2010. *Verticillium dahlia* alters *Pseudomonas spp*. populations and HCN gene expression in therhizosphere of strawberry. Journal of Microbiology 56: 906-915.
32. Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. and Velazhahan, R. 2004. Involvement of secondary metaboloties and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani,* the rice, sheath blight pathogen. Microbiology Research 159: 73-81.
33. Noori, M. S. Sh. and Saud, H. M. 2012. Potential Plant Growth-Promoting Activity of Pseudomonas sp Isolated from Paddy Soil in Malaysia as Biocontrol Agent. Plant Pathology and Microbiology 3:1-4.
34. Noreen, Sh., Ali, B. and Hasnain, Sh. 2012. Growth promotion of Vigna mungo (L.) by Pseudomonas spp. exhibiting auxin production and ACC-deaminase activity. Annals of Microbiology 62: 411-417.
35. O'Sullivan, D. J. and O'Gara, F. 1992. Traits of *Pseudomonas fluorescens* spp. Involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological Reviews 56: 662-676.
36. Ramesh, A., Sharma, S. K., Sharma, M. P., Yadav, N. and Joshi, O. P. 2014. Inoculation of zinc solubilizing Bacillus aryabhattai strains forimproved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybeanand wheat cultivated in Vertisols of central India. Applied Soil Ecology 73: 87- 96.
37. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. and Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro*conditions. Pakistan Journal of Biological Science 7: 187-196.
38. Saharan, B. S. and Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Science and Medicine Research 21: 1-30.
39. Sarathambalm, C., Thangaraju, M., Paulraj, C. and Gomathy, M. 2010. Assessing the Zinc solubilization ability of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in maize rhizosphere usinglabelled ^{65}Zn compounds, Indian Journal of Microbiology 50: 103-109.
40. Saravanan, V. S., Subramoniam, S. R. and Raj, S. A. 2003. Assessing in vitro solubilization potential of different zinc solubilizing bacterial (zsb) isolates. Brazilian Journal of Microbiology 34: 121-125.
41. Sarwar, M. and Kremer, R. J. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a micro plate method. Letters in Applied Microbiology 147: 282-285.
42. Schippers, B., Bakker, A.W. and Bakker, A. H. M. 1987. Intractions of deleterious and and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology 25: 339-59.
43. Shahab, S. and Ahmed, N. 2008. Effect of various parameters on the efficiency of zinc phosphate solubilization by indigenous bacterial isolates. African Journal of Biotechnology 7: 1543-1549.
44. Shaharroona, B., Arshad, M., Zahir, Z. A. and Khalid, A. 2006. Performance of *Pseudomonas spp.* Containing ACC-Deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. Soil Biology and Biochemistry 38: 2971-2975.
45. Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J. Benavente, L. M., Xie, D. Y., Dolezˇal, K., Jurgens, S. G. and Alonso, J. M. 2008. TAA1-mediated auxinbiosynthesis is essential for hormone crosstalk and plantdevelopment. Cell 133: 177-191.

46. Sundra, B., Natarajam, V. and Hari, K. 2002. Influence of phosphorus solubilizing bacteria on the changes in soil available phosphorus and sugarcane and sugar yields. Field Crops Research, 77: 43-49.
47. Van Peer, R. and Schippers, B. 1998. Plant growth responses to bacterization with selected Pseudomonas spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. Canadian Journal of Microbiology 35: 456-463.
48. Vyas, P. and Gulati, A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing *fluorescent Pseudomonas*. BMC Microbiology 22 : 9-174.