



ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی استرپتومایسس‌های خاک و کاربرد بالقوه آن‌ها در بهبود رشد اولیه ذرت و جذب فسفر

رضا قربانی نصرآبادی^۱، پروانه آغازنشستیفانی^۲ و مریم زبرجدی^{۲*}

^۱استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

^۲دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۲۸

چکیده

توانمندی اکتینومایسس‌ها در انحلال فسفات در آخر مورد توجه قرار گرفته است ولی مکانیسم و اثر ترکیبات موجود در محیط بر این فرایند مشخص نیست. در این پژوهش ۷ جدایه اکتینومایسس شناسایی و فعالیت انحلال فسفات، تجزیه فیتات، تولید سیدروفور، ایندول استیک اسید (IAA) و هیدروژن سیانید آن‌ها بررسی گردید. به‌علاوه آزمایشی گلدانی به‌منظور ارزیابی قابلیت محرک رشدی جدایه‌های نام‌برده بر گیاه ذرت نیز انجام پذیرفت. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش نشان داد که جدایه‌های منتخب فقط زمانی قادر به انحلال تری‌کلسیم فسفات بودند که محیط سنتتیک مورد استفاده (SMM جامد) شامل نترات آمونیوم بودند. همچنین فعالیت انحلال تری‌کلسیم فسفات در محیط مایع نیز از ۲۱۶-۱۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط شامل نترات آمونیوم بود و انحلال فسفات به‌شدت با کاهش pH محیط همبستگی داشت. توانمندی تجزیه فیتات (۹۵-۱/۷ درصد) و تولید ایندول استیک اسید (۲۷/۸۱-۶/۲۶ میکروگرم در میلی‌لیتر) و سیدروفور (نسبت هاله به کلونی ۲/۴۵-۱/۲۴) در همه جدایه‌ها وجود داشت اما هیچ‌یک از جدایه‌ها توان تولید هیدروژن سیانید را نداشتند. تفاوت معنی‌داری در ارتفاع اندام هوایی، وزن خشک و جذب فسفر ($P < 0.05$) در گیاهان تلقیح‌شده با جدایه‌های استرپتومایسس نسبت به گیاهان شاهد تلقیح‌نشده وجود داشت. جدایه استرپتومایسس سویه ۴۷ بیش‌ترین توان را در بهبود رشد گیاه داشت در حالی که گیاهان تلقیح‌شده با جدایه استرپتومایسس سویه ۵۰ مقدار جذب فسفر بیش‌تری را از خود نشان دادند. هر دو جدایه را می‌توان به‌عنوان مایه تلقیح‌های بالقوه برای افزایش رشد و جذب فسفر در مراحل اولیه رشد ذرت در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: اکتینومایسس، انحلال فسفات، سیدروفور، محرک رشد گیاه، ایندول استیک اسید

* مسئول مکاتبه: rgnasr@yahoo.com

مقدمه

میکروارگانسیم‌ها بخش جدایی‌ناپذیر از اکوسیستم‌ها بوده و فعالیت‌های محرک رشدی گیاه در آن‌ها به مکانیسم‌های مختلفی مانند انحلال فسفات آلی و معدنی (اولیویرا و همکاران، ۲۰۰۹؛ احمد و همکاران، ۲۰۰۸)، تثبیت نیتروژن (احمد و خان، ۲۰۱۱)، سیدروفور (خامنه و همکاران، ۲۰۰۹) و سنتز ایندول استیک اسید (صادقی و همکاران، ۲۰۱۲) نسبت داده می‌شود. بهبود قابلیت دسترسی عناصر غذایی، کیفیت و عملکرد محصول به وسیله گروه‌های مختلف میکروبی به‌طور گسترده گزارش شده است (فیگویردو و همکاران، ۲۰۰۸؛ آروجو و همکاران، ۲۰۰۸). برای حصول به کشاورزی پایدار، توجه روزافزونی به استفاده از مایه تلقیح میکروارگانسیم‌های محرک رشد گیاه برای افزایش عملکرد محصول و کاهش استفاده از آفت‌کش‌ها و کودهای شیمیایی شده است (آدسموی و کلپر، ۲۰۰۹).

رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)، میکروارگانسیم‌های مفید خاکزی هستند که می‌توانند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم منجر به بهبود رشد گیاه شوند. تحریک مستقیم رشد گیاه از طریق تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات‌های نامحلول، کسب آهن و ترشح هورمون‌های گیاهی صورت می‌پذیرد در حالی که مکانیسم‌های غیرمستقیم بهبود رشد گیاه از طریق جلوگیری از رشد پاتوژن‌های گیاهی است (احمد و همکاران، ۲۰۰۸).

جداسازی و تعیین ویژگی‌های اکتینومایست‌ها از زیستگاه‌های متنوع نه تنها به درک نقش این میکروارگانسیم‌ها در اکوسیستم‌ها کمک می‌کند بلکه برای دست یافتن به سویه‌هایی با کاربردهای صنعتی، دارویی و کشاورزی دارای اهمیت است. اکتینومایست‌ها سازگاری‌های فیزیولوژیک و مورفولوژیک پیچیده‌ای را در خاک ایجاد می‌نمایند بنابراین ممکن است نسبت به سایر گروه‌های میکروبی کم‌تر تحت تأثیر عوامل نامساعد محیطی قرار بگیرند. این گروه از میکروارگانسیم‌ها نه تنها یک گروه غالب از میکروفلور خاک را تشکیل می‌دهند، بلکه قادرند تحت شرایط تنشی اسپور تشکیل داده و زنده بمانند. از سوی دیگر آن‌ها می‌توانند به‌طور مؤثری ریشه گیاهان را اشغال نموده و منجر به بهبود رشد گیاه گردند (صادقی و همکاران، ۲۰۱۲). بر خلاف پتانسیل‌های بالقوه بسیار زیاد استرپتومایسس‌ها، پژوهش‌های بسیار کمی، در مقایسه با سایر گروه‌های میکروبی، در مورد آن‌ها در بخش کشاورزی ایران صورت گرفته است.

در بسیاری از اکوسیستم‌های خاک، فسفر بیش‌تر از مهم‌ترین عناصر غذایی برای رشد گیاه است گرچه مقادیر کافی فسفر در خاک‌ها وجود دارد تا بتواند رشد گیاه را تأمین نماید. توانمندی انحلال

فسفر به وسیله اکتینومایست‌ها در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (بارتو و همکاران، ۲۰۰۹). گرچه قابلیت آن‌ها در انحلال منابع فسفر نامحلول مورد ارزیابی قرار گرفته است (اولیویرا و همکاران، ۲۰۰۹) ولی مکانیسم و اثرات ترکیبات موجود در محیط پیرامونی اکتینومایست‌ها بر این فرایند مورد توجه چندانی قرار نگرفته است. هر چند که برخی آزمایش‌ها در مورد بهبود رشد گیاه به وسیله استرپتومایسس‌ها انجام شده (دواسکونسولوس و کاردوسو، ۲۰۰۹) ولی در هیچ‌یک از آن‌ها توانمندی تولید فیتاز در استرپتومایسس‌ها گزارش نشده است.

هدف از این پژوهش ارزیابی ویژگی‌های محرک رشد گیاه (انحلال فسفات معدنی، تجزیه فیتات، تولید ایندول استیک اسید، هیدروژن سیانید و سیدروفور) ۷ جدایه منتخب از جدایه‌های استرپتومایسس و ارزیابی پتانسیل آن‌ها در افزایش رشد اولیه ذرت و جذب فسفر آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش: در این پژوهش ویژگی‌های محرک رشدی ۷ جدایه اکتینومایست جداسازی شده از خاک‌هایی با کاربری‌های مختلف ارزیابی گردیدند. جدایه‌های ۳۹، ۵۰ و ۶۳ از خاک‌های اراضی زراعی و جدایه‌های ۴۳، ۴۵، ۴۶ و ۴۷ از خاک‌های جنگلی - استان گلستان جداسازی شده بودند.

ارزیابی نیمه کمی انحلال فسفات‌های معدنی و آلی: به منظور ارزیابی انحلال فسفات‌های نامحلول، جدایه‌ها در محیط *SMM* synthetic minimum medium (گلوکز، ۵؛ نترات سدیم یا نترات آمونیوم، ۲؛ سولفات منیزیم، ۰/۵؛ کلرید پتاسیم، ۰/۵ و سولفات آهن، ۰/۰۱ گرم در لیتر) شامل منابع فسفر نامحلول تری کلسیم فسفات (TCP)، آلومینیوم فسفات (Al-P) یا کلسیم فیتات (Ca-Phy) به میزان ۵ گرم در لیتر به عنوان تنها منبع فسفر تلقیح گردید. پس از ۵ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله به قطر هاله + کلنی اندازه‌گیری شد.

بررسی انحلال سوبستراهای معدنی فسفات‌ها در محیط مایع: برای انجام این آزمایش جدایه‌ها در ارلن‌های دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط *SMM* شامل ۱/۵ گرم تری کلسیم فسفات یا ۱ گرم در لیتر آلومینیوم فسفات، تلقیح و به مدت ۵ روز بر روی شیکر با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد همراه با یک نمونه شاهد تلقیح نشده، تکان داده شدند سپس محیط‌های کشت سانتریفیوژ

۱۰۰۰۰ rpm (به مدت ۱۰ دقیقه) شده و مقدار فسفر محلول در محلول رویی براساس روش سلسری و همکاران (۱۹۹۸) سنجش گردید.

اندازه‌گیری فعالیت فیتاز با استفاده از HPLC: به این منظور از اساس روش Association of Official Analytical Chemists 1990 Method No. 986.11 (AOAC) استفاده شد. در این پژوهش برای کمی کردن مقادیر مشتقات مختلف تجزیه اینوزیتول هگزا فسفات، کروماتوگرافی زوج یون با استفاده از Ultrasep ES 100 RP18 (۲×۲۵۰ میلی‌متر) انجام (سندبرگ و آدرین، ۱۹۸۶) و به منظور اسیدی نمودن محیط از اسید کلریدریک استفاده شد. ۲ میلی‌لیتر از محیط رقیق شده (به نسبت ۱:۲۵) به ستون (۱۵×۰/۷ سانتی‌متر) شامل رزین AG1-X8, 100-200 mesh اضافه شد. ستون با ۲۵ میلی‌لیتر آب و ۲۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲۵ میلی‌مولار شسته شد. سپس میواینوزیتول فسفات با ۲۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ مولار رقیق گردید. به منظور تغلیظ محلول به دست آمده، از تبخیرکننده خلاء برای خشک کردن آن استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر برای حل کردن بقایا، اضافه و ۲۰ میکرولیتر از نمونه حاصل با استفاده از Ultrasep ES 100 RP18 (۲×۲۵۰ میلی‌متر) کروماتوگرافی شد. ستون در دمای ۴۵ درجه سلسیوس و با استفاده از ۰/۲ میلی‌لیتر در دقیقه شوینده شامل فورمیک اسید: متانول: آب: تترابوتیل آمونیوم هیدروکسید (۵/۱:۵۶:۵۴:۵۶:۵۶) حجمی/حجمی، pH 4.25 (سندبرگ و آدرین، ۱۹۸۶) راه‌اندازی گردید. مخلوطی از استرهای میواینوزیتول هگزا، پنتا، تترا و تری فسفات (IP3-IP6) به عنوان استاندارد استفاده شد.

اثر منابع نیتروژنه بر آزادسازی فسفر و pH: نیترات سدیم موجود در محیط SMM به وسیله نیترات آمونیوم جایگزین گردید. pH محیطها قبل از اتوکلاو بر روی ۷ تنظیم و در ابتدا و انتهای آزمایش اندازه‌گیری گردیدند. هر یک از جدایه‌ها در رشد داده شده و پس از گذشت ۵ روز مقدار فسفر آزاد شده و نیز تغییر pH اندازه‌گیری شدند.

سنجش تولید ایندول استیک اسید: توانمندی بیوسنتز ایندول استیک اسید جدایه‌ها در محیط یست اکسترکت-مالت اکسترکت شامل ال-تریپتوفان (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) بررسی گردید. به این منظور محیطهای کشت تلقیح شده با جدایه‌های مورد مطالعه به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون گردید. در مرحله بعد سوسپانسیون باکتری را سانتریفیوژ (۱۰۰۰۰ rpm) به مدت ۵ دقیقه) نموده و مقدار IAA در محلول رویی به روش روبیو و همکاران (۲۰۰۰) تعیین گردید.

ارزیابی تولید سیدروفور و هیدروژن سیانید: سنجش توان تولید سیدروفور براساس روش الکساندر و زوبر (۱۹۹۱) انجام شد. پس از تهیه محیط جامد کروم آزروول اس، جدایه‌ها بر روی محیط کشت شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز انکوباسیون گردیدند. وجود هاله نارنجی در اطراف کلنی‌ها به‌عنوان شاخصی از توانمندی جدایه در جذب آهن از طریق ترشح سیدروفور در نظر گرفته شد. در پایان آزمایش، نسبت قطر هاله به قطر کلنی + قطر هاله اندازه‌گیری شد. روش رنگ‌سنجی سولفوسیانات (گاستریک، ۱۹۷۵) برای تعیین توان تولید هیدروژن سیانید مورد استفاده قرار گرفت. پس از ۴ روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، تغییر رنگ کاغذهای صافی بررسی شد.

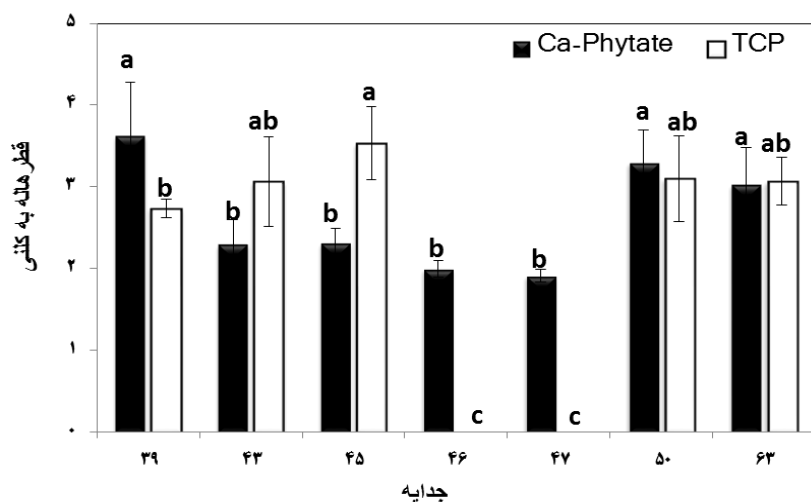
آزمایش گلدانی: به‌منظور بررسی تأثیر باکتری‌های استرپتومایسس بر رشد و نمو گیاه ذرت آزمایشی در گلدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل تلقیح ۷ جدایه استرپتومایسس و نیز یک تیمار شاهد بود. بذور ذرت رقم سینگل کراس با استفاده از اتانول ۹۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و برای حذف هیپوکلریت سدیم باقی‌مانده در سطح بذور، چندین بار شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. تعداد ۶ عدد بذر استریل سطحی شده به گلدان‌های ۱/۵ کیلوگرمی شامل خاک غربال‌شده منتقل و با ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون جدایه‌های استرپتومایسس مورد مطالعه (با جمعیت 10^6 در هر میلی‌لیتر) مایه‌زنی شد. پس از سبزشدن بذرها، تعداد آن‌ها به ۴ عدد در هر گلدان کاهش یافت. خاک مورد آزمایش دارای بافت لوم رسی شنی (شن، ۲۳ درصد، سیلت ۳۷ درصد و رس ۴۰ درصد)، pH ۷/۸؛ هدایت الکتریکی، ۱/۱ دسی‌زیمنس بر متر؛ کربن آلی، ۱/۴۸ درصد؛ پتاسیم، ۲۸۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ فسفر قابل دسترس، ۲۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم؛ فسفر کل، ۱۲۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فسفر آلی ۳۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم، نیتروژن، ۰/۱۴ درصد بود. آبیاری تیمارهای آزمایشی به‌منظور حفظ رطوبت گلدان‌ها تا ۷۰ درصد ظرفیت زراعی صورت می‌گرفت. آزمایش گلدانی نام‌برده در طی فصل زراعی ذرت و تحت شرایط نور و دمای طبیعی (بیرون از گلخانه) انجام و عملیات داشت شامل آبیاری (۷۰ درصد ظرفیت زراعی) و مبارزه با علف‌های هرز بر روی آن‌ها صورت گرفت. پس از گذشت ۳۰ روز، گیاهان برداشت و شاخص‌های رشدی گیاه شامل (وزن

اندام هوایی و ریشه، سطح برگ و ارتفاع اندام هوایی) اندازه‌گیری شدند. خشک کردن نمونه‌ها در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و تا زمان رسیدن به وزن ثابت در آون انجام شد و نمونه‌های خشک‌شده برای اندازه‌گیری فسفر پودر گردید.

تجزیه آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن ($P < 0/05$) محاسبه شد.

نتایج

انحلال فسفات در محیط جامد: ارزیابی نیمه‌کمی انحلال منابع فسفات مختلف شامل تری‌کلسیم‌فسفات، آلومینیوم‌فسفات و کلسیم‌فیتات با استفاده از جدایه‌های استرپتومایسس در محیط‌های جامد شامل دو منبع نیتروژنه مختلف (نیترات‌سدیم یا نیترات‌آمونیم) انجام شد. در محیط‌های شامل نیترات‌آمونیم، هاله شفاف در اطراف کلنی بیش‌تر جدایه‌هایی مشاهده شد که منبع فسفات آن‌ها شامل کلسیم بود (تری‌کلسیم‌فسفات و کلسیم‌فیتات) (شکل ۱). در حالی‌که در محیط‌های شامل آلومینیوم‌فسفات، هیچ‌یک از جدایه‌ها در اطراف کلنی خود هاله تولید نکردند. تفاوت قابل‌توجهی در الگوی انحلال نمک‌های کلسیم‌فسفات در جدایه‌ها وجود داشت (شکل ۱). شاخص انحلال کلسیم‌فیتات (نسبت قطر هاله به قطر هاله + کلنی) در ۳ جدایه ۳۹، ۵۰ و ۶۳ به‌طور معنی‌داری ($P < 0/001$) بیش‌تر از سایر جدایه‌ها بود. شاخص انحلال در مورد تری‌کلسیم‌فسفات روندی متفاوت با آنچه که در مورد کلسیم‌فیتات مشاهده شده بود را از خود نشان داد. انحلال نیمه‌کمی تری‌کلسیم‌فسفات (۲/۷۳-۳/۵۳) در همه جدایه‌ها، به‌جز جدایه‌های ۴۶ و ۴۷، مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار شاخص حل‌کنندگی در مورد تری‌کلسیم‌فسفات با استفاده از جدایه ۴۵ به دست آمد. در حالی‌که در محیط شامل کلسیم‌فیتات، جدایه ۳۹ بیش‌ترین میزان این شاخص را از خود نشان داد. در محیط‌های شامل نیترات‌سدیم هیچ‌یک از جدایه‌های استرپتومایسس توانمندی تولید هاله را از خود نشان ندادند، به‌جز جدایه ۴۶، که در محیط شامل فیتات کلسیم و نیترات‌سدیم در اطراف کلنی خود هاله ایجاد نمود.



شکل ۱- انحلال نیمه کمی کلسیم فیتات و تری کلسیم فسفات به وسیله جدایه‌های استرپتومایسس در محیط شامل نیترات آمونیوم پس از ۵ روز انکوباسیون.

انحلال فسفات در محیط مایع: برای اثبات نتایج به دست آمده از آزمایش نیمه کمی فسفات، آزادسازی فسفر در محیط مایع نیز اندازه‌گیری شد. اثر منابع مختلف فسفر (آلومینیوم فسفات و تری کلسیم فسفات) و نیتروژن (نیترات سدیم و نیترات آمونیوم) بر قابلیت انحلال فسفات در محیط SMM مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بر خلاف ایجاد نکردن هاله در اطراف کلنی جدایه‌های ۴۶ و ۴۷ در محیط جامد، تمامی جدایه‌ها توانمندی انحلال تری کلسیم فسفات در محیط مایع را دارا بوده و تفاوت معنی داری ($P < 0.001$) در بین آن‌ها وجود داشت (جدول ۱). فعالیت انحلال فسفر جدایه‌ها در محیط مایع از ۲۱۶-۱۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در محیط شامل تری کلسیم فسفات و نیترات آمونیوم متفاوت بود. در حالی که انحلال بسیار کم تری (۱۳/۹۲-۲/۹۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در محیط شامل نیترات سدیم رخ داد (جدول ۱). هر چند که همبستگی بالایی ($r = 0.814$, $P < 0.001$) بین انحلال تری کلسیم فسفات و دو منبع نیتروژن وجود داشت. همانند آنچه در محیط جامد مشاهده گردید، جدایه‌های ۴۶ و ۴۷ حداقل انحلال فسفر را با هر دو منبع نیتروژن نشان دادند. همبستگی بالایی بین انحلال تری کلسیم فسفات در محیط جامد و مایع به خصوص در محیط‌های شامل نیترات آمونیوم مشاهده شد ($r = 0.822$, $P < 0.001$). گرچه الگوی کلی انحلال فسفات در بین جدایه‌ها مشابهت داشت ولی بهترین کارایی

انحلال در محیط‌های جامد و مایع در جدایه‌های متفاوتی مشاهده شد. جدایه ۳۹ بیش‌ترین آزادسازی فسفر را در محیط‌های جامد شامل $TCP + NH_4NO_3$ و $AlPO_4 + NaNO_3$ از خود نشان داد. در حالی‌که در محیط مایع، جدایه ۵۰ در محیط شامل TCP و نیترات‌سدیم بیش‌ترین میزان آزادسازی فسفر را داشت (جدول ۱). وقتی که از نیترات‌سدیم به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده شد، تفاوت چندانی بین میزان آزادسازی فسفر از منابع تری‌کلسیم‌فسفات و آلومینیوم‌فسفات وجود نداشت. همچنین در محیط شامل آلومینیوم‌فسفات و نیترات‌آمونیم، آزادسازی فسفر در محلول رویی مشاهده نشد.

در همه محیط‌ها تغییرات pH مشاهده شد که می‌تواند تا اندازه‌ای مسئول الگوی انحلال فسفات باشد. در محیط‌های شامل نیترات‌آمونیم تمامی جدایه‌ها به‌طور معنی‌داری ($P < 0/001$) مقدار pH را در سطح‌های مختلفی کاهش دادند. تلقیح جدایه‌های مختلف منجر به کاهش ۱/۶۵-۲/۲ واحدی pH در محیط شامل آلومینیوم‌فسفات گردید. این امر مانع انحلال آن شده و آزادسازی فسفر مشاهده نشد. در محیط‌های شامل نیترات‌سدیم، تلقیح منجر به افزایش معنی‌دار pH شد. به‌طورکلی، افزایش pH در محیط‌های شامل $TCP + NaNO_3$ بیش‌تر از $AlPO_4 + NaNO_3$ بود.

در جدایه‌های مختلف، همبستگی منفی معنی‌داری ($r = -0/816$ ، $P < 0/001$) بین مقدار فسفر آزاد شده از تری‌کلسیم‌فسفات، در حضور نیترات‌آمونیم و pH وجود داشت، در حالی‌که انحلال فسفات در محیط‌های شامل نیترات‌سدیم را نمی‌توان با تغییر pH توجیه نمود.

در مورد جدایه‌های ۴۶ و ۴۷ تفاوت قابل‌توجهی در آزادسازی فسفر از تری‌کلسیم‌فسفات وجود نداشت. هر دو جدایه توانمندی کمی در تغییر pH محیط در پاسخ به منبع نیتروژن مورد استفاده داشتند. **فعالیت فیتاز و تجزیه فیتات:** الگوی تجزیه میواینوزیتول هگزاکیس فسفات (IP_6) در بین جدایه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری ($P < 0/01$) داشت (جدول ۲). ۴ جدایه ۳۹، ۴۳، ۴۵ و ۶۳ بیش از ۵۰ درصد از مقدار اولیه میواینوزیتول هگزاکیس فسفات را تجزیه نمودند در حالی‌که ۳ جدایه دیگر (۴۶، ۴۷ و ۵۰) پس از ۱۰ روز تخمیر تنها توان تجزیه ۱/۷-۴۷/۵ درصد IP_6 اولیه را داشتند. همه جدایه‌ها به‌جز جدایه ۵۰ و ۴۶ الگوی مشابهی را در تجزیه از خود نشان دادند و اینوزیتول پنتا فسفات (IP_5) محصول اصلی فرآیند تجزیه بود (جدول ۲). در حالی‌که در جدایه‌های ۴۶ و ۵۰ مقدار تولید میواینوزیتول‌های به‌دست آمده از تجزیه به‌ترتیب $IP_6 > IP_5 > IP_4$ و $IP_5 > IP_4 > IP_3$ بود. مقدار نسبی مشتقات اینوزیتول فسفات‌های تولید شده به‌وسیله جدایه‌های مورد بررسی نیز تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲).

جدول ۱- انحلال فسفات‌های نامحلول و تغییرات pH در محیط مایع به‌وسیله جدایه‌های استرپتومایسس در حضور دو منبع نیتروژن.

AlPO ₄ (NaNO ₃)		TCP (NaNO ₃)		TCP (NH ₄ NO ₃)		جدایه‌ها
pH	P (میلی‌گرم بر لیتر)	pH	P (میلی‌گرم بر لیتر)	pH	P (میلی‌گرم بر لیتر)	
۷/۳۱ ^b	۸/۹۱ ^a	۷/۶۹ ^c	۷/۶۵ ^c	۳/۵۱ ^b	۲۱۶/۶۷ ^a	۳۹
۷/۰۳ ^d	۰/۵۵ ^{cd}	۷/۶۵ ^c	۵/۷۳ ^d	۳۳/۳ ^b	۱۴۶/۶۷ ^d	۴۳
۶/۹۹ ^d	۰/۴۸ ^{cd}	۷/۵۵ ^{cd}	۳/۹۹ ^e	۴/۵۸ ^a	۱۰۹/۳۳ ^e	۴۵
۷/۳۳ ^b	۰/۸۴ ^{cd}	۷/۳۶ ^e	۳/۲۷ ^e	۴/۹۶ ^a	۱۱/۳۳ ^f	۴۶
۷/۲۴ ^{bc}	۰/۱۵ ^d	۷/۴۱ ^{de}	۲/۹۰ ^e	۴/۹۴ ^a	۱۳/۳۳ ^f	۴۷
۷/۵۸ ^a	۳/۲۳ ^b	۸/۳۵ ^b	۱۳/۹۲ ^a	۳/۶۲ ^b	۲۱۲/۶۷ ^b	۵۰
۷/۴۶ ^{ab}	۱/۵۳ ^c	۸/۷۸ ^a	۱۱/۸۳ ^b	۳/۵۴ ^b	۱۹۷/۳۳ ^c	۶۳

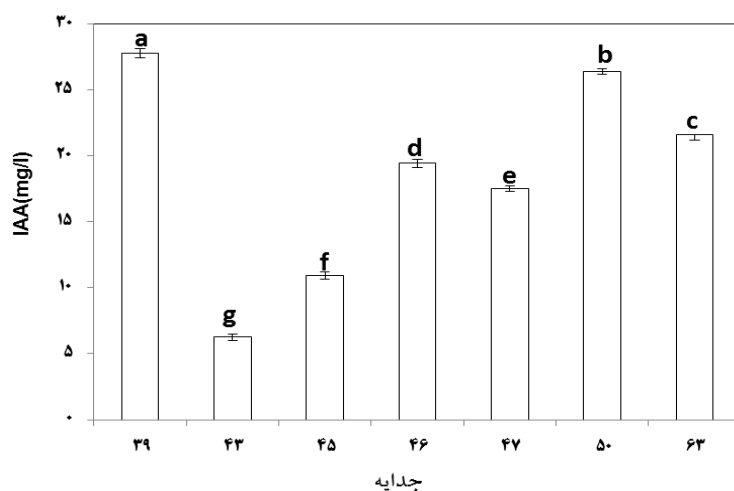
جدول ۲- تجزیه IP6 و تولید مشتقات اینوزیتول فسفات به‌دست آمده از آن به‌وسیله جدایه‌های مختلف استرپتومایسس.

InsP ₇	InsP ₆	InsP ₅	InsP ₄	جدایه‌ها
(% of initial total IP ₆)				
۲/۹ ^b	۳/۹ ^d	۶۷/۲ ^a	۲۴/۹ ^d	۳۹
۴/۱ ^b	۲۱/۲ ^b	۴۰/۸ ^c	۳۴/۴ ^c	۴۳
۴/۰ ^b	۱۸/۸ ^{bc}	۴۱/۹ ^c	۳۵/۲ ^c	۴۵
۰/۸ ^c	۰/۲ ^e	۰/۶ ^f	۹۸/۳ ^a	۴۶
۱/۵ ^c	۱۵/۸ ^c	۲۹/۷ ^d	۵۲/۵ ^b	۴۷
۱۵/۵ ^a	۱۹/۸ ^b	۱۱/۳ ^e	۵۳/۳ ^b	۵۰
۱۶/۵ ^a	۳۰ ^a	۴۸/۵ ^b	۵ ^e	۶۳

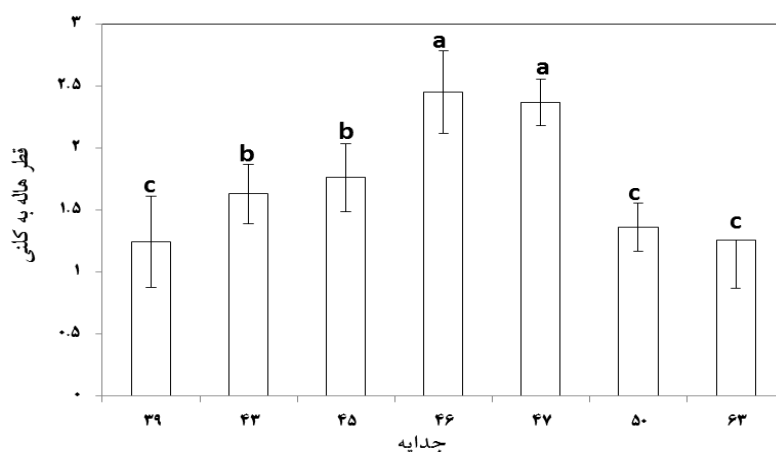
حروف مشابه نشان‌دهنده نبود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشد.

بیوسنتز IAA، سیدروفور و سیانید هیدروژن: توانمندی تولید IAA در همه جدایه‌های استرپتومایسس وجود داشت و تفاوت معنی‌داری ($P < 0.01$) در میزان ترشح این متابولیت به‌وسیله جدایه‌های مختلف وجود داشت (شکل ۲). جدایه ۳۹ بیش‌ترین مقدار (۲۷/۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) ایندول استیک اسید را در محیط مایع تولید نمود که بیش از ۴ برابر میزان تولید آن در جدایه ۴۳ بود. ترشح سیدروفور در همه جدایه‌ها مثبت بود و از طریق ایجاد هاله نارنجی در اطراف کلنی‌های آن‌ها

در محیط CAS آگار اثبات گردید. تفاوت معنی داری ($P < 0/01$) در قابلیت رشد جدایه‌ها در محیط CAS آگار و نسبت قطر هاله به کلنی آن‌ها وجود داشت. بیش‌ترین مقدار سیدروفور به‌وسیله جدایه ۴۶ تولید شد که قطر هاله به کلنی آن ۲/۴۵ بود (شکل ۳). همچنین هیچ‌یک از جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند.



شکل ۲- تولید IAA به‌وسیله جدایه‌های مختلف استریتومایسس در محیط یست اکسترکت - مالت اکسترکت.



شکل ۳- تولید سیدروفور به‌وسیله جدایه‌های مختلف استریتومایسس در محیط CAS آگار.

آزمایش گلدانی: تمامی جدایه‌ها از نظر توانمندی تحریک رشد ذرت در آزمایشی گلدانی مورد ارزیابی قرار گرفتند. گلدان‌های تیمار شده با استرپتومایسس‌ها ارتفاع گیاه افزایش یافت به طوری که حداقل مقدار آن در تیمار شاهد (۳۱/۷ سانتی‌متر) و حداکثر آن به ۴۰/۳ سانتی‌متر در گیاهان تلقیح شده با جدایه ۴۷ رسید. در بین جدایه‌های مختلف تفاوت معنی‌داری ($P < 0/05$) از نظر افزایش ارتفاع اندام هوایی وجود داشت. جدایه‌های ۳۹، ۴۳ و ۴۷ به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) موجب بهبود ارتفاع گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد شدند (جدول ۳). زیست‌توده خشک ریشه گیاهان ذرت از حداقل ۴۲۳/۳ میلی‌گرم در گیاهان شاهد تا حداکثر ۸۲۳/۳ میلی‌گرم در گیاهان تیمار شده با جدایه ۴۶ تفاوت داشت. تمامی جدایه‌های مورد بررسی، به جز جدایه ۵۰، وزن خشک ریشه را در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش دادند. مقدار وزن خشک اندام هوایی از ۷۲۰ میلی‌گرم در گیاهان شاهد تا ۱۰۱۰ میلی‌گرم در گیاهان ذرت تلقیح شده با جدایه ۴۷ متفاوت بود. گرچه تمامی جدایه‌ها وزن خشک اندام هوایی را افزایش دادند (۴۰/۳-۲/۸ درصد) ولی تنها جدایه ۴۷ به طور معنی‌داری این پارامتر را افزایش داد. تمامی جدایه‌های مورد بررسی منجر به افزایش سطح برگ شدند و مقدار این شاخص از حداقل ۲۳۰ (تیمار شاهد) به ۲۷۵ سانتی‌مترمربع در گیاهان تیمار شده با جدایه ۴۷ رسید. با وجود افزایش ۱۹/۷ درصدی سطح برگ در اثر تلقیح با جدایه‌های استرپتومایسس، تفاوت معنی‌داری در این افزایش مشاهده نشد ($P < 0/05$). بیش‌ترین میزان جذب فسفر (۷/۱۸ میلی‌گرم در گیاه) با استفاده از جدایه ۵۰ به دست آمد، در حالی که مقدار فسفر جذب شده در گیاهان تلقیح نشده حداقل (۴/۱۶ میلی‌گرم در گیاه) بود. تمامی جدایه‌های مورد بررسی، به جز جدایه ۴۶، منجر به بهبود معنی‌دار ($P < 0/05$) جذب فسفر گیاه شدند (جدول ۳) که این امر بیانگر آن است که استرپتومایسس‌ها، فسفو باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشند.

نتایج نشان داد که گیاهان ذرت تلقیح نشده، توانمندی ضعیفی در استفاده از منابع فسفر طبیعی موجود در خاک مورد بررسی داشتند. مقدار فسفر جذب شده در حضور جدایه‌های استرپتومایسس بیش‌تر از گیاهان تیمار نشده بود که این امر بیانگر فعالیت محرک رشدی بیش‌تر جدایه‌های تلقیح شده در مقایسه با جمعیت‌های بومی میکروبی موجود در ریزوسفر است. بیش‌ترین میزان جذب فسفر با استفاده از جدایه ۵۰ به دست آمد، که این جدایه مؤثرترین جدایه در تولید فسفاتاز قلیایی (داده‌ها نشان داده نشده است) و آزادسازی فسفر در محیط SMM شامل نیترات سدیم به عنوان منبع نیتروژن بود.

جدول ۳- اثر تلقیح جدایه‌های استریتومایسس بر پارامترهای رشد گیاه ذرت.

پارامترها	عدم تلقیح شده							
	۶۳	۵۰	۴۷	۴۶	۴۵	۴۳	۳۹	
وزن خشک ریشه (میلی‌گرم)	۶۸۶/۷ ^{bc}	۴۲۳/۳ ^d	۶۱۶/۷ ^{bc}	۸۲۳/۳ ^a	۶۰۳ ^c	۷۰۴ ^{ab}	۶۱۳/۳ ^{bc}	۴۲۳/۳ ^d
وزن خشک اندام هوایی (میلی‌گرم)	۹۸۰ ^{ab}	۹۶۰ ^{ab}	۱۰۱۰ ^a	۷۴۰ ^b	۸۸۰ ^{ab}	۹۵۰ ^{ab}	۹۲۰ ^{ab}	۷۲۰ ^b
ارتفاع اندام هوایی (سانتی‌متر)	۳۶/۱۳ ^{abc}	۳۵/۵۳ ^{abc}	۴۰/۳۳ ^a	۳۴/۴۳ ^{bc}	۳۷/۰۳ ^{abc}	۳۸/۰۳ ^{ab}	۳۹ ^{ab}	۳۱/۷۳ ^c
سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	۲۴۵/۱ ^a	۲۵۷/۴ ^a	۲۷۵/۳ ^a	۲۳۹/۹ ^a	۲۵۵/۸ ^a	۲۳۵/۳ ^a	۲۶۰/۱ ^a	۲۳۰ ^a
فسفر جذب شده (میلی‌گرم بر گیاه)	۴/۸۸ ^c	۷/۴۸ ^a	۵/۹ ^b	۴/۵۸ ^{cd}	۴/۸ ^c	۵/۶۱ ^b	۵/۴۸ ^b	۴/۱۶ ^d

بحث

انحلال میکروبی شکل‌های مختلف فسفر معدنی در پژوهش‌های قبلی به اثبات رسیده است (ریچاردسون و همکاران، ۲۰۰۹؛ وایتلو و همکاران، ۱۹۹۹). از سوی دیگر نقش منبع نیتروژن در انحلال فسفات نیز مورد بررسی قرار گرفته و تأیید شده است (رلوانی و همکاران، ۲۰۰۸). همدالی و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که ۲۰ درصد از جمعیت اکتینومایست‌های قابل کشت خاکری قادر به انحلال فسفات معدنی نامحلول بوده و جدایه‌های نام‌برده متعلق به جنس‌های استریتومایسس و میکرومونوسپورا بودند. باید به این نکته توجه نمود که انتظار می‌رود تفاوت بسیار زیادی در میزان مکانیسم آزادسازی فسفر در این گروه از میکروارگانیسم‌ها وجود داشته باشد. میکروارگانیسم‌های خاک استراتژی‌های مختلفی را در آزادسازی منابع فسفر به کار می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به آزادسازی آنیون‌های آلی، سیدروفورها، پروتون‌ها، دی‌اکسیدکربن و آنزیم‌های برون‌سلولی اشاره نمود (مک‌گیل و کول، ۱۹۸۱).

انحلال آلومینیوم فسفات وابسته به کاهش pH محیط نیست (مرباخ و همکاران، ۲۰۱۰). به نظر می‌رسد که لیت شدن مکانیسم اصلی در انحلال این گروه از ترکیبات فسفات‌ها باشد (پوئته و همکاران، ۲۰۰۹). همدالی و همکاران (۲۰۰۸) بیان داشتند که توانمندی بیش‌تر اکتینومایست‌ها در انحلال فسفر به کاهش pH محیط بیرونی مرتبط نیست. هر چند که نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که قلیایی شدن و اسیدی شدن شدید محیط به منبع نیتروژن محیط بستگی داشته و اسیدی شدن محیط ناشی از منبع نیترات آمونیوم تا اندازه‌ای انحلال تری‌کلسیم فسفات را توجیه می‌نماید. بیش‌تر جدایه‌های

مورد استفاده در این پژوهش، بر خلاف آنچه که توسط همدالی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده، هاله شفاف در محیط‌های جامدی که شامل تری‌کلسیم فسفات و فیتات کلسیم به‌عنوان منبع فسفر و نیترات آمونیوم به‌عنوان منبع نیتروژن بودند، تولید نمودند.

باید توجه داشت که واکنش آنزیمی تنها مکانیسم برای معدنی شدن فیتات است و فیتاز آزادسازی یک یا چند گروه فسفات از میواینوزیتول هگزاکیس فسفات را آغاز می‌نماید (شیرر و ترنر، ۲۰۰۷). بنابراین آزادسازی فسفر از کلسیم فیتات به‌طور جداگانه با استفاده از HPLC اندازه‌گیری و سپس محصولات به‌دست آمده از تجزیه به‌صورت کمی محاسبه گردید.

فسفر آلی معمولاً ۶۵-۲۹ درصد از فسفر کل خاک را تشکیل می‌دهد اما در برخی خاک‌ها فسفر آلی می‌تواند تا ۹۰ درصد از فسفر کل را شامل گردد (هریسون، ۱۹۸۷). توانمندی بالقوه میکروارگانسیم‌های خاک در انحلال منابع فسفر نامحلول معدنی بیش‌تر از قابلیت آن‌ها در تجزیه فیتات است. همبستگی معنی‌داری بین انحلال فیتات کلسیم در محیط جامد و تجزیه فیتات در محیط مایع شامل اینوزیتول هگزا فسفات وجود نداشت. تولید هاله در اطراف کلنی‌ها بر روی محیط جامد شامل کلسیم فیتات نشان‌دهنده ظرفیت انحلال فیتات کلسیم از طریق ترشح آنیون‌های آلی یا تولید منابع کی‌لیت‌کننده است (موکش و همکاران، ۲۰۰۴). ترشح آنزیم برون‌سلولی فیتاز به‌وسیله جدایه‌های مورد بررسی گزارش شده است (قربانی نصرآبادی و همکاران، ۲۰۱۲). گرچه این جدایه‌ها توانمندی تجزیه فیتات را از خود نشان دادند ولی تحت شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با سایر میکروارگانسیم‌ها مانند آسپرژیلوس نایجر و ای. کلای، تولیدکنندگان فیتاز ضعیف‌تری محسوب می‌گردند. البته باید توجه داشت که انحلال فیتات کلسیم، مقدار و ماهیت بیوشیمیایی فیتازهای مترشحه، تغییرات pH محیط و وجود بازدارنده‌های فیتاز را می‌توان به‌عنوان عواملی در نظر گرفت که در الگوی تجزیه فیتات توسط باکتری‌های نام‌برده نقش دارند.

کومار و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که فعالیت فیتاز با مقدار فسفر موجود در خاک مرتبط می‌باشد و فیتاز باکتریایی مورد استفاده در پژوهش آن‌ها، کارایی خوبی در شرایط pH خنثی تا قلیایی از خود نشان داد. تجزیه میواینوزیتول هگزا فسفات در شرایط آزمایشگاهی با جذب فسفر به‌وسیله گیاهان ذرت همبستگی نداشت. نبود همبستگی بین فعالیت فیتاز در شرایط آزمایشگاهی و جذب فسفر در این پژوهش ممکن است به دلایل ذیل باشد:

۱- ناپایداری آنزیم در شرایط خاک، ۲- جذب سطحی آنزیم مترشحه از جدایه‌های مختلف به سطح ذرات خاک، ۳- توانمندی کم آنزیم‌های تولیدی در هیدرولیز شکل‌های فسفر آلی بومی خاک و ۴- قابلیت دسترسی کم به شکل‌های فسفر آلی که به‌وسیله فیتاز قابل تجزیه هستند.

اولیویرا و همکاران (۲۰۰۹) قارچ‌ها و باکتری‌های مختلف از جمله اکتینومایست‌هایی را جداسازی نمودند که توانمندی انحلال تری‌کلسیم‌فسفات و آلومینیوم‌فسفات را در محیط جامد دارا بودند اما هیچ‌یک از جدایه‌های اکتینومایست مورد بررسی آن‌ها فعالیت تجزیه فیتات در محیط مایع را از خود نشان نداد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش به خوبی نشان داد که استرپتومایسس‌ها توانمندی تولید آنزیم فیتاز برون‌سلولی را دارا می‌باشند.

سیدروفورها از منابع کی‌لیت‌کننده آهن هستند که به‌وسیله میکروارگانیسیم‌های مختلفی در پاسخ به کمبود آهن ترشح می‌شوند (شارما و یوری، ۲۰۰۳). گرچه ترشح سیدروفور یکی از مکانیسم‌های انحلال فسفات در نظر گرفته می‌شود (مک‌گیل و کول، ۱۹۸۱) اما در این پژوهش ترشح سیدروفور با انحلال فسفات در شرایط آزمایشگاهی و با جذب فسفر گیاه در آزمایش گلدانی همبستگی نداشت.

بهبود رشد گیاه و جذب فسفر از مهم‌ترین اولویت‌های پژوهش در زمینه میکروارگانیسیم‌های محرک رشد گیاه و به‌خصوص حل‌کننده‌های فسفات می‌باشد. با این وجود، مکانیسم اصلی در بهبود رشد گیاه در صورت لزوم توانمندی انحلال فسفات آن‌ها نیست (بارت و همکاران، ۲۰۱۱). تمامی جدایه‌های استرپتومایسس جذب فسفر ذرت را افزایش دادند. گرچه پایداری مایه تلقیح در این پژوهش مورد ارزیابی قرار نگرفت اما اثر معنی‌دار تلقیح استرپتومایسس‌ها نشان می‌دهد که این جدایه‌ها قادر به رقابت با جوامع میکروبی بومی خاک بوده و توانمندی اشغال ریشه‌های ذرت را دارا بوده است.

همبستگی مستقیمی بین انحلال فسفات در شرایط آزمایشگاهی و جذب فسفر گیاه وجود نداشت. رتبه‌بندی باکتری‌های حل‌کننده فسفات براساس پتانسیل انحلال فسفات در شرایط آزمایشگاهی ممکن است نشان‌دهنده کارایی جدایه‌ها در بهبود جذب فسفر در شرایط مزرعه‌ای نباشد (رنگل، ۲۰۰۸). میزان بیان و اهمیت نسبی ویژگی‌های محرک رشدی اندازه‌گیری شده ممکن است تفاوت چشم‌گیری در شرایط آزمایشگاهی و ریزوسفر داشته باشد که می‌تواند همبستگی ضعیف بین آن‌ها را توجیه نماید. اکسین‌ها یکی از فیتوهورمون‌هایی هستند که به‌وسیله بسیاری از گروه‌های میکروبی محرک رشد گیاه ترشح می‌شوند و ایندول استیک اسید (IAA) یکی از متداول‌ترین انواع آن‌ها می‌باشد (تساوکلووا

و همکاران، ۲۰۰۶). مقدار IAA تولیدی در جدایه‌های مورد بررسی مشابه با مقادیری بود که در پژوهش‌های قبلی گزارش شده بود (خامنه و همکاران، ۲۰۰۹).

باکتری‌های محرک رشد گیاه توانمند در تولید IAA می‌توانند رشد ریشه را تحریک نموده، زیست‌توده آن را افزایش داده و شکل سیستم ریشه‌ای را تغییر دهند (مارتینز و همکاران، ۲۰۱۰).

پژوهشگران متعددی گزارش نمودند که استرپتومایسس‌ها توانمندی تولید IAA را دارا می‌باشند (صادقی و همکاران، ۲۰۱۲؛ گوپالکریشنن و همکاران، ۲۰۱۱). تفاوت معنی‌داری بین توانمندی جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش از نظر افزایش زیست‌توده ریشه وجود داشت. بر خلاف بیش‌تر جدایه‌ها، تلقیح سویه ۵۰ موجب ایجاد ریشه‌های موئین‌تری در مقایسه با شاهد گردید بدون آن‌که افزایشی در وزن خشک ریشه مشاهده شود. به دلیل وجود ویژگی‌های محرک رشد چندگانه، تعیین مکانیسم(های) دقیق و اهمیت نسبی آن‌ها در بهبود جذب فسفر کاملاً مشخص نیست. طیف گسترده فعالیت محرک رشدی استرپتومایسس‌ها نشان می‌دهد که این جدایه‌ها را می‌توان به‌عنوان جدایه‌های بالقوه در کودهای زیستی مدنظر قرار داد.

نتیجه‌گیری

تمامی جدایه‌های مورد بررسی بیش از یک مکانیسم را برای استفاده از منابع فسفره موجود در خاک از خود نشان دادند. تلقیح با این محرک‌های رشد گیاه، منجر به بهبود شاخص‌های رشد مثل ارتفاع اندام هوایی، وزن خشک ریشه و اندام هوایی و جذب فسفر گردید. جدایه ۴۷ بهترین عملکرد را از نظر بهبود شاخص‌های رشدی گیاه مثل ارتفاع اندام هوایی، وزن خشک ریشه و سطح برگ داشت در حالی که گیاهان تلقیح شده با جدایه ۵۰ جذب فسفر بالاتری را نشان دادند. بنابراین هر دو جدایه را می‌توان به‌عنوان جدایه‌های بالقوه برای بررسی بیش‌تر برای استفاده در شرایط مزرعه‌ای و در صورت رضایت‌بخش بودن نتایج کاربرد آن‌ها، در تولید کودهای زیستی مدنظر قرار داد. در این پژوهش ارزیابی توانمندی جدایه‌های منتخب استرپتومایسس برای بهبود رشد گیاه در حضور منابع فسفره بومی خاک صورت گرفت. آزمایش‌های بیش‌تری با استفاده از کاربرد هم‌زمان منابع فسفره معدنی نامحلول و تلقیح جدایه‌های برتر در این پژوهش، باید صورت پذیرد.

منابع

1. Adesemoye, A.O., and Kloepper, J.W. 2009. Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85: 1-12.
2. Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M.S. 2005. Indole acetic acid production by the indigenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas* fluorescent in the presence and absence of tryptophan. *Turk J. Biol.* 29: 29-34.
3. Ahmad, F., Ahmad, I., and Khan, M.S. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol Res.* 163: 173-181.
4. Ahmad, M., and Khan, M.S. 2011. Toxicological effects of selective herbicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Klebsiella* sp. strain PS19. *Curr. Microbiol.* 62: 532-538.
5. Alexander, D.B., and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils.* 12: 39-45.
6. Araújo, A.P., Plassard, C., and Drevon, J.J. 2008. Phosphatase and phytase activities in nodules of common bean genotypes at different levels of phosphorus supply. *Plant Soil.* 312: 129-138.
7. Association of Official Analytical Chemists. 1990. Phytate in foods, anion-exchange method, No. 986.11. In *Official Methods of Analysis*, 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Pp: 800-801.
8. Barret, M., Morrissey, J.P., and Gara, F.O. 2011. Functional genomics analysis of plant growth-promoting rhizobacterial traits involved in rhizosphere competence. *Biol. Fertil. Soils.* 47: 729-743.
9. Barreto, T.R., Silva, A.C.M., Soares, A.C.F., and De Souza, J.T. 2008. Population densities and genetic diversity of actinomycetee associated to the rhizosphere of *Theobroma cacao*. *Braz. J. Microbiol.* 39: 464-470.
10. Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., and Eaton, A.D. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed., Washington, DC.
11. De Vasconcellos, R.L.F., and Cardoso, E.J.B.N. 2009. Rhizospheric Streptomycetes as potential biocontrol agents of *Fusarium* and *Armillaria* pine rot and as PGPR for *Pinus taeda*. *Biocontrol.* 54: 807-816.
13. Figueiredo, M.V.B., Burity, H.A., Martínez, C.R., and Chanway, C.P. 2008. Alleviation of drought stress in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by co-inoculation with *Paenibacillus polymyxa* and *Rhizobium tropici*. *Appl. Soil Ecol.* 40: 182-188.
14. Gastric, P.A. 1975. Hydrogen cyanide. a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 21: 613-618.
15. Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H.A., Hamedi, J., and Yakhchali, B. 2013. Distribution of actinomycetes in different soil ecosystems and effect of media composition on extracellular phosphatase activity. *Soil Sci. Plant Nutr.* 13: 1. 223-236.

16. Ghorbani-Nasrabadi, R., Greiner, R., Alikhani, H.A., and Hamedi, J. 2012. Identification and determination of extracellular phytate-degrading activity in actinomycetes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 2601-2608.
17. Gopalakrishnan, S., and Humayun, P. 2012. Biocontrol Science and Technology Plant growth-promoting traits of *Streptomyces* with biocontrol potential isolated from herbal vermicompost. *Biocontrol. Sci. Tech.* 22: 1199-1210.
18. Gopalakrishnan, S., Pande, S., Sharma, M., Humayun, P., Kiran, B.K., Sandeep, D., Sree Vidya, M., Deepthi, K., and Rupelaet, O. 2011. Evaluation of actinomycete isolates obtained from herbal vermicompost for the biological control of *Fusarium* wilt of chickpea. *Crop Prot.* 30: 1070-1078.
19. Hamdali, H., Bouizgarne, B., Hafidi, M., Lebrihi, A., Virolle, M.J., and Ouhdouch, Y. 2008. Screening for rock phosphate solubilizing Actinomycetes from Moroccan phosphate mines. *Appl. Soil Ecol.* 38: 12-19.
20. Harrison, A.F. 1987. Soil organic phosphorus. A review of world literature. Oxford CAB international.
21. Khamna, S., Yokota, A., and Lumyong, S. 2009. Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soil: diversity and screening of antifungal compound, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotech.* 25: 649-655.
22. Kim, B., Zucchi, T.D., Fiedler, H., and Goodfellow, M. 2012. *Streptomyces cocklensis* sp. nov., a dioxamycin-producing actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 279-283.
23. Kumar, V., Singh, P., Jorquera, M.A., Punesh Sangwan, P., Piyush Kumar, P., Verma, A.K., and Agrawal, S. 2013. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard (*Brassica juncea*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29: 1361-1369.
24. Martínez-Viveros, O., Jorquera, M., Crowley, D., Gajardo, G., and Mora, M. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10: 293-319.
25. McGill, W.B., and Cole, C.V. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. *Geoderma.* 26: 267-268.
26. Merbach, W., Deubel, A., Gransee, A., and Klamroth, A. 2010. Phosphorus solubilization in the rhizosphere and its possible importance to determine phosphate plant availability in soil. A review with main emphasis on German results. *Arch. Agron. Soil Sci.* 56: 118-138.
27. Mukesh, P., Suma, S., Singaracharya, M.A., and Lakshmipathi, V. 2004. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 531-534.

28. Oliveira, C.A., Alves, V.M.C., Marriel, I.E., Gomes, E.A., Scotti, M.R., Carneiro, N.P., Guimaraes, C.T., Schaffert, R.E., and Sa, N.M.H. 2009. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biol. Biochem.* 41: 1782-1787.
29. Puente, M.E., Li, C.Y., and Bashan, Y. 2009. Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. *Environ. Exp. Bot.* 66: 389-401.
30. Relwani, L., Krishna, P., and Sudhakara, R.M. 2008. Effect of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by a wild-type strain and UV-induced mutants of *Aspergillus tubingensis*. *Curr. Microbiol.* 57: 401-406.
31. Rengel, Z. 2008. Bioavailability of Phosphorus and Micronutrients in the Soil-Plant-Microbe Continuum. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 8: 84-91.
32. Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeill, A.M., and Prigent-Combaret, C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil.* 321: 305-339.
33. Rubio, B., Nombela, M.A., and Vilas, F. 2000. Geochemistry of major and trace elements in sediments of the Ria de Vigo (NW Spain): An assesment of metal pollution. *Mar. Pollut. Bull.* 40: 968-980
34. Sadeghi, A., Karimi, E., Dahaji, P.A., Ghorbani Javid, M., Dalvand, Y., and Askari, H. 2012. Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1503-1509.
35. Sandberg, A. 1986. HPLC Method for Determination of Inositol Tri-, Tetra-, Penta-, and Hexaphosphates in Foods and Intestinal Contents. *J. Food Sci.* 57: 547-550.
36. Sharma, A., and Johri, B.N. 2003. Combat of iron-deprivation through a plant growth promoting fluorescent *Pseudomonas* starin GRP3A in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Microbiol Res.* 158: 77-81.
37. Shears, S.B., and Turner, B.L. 2007. Nomenclature and terminology of inositol phosphates: clarification and a glossary of terms, P1-6. In: Turner, B.L., A.L., Richardson, E.J. Mullaney (Eds.), *Inositol phosphates linking agriculture and the environment*. CAB International.
38. Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Klimova, S.Y., Shestakov, A.I., Botina, S.G., and Netrusov, A.I. 2006. Microbial producers of plant growth stimulators and their practical use: A review. *Appl. Biochem. Micro.* 42: 117-126.
39. Whitelaw, M.A., Harden, T.J., and Helyar, K.R. 1999. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31: 655-665.



Evaluation of soil *Streptomyces* sp. plant growth promotion traits and potential application in enhancing early maize growth and P uptake

***R. Ghorbani-Nasrabadi¹, P. Aghaz Nashtifani² and M. Zebarjadi²**

¹Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 09/01/2014; Accepted: 11/19/2014

Abstract

The phosphate solubilization capability of actinomycetes has recently attracted interest but the mechanism and medium composition effect involved in this process was not clarified. Seven actinomycete isolates were characterized and their phosphate solubilizing activity, phytate degradation, siderophores, indole acetic acid (IAA) and hydrogen cyanide (HCN) production were investigated. Additionally, all isolates were evaluated as plant growth promoters to maize in pot experiment. Our results showed that the selected isolates were able to solubilize tri-calcium phosphate (TCP) only when synthetic minimum medium (SMM-agar) was supplemented with ammonium nitrate. Similarly, TCP solubilizing activity in liquid cultures was also observed (from 11 to 216 μgml^{-1}) when medium was supplemented with ammonium nitrate and this behavior was strongly associated with a pH reduction. Phytate degradation (1.7-95%), indole acetic acid production (6.26 to 27.81 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and siderophore production (1.24 to 2.45 Halo to clony ratio) was observed in all strains, but no isolates produced HCN. Significant increase in maize shoot height, fresh weight, dry weight and P uptake ($P < 0.05$) was observed in inoculated plants compared to uninoculated control. *Streptomyces* sp. 47 showed the best plant growth promotion performance while plants inoculated with *Streptomyces* sp. 50 showed a remarkably higher P uptake. Both strains were considered as suitable potential inoculants for increasing early maize growth and P uptake.

Keywords: Actinomycetes, Phosphate solubilization, Siderophore, IAA, Plant growth promotion

* Corresponding Authors; Email: rgnasr@yahoo.com

