نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد ششم، شماره دوم، ۱۳۹۵
http://ejsms.gau.ac.ir

بررسی صفات فنوتیپی و برخی خصوصیات محرک رشدی باکتری‌های ریزوبیومی جداسازی شده از گره‌های ریشه‌ای سویا

فاطمه تشکری[۱]، *رضا قربانی‌نصرآبادی[۲]، مجتبی بارانی‌مطلق[۲] و سیدعلیرضا موحدی‌نائینی[۳]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۰/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۳

چکیده

سابقه و هدف: تثبیت زیستی نیتروژن فرآیندی است که با تبدیل نیتروژن مولکولی هوا به شکل قابل استفاده گیاه می‌تواند تا اندازه زیادی جایگزین کودهای شیمیایی نیتروژنی شود. از سوی دیگر، خاک‌های آهکی به‌دلیل pH بالا معمولاً حاوی مقادیر کمی از عناصر غذایی قابل استفاده گیاه بوده و استفاده از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه می‌تواند قابلیت استفاده عناصر غذایی را بهبود بخشد. تشکیل گره به‌وسیله باکتری‌های ریزوبیومی در سویا و برقراری همزیستی آن‌ها متأثر از عوامل مختلفی در خاک است. هدف از این پژوهش جداسازی و غربالگری باکتری‌های ریزوبیومی همزیست با گره‌های ریشه‌ای سویا، ارزیابی توان مقاومت به برخی از تنش‌ها و توان تولید برخی متابولیت‌های محرک رشد و بازدارنده عوامل بیماریزا در باکتری‌های منتخب بود.

مواد و روش‌ها: گره‌های ریشه‌ای سویا از ۲۱ مزرعه در نقاط مختلف استان گلستان جمع‌آوری شدند. گره‌های ریشه‌ای سالم با استفاده از اتانول ۹۵ درصد (۳۰ ثانیه) و سپس غوطه ورکردن آنها در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به‌مدت ۳-۲ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و در نهایت ۷ بار با استفاده از آب مقطر استریل شستشو شدند. گره‌های استریل با استفاده از یک میلی‌لیترآب استریل در لوله‌های آزمایش له شده و سوسپانسیون حاصل در محیط کشت YMA حاوی کنگو رد کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت ٦-۳ روز خوابانیده شدند. آزمون گره‌زایی گیاه با استفاده از ۲۱ جدایه ریزوبیومی و در گلدان‌های شنی انجام پذیرفت. جدایه‌های مختلف ریزوبیومی از نظر تحمل به تنش‌ها (شوری، خشکی، دما)، مقاومت به علف‌کش‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک، سیدروفور و سیانید هیدروژن غربالگری شدند.

یافته‌ها: تست گره‌زایی نشان داد که تنها ۱۱ جدایه از ۲۱ جدایه مورد بررسی بر روی ریشه‌های گیاه سویا گره تشکیل دادند. فقط سه جدایه سیدروفور تولید نموده و هیچ‌یک از جدایه‌ها توان تولید سیانید هیدروژن را نداشتند. نتایج نشان داد که همه جدایه‌ها تا ۵ درصد NaCl را تحمل نمودند. ارزیابی تحمل دمایی نشان داد که تنها جدایه‌های ۲ و ١٦ به دمای ٤٢ درجه سلسیوس حساس بوده و بقیه جدایه‌ها به خوبی در این دما رشد نمودند. همه جدایه‌های مورد بررسی به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین حساس بوده در حالی‌که آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و استرپتومایسین اثر بازدارندگی بر

* مسئول مکاتبه: rgnasr@yahoo.com

رشد جدایه‌های ریزوبیومی نداشتند. اثر بازدارندگی علف‌کش تریفلورالین بر رشد جدایه‌های مورد بررسی ریزوبیوم بیش‌تر از سوپرگالانت بوده و تنش خشکی اعمال شده به‌وسیله پلی‌اتیلن‌گلیکول تاثیر منفی بر رشد جدایه‌های ریزوبیومی داشت و شدت آن به سطح خشکی و جدایه ریزوبیومی بستگی داشت. توانمندی ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک نشان داد که ١٤/٢، ٤٢/٨ و ٤٧/٦ در صد از جدایه‌ها به‌ترتیب آنزیم‌های آلفا- آمیلاز، سلولاز و پروتئاز تولید نمودند.

نتیجه‌گیری: ویژگی‌های محرک رشدی در جدایه‌های باکتریایی بررسی شده در این پژوهش نشان داد که برخی از جدایه‌ها توانایی بهره‌گیری بالقوه به‌عنوان باکتری افزاینده رشد گیاه را دارا می‌باشند. آن دسته از جدایه‌های توانمند در تولید سیدروفور و ترشح آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و سلولاز و هم‌چنین جدایه‌های توانمند جهت رشد تحت شرایط تنشی مختلف می‌توانند به‌عنوان جدایه‌های بالقوه در تولید مایه تلقیح جهت بررسی توانمندی تثبیت نیتروژن آن‌ها در سیستم همزیستی سویا- ریزوبیوم در کشت گلدانی و مزرعه‌ای مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: سیدروفور، سیانیدهیدروژن، آنتی‌بیوتیک، علف‌کش، سلولاز

مقدمه

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه[1] (PGPR) بخش کوچکی (٥-٢ درصد) از ریزوباکترها هستند که رشد گیاه را تحریک می‌کنند. این باکتری‌ها در طیف وسیعی از گیاهان زراعی به‌منظور افزایش رشد از طریق افزایش دانه در بوته، وزن بوته، عملکرد و کنترل بیماری به‌کار برده می‌شوند. تثبیت نیتروژن یکی از مهم‌ترین فرآیندهای زیستی در سطح زمین است. گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در سیستم همزیستی نه تنها نیازمند سازگاری گیاه میزبان و میکروارگانیسم همزیست آن می‌باشد بلکه بایستی محیط خاک نیز برای تبادل سیگنال‌های مرتبط با فرآیند آلودگی مناسب باشد (١٨). باکتری‌های ریزوبیومی از رایزوباکتری‌های متداول در ریزوسفر بوده و ممکن است توانمندی تولید هورمون‌های رشد گیاه (٣٠)، سیدروفور (١٢) و آنتی‌بیوتیک (٤٠) را داشته باشند. بنابراین این گروه از میکروارگانیسم‌ها را می‌توان به‌عنوان رایزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) به‌خصوص در کنترل *Fusarium* و *Pithium* عامل بیماری ریشه‌ای مورد استفاده قرار داد (٦). باکتری‌های محرک رشد می‌توانند به‌صورت "مستقیم" با تحریک رشد گیاه از طریق سازوکارهای تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مانند تولید هورمون‌های گیاهی، حل‌کنندگی فسفات (PS)[2]، تسریع فرآیند معدنی‌شدن و یا "غیر مستقیم" با کنترل عوامل بیماری‌زا از طریق تولید ترکیبات مختلف مانند سیانیدهیدروژن (HCN)، سیدروفور، متابولیت‌های ضد قارچ و آنتی‌بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک نمایند (٣٢). توانمندی ریزوبیوم‌ها در تطابق با شرایط تنشی خاک از فرآیندهای فیزیولوژیکی مهمی است که تعیین‌کننده بقا و رشد آن‌ها می‌باشد. قابلیت پایداری در خاک منجر به حصول اطمینان از گره‌زایی در گیاه میزبان شده و به طبع آن امکان تثبیت نیتروژن را فراهم می‌سازد. لازم به ذکر است که برخی از جدایه‌های ریزوبیومی از توانمندی بهتری برای مقابله با تنش‌ها برخوردار می‌باشند. در صورتی که تنش‌های زیستی، فیزیکی و شیمیایی کشنده نباشد، منجر به پاسخ تنشی در سلول می‌شوند (٣١).

1- Plant growth promoting rhizobacteria

2- Phosphate solubilization

سیدروفورها ترکیب‌های آلی با وزن مولکولی کم و لیگاندهای شیمیایی با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند شدن با آهن III هستند. نقش باکتری‌های مولد سیدروفورهای میکروبی در افزایش رشد گیاه می‌تواند به‌صورت غیرمستقیم و از طریق بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی و یا تحریک مستقیم رشد گیاه به‌واسطه افزایش جذب آهن توسط گیاه باشد (۲۶).

تولید سیانید هیدروژن، یکی از سازوکارهای بسیار مهم کنترل زیستی پاتوژن‌های گیاهی است (۲۹). HCN تولید شده، سیستم تنفسی قارچ‌های بیماری‌زا را مختل نموده و از این طریق موجب توقف رشد آن‌ها می‌گردد. سیانید بازدارنده قوی آنزیم سیتوکروم اکسیداز در بسیاری از موجودات زنده نیز است.

تولید آنزیم یکی از سازوکارهای میکروارگانیسم‌ها برای کنترل قارچ‌های بیماری‌زا می‌باشد. باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر علاوه بر محلول نمودن فسفات و تولید ترکیباتی از قبیل فیتوهورمون‌ها از طریق ترشح آنزیم‌هایی مثل آلفا آمیلاز، کیتیناز و ... به رشد بهتر گیاهان کمک می‌کنند. در سال‌های اخیر، توانایی میکروارگانیسم‌ها در تولید α- آمیلاز موجب شناسایی میکروارگانیسم‌هایی با فعالیت آمیلولیتیک شده است. آنزیم‌های پروتئازها دارای کاربردهای گسترده می‌باشند. میکروارگانیسم‌های زیادی هستند که توانایی تولید پروتئاز را دارند، پروتئازهای تولید شده توسط *باسیلوس* به‌دلیل ثبات حرارتی و پایداری در pH های مختلف اهمیت فراوانی دارند. همچنین این آنزیم در کنترل زیستی نیز نقش مهمی ایفا می‌کند. سلولز پلی‌ساکاریدی است که به‌عنوان بهترین ذخیره کربوهیدرات برای تولید انرژی زیستی به‌شمار می‌رود. سلولازهای باکتریایی و قارچی نقش مهمی در هیدرولیز سلولز بازی نموده و می‌توانند پیوندهای گلیکوزیدی آن‌ها را بشکنند.

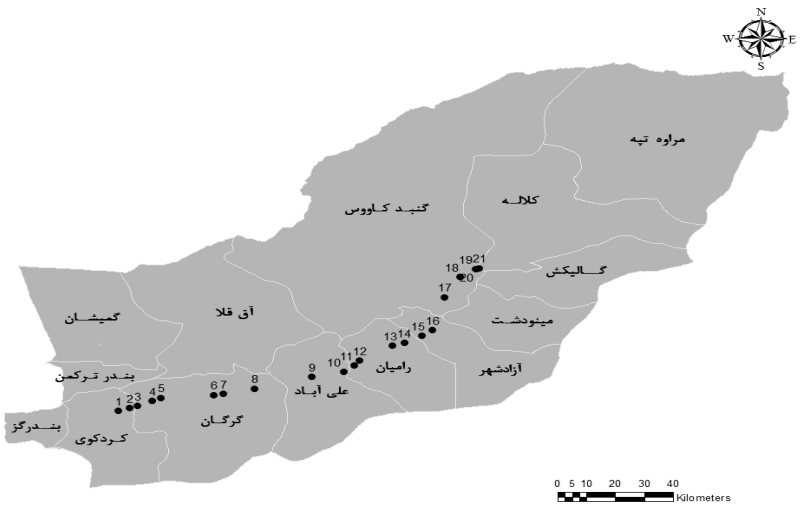
یکی از ویژگی‌هایی که می‌بایستی در انتخاب جدایه‌های *ریزوبیومی* برای استفاده در تولید مایه تلقیح‌های تجاری مورد ارزیابی قرار گیرد توانمندی آن‌ها در مقابله با شرایط تنشی موجود در محیط و نیز توان رقابت با میکروارگانیسم‌های بومی است. مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از سازوکارهایی است که می‌تواند منجر به بهبود گره‌زایی و به دنبال آن افزایش تثبیت نیتروژن گردد. دئورا و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی جدایه‌های *ریزوبیومی* مختلف گزارش کردند که قطر هاله مهار رشد باکتریایی در آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین، کانامایسین و استرپتومایسین به‌ترتیب ۹، ۱/۳ و ۲ سانتی‌متر بوده است.

گیاهان در حال رشد در شرایط محیطی نامطلوب مانند شرایط رشدی که در خاک خشک و نیمه‌خشک حاکم است، می‌توانند با استفاده از میکروارگانیسم‌های ریزوسفری سازگار به شرایط نامطلوب زیست‌محیطی سازوکارهای مختلفی را برای مقابله با محدودیت آب و مواد مغذی مورد استفاده قرار دهند (۲۳). تنش اسمزی به وضعیتی گفته می‌شود که محدودیت قابلیت دسترسی به آب، رشد و نمو گیاهان را کاهش می‌دهد (٤٧). محتوای آب خاک به‌طور مستقیم بر رشد میکروارگانیسم‌های ریزوسفری از طریق کاهش فعالیت آب به کم‌تر از حد تحمل آن‌ها تأثیر می‌گذارد. از سوی دیگر از طریق تغییر در رشد گیاه، غلظت عناصر غذایی، ساختار ریشه و ترشحات ریشه‌ای می‌تواند به‌طور غیرمستقیم نیز میکروارگانیسم‌های ریزوسفری را تحت‌تأثیر قرار دهد. علف‌کش‌ها مواد شیمیایی هستند که رشد علف‌های هرز نامطلوب را کنترل می‌کنند و به‌طور قابل‌توجهی باعث افزایش محصول می‌شوند. گونه‌های مختلف PGPR از نظر تحمل و حساسیت به آفت‌کش‌ها شناخته شده‌اند. این سویه‌ها به‌طور گسترده در اکثر مطالعات تجزیه زیستی و زیست‌پالایی استفاده می‌شود (۸). چناپا و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی روی ١٤ سویه *ازتوباکتر* مشاهده

کردند فقط ۱۳ جدایه توانایی رشد در علف‌کش پندی‌متالین را داشتند. شوری یکی از عواملی است که باعث کمبود عناصر غذایی در گیاهان می‌شود توانایی سویه‌های ریزوبیومی برای ایجاد گره‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی در شرایط شور و خشک بسیار متفاوت گزارش شده است. علیخانی و همکاران (۱۳۷۳) نشان دادند که سویه‌های *ریزوبیومی* از لحاظ تثبیت نیتروژن مولکولی در شرایط شور با یکدیگر تفاوت دارند و این تفاوت بسیار زیاد بوده و سویه‌ها از کاملاً حساس تا مقاوم در برابر این تنش محیطی می‌باشد هدف از انجام این پژوهش جداسازی باکتری‌های همزیست سویا از گره‌های ریشه این گیاه و ارزیابی توان مقاومت به برخی از تنش‌ها و توان تولید برخی فاکتورهای محرک رشدی و بیوکنترل باکتری‌های مورد بررسی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی: به‌منظور جداسازی باکتری‌های همزیست سویا، گره‌های ریشه‌ای از گیاهان سویا در ۲۱ نقطه از استان گلستان جمع‌آوری شدند (شکل ۱). گره‌ها با استفاده از اتانول ۹۵ درصد (۵-۱۰ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۲ تا ۳ دقیقه) ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل کاملاً شستشو شدند. باکتری‌های حاصل از گره‌های ضدعفونی‌شده با استفاده از روش استاندارد و در محیط YMA[1] (دی‌پتاسیم فسفات ۰/۵ گرم، سولفات منیزیوم ۰/۲، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، مانیتول ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۰/۵ گرم، آگار ۱۵ گرم) جداسازی شدند. کلنی‌هایی که از لحاظ ظاهری به ریزوبیوم‌ها شبیه بودند را برداشته و چند بار روی محیط کشت YMA واکشت شده و واکنش به گرم آن‌ها با استفاده از آزمایش رنگ‌آمیزی گرم نیز مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های خالص‌سازی شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس خوابانیده شده و سپس در گلیسرول ۲۰ درصد در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.



شکل ۱- موقعیت محل‌های نمونه‌برداری.

Figure 1. Location of sampling.

1- Yeast mannitol agar

تست گره‌زایی گیاه: برای بررسی توان تولید گره، آزمایشی گلدانی با استفاده از رقم DPX سویا (*Glycine max* var.DPX) در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. ابتدا بذرهای هم اندازه و سالم انتخاب و سپس با استفاده از اتانول ۹۵ درصد (۳۰ ثانیه) و هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (۳-۲ دقیقه) ضدعفونی و با آب مقطر استریل شستشو شدند. تعداد ٤ بذر ضدعفونی شده در گلدان‌های نیم کیلویی حاوی مخلوط شن و پرلیت شسته و استریل کاشته و بذرها با یک میلی‌لیتر از کشت باکتریایی حاوی تقریباً 10^8 سلول در میلی‌لیتر تلقیح (۷) و در دمای ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس با طول دوره روشنایی ١٦ ساعت رشد داده شدند. در طی دوره رشد از محلول غذایی فاقد نیتروژن jensen استفاده (۷) و پس از گذشت پنج هفته وزن خشک اندام هوایی و تعداد گره‌ها اندازه‌گیری شدند.

ارزیابی جدایه‌های *ریزوبیومی* از نظر تحمل به شوری و دما: تحمل شوری جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از مقادیر مختلف کلرید سدیم مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های باکتریایی به‌میزان ۱۰ میکرولیتر (با جمعیت 10^8 سلول در میلی‌لیتر) در محیط YMA حاوی غلظت‌های ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۳، ٤، ٥، ٦، ۷ درصد (حجمی/ وزنی) کلرید سدیم به‌صورت نقطه‌ای تلقیح شدند. تحمل باکتری‌ها به کلرید سدیم بر اساس میزان رشد باکتری‌ها پس از ٤٨ ساعت در مقایسه با محیط استاندارد YMA ارزیابی و به پنج گروه، عدم رشد (-)، رشد ضعیف (+)، رشد متوسط (++)، رشد خوب (+++) و رشد خیلی‌خوب (++++) تقسیم‌بندی شدند. تحمل دمایی سوسپانسیون باکتریایی پس از تلقیح نقطه‌ای بر روی محیط YMA در دماهای ۲۸، ۳۵، ٤٠ و ٤٢ درجه سلسیوس به‌مدت ٤٨ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. رشد باکتری‌ها نسبت به دمای ۲۸ درجه سلسیوس سنجیده، و همانند مقاومت به شوری، میزان رشد ارزیابی گردید (١٦).

توانایی تحمل به خشکی جدایه‌های *ریزوبیومی*: سنجش مقاومت به خشکی جدایه‌های *ریزوبیومی* با استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (PEG 6000)[1] انجام شد. برای انجام این آزمون غلظت‌های صفر، ١٤٤و ۲۸۸ گرم در لیتر پلی‌اتیلن گلیکول درمحیط YMB تهیه شد. پس از استریل نمودن محیط کشت، تلقیح با استفاده از سوسپانسیون باکتریایی انجام و نمونه‌ها به‌مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تکان داده شدند. رشد باکتریایی با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (٤١).

اندازه‌گیری میزان مقاومت به علف‌کش در جدایه‌های منتخب: برای انجام این آزمون از دو علف کش رایج مورد استفاده برای سویا، تریفورالین و سوپرگالانت استفاده شد. از هر یک از این علف‌کش‌ها غلظت‌های ۱، ۳ و ۵ درصد در محیط YMB تهیه شد. سپس در شرایط استریل مقدار یک میلی‌لیتر از مایه تلقیح هر یک از جدایه‌های *ریزوبیومی* به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۷۵ میلی‌لیتر محیط YMB و علف‌کش‌ها اضافه شد. ارلن‌هایی نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد که در آن‌ها تلقیح صورت نگرفت. نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و با دوران ۱۵۰ دور در دقیقه به‌مدت ٤٨ ساعت تکان داده شدند. پس از پایان آزمایش جمعیت ریزوبیوم‌ها از طریق تهیه سری رقت و شمارش تعداد کلنی‌های *ریزوبیومی* در محیط YMA صورت پذیرفت (٣٦).

بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک در جدایه‌های مختلف: به‌منظور بررسی حساسیت جدایه‌های مورد بررسی به آنتی‌بیوتیک ابتدا پلیت‌های حاوی محیط

1- Polyethylene glycol

YMA با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه جدایه‌های *ریزوبیومی* تلقیح و سپس مایه تلقیح جدایه‌ها به‌طور کامل در سطح پلیت پخش شد. دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل، استرپتومایسین، تتراسایکلین و اریترومایسین بر روی گستره *ریزوبیومی* در پلیت‌ها قرار داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت ٤٨ ساعت خوابانیده شده قرار داده شد و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها با توجه به وجود یا عدم وجود هاله در اطراف دیسک‌ها ارزیابی و در صورت وجود هاله، قطر هاله بازدارنده رشد اندازه‌گیری شد (١٦).

آزمون نیمه‌کمی توان تولید سیدروفور: آزمون توان نیمه‌کمی سیدروفور به روش الکساندر و زوبرر (۱۹۹۱) انجام شد. پس از تهیه محیط جامد کروم آزرول اس، جدایه‌ها بر روی محیط به روش لکه‌گذاری کشت شده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ روز درون انکوباتور قرار گرفت. 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 + کلنی به قطر کلنی اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری توان تولید هیدروژن سیانید: برای اندازه‌گیری تولید هیدروژن سیانید ابتدا جدایه‌ها در محیط TSA[1] غنی شده با گلایسین (٤/٤ گرم در لیتر) کشت داده شدند و سپس کاغذ صافی خیسانده شده در پیکرات سدیم (پیکریک اسید ۰/۵٪ و کربنات سدیم ۲٪) در قسمت داخلی درب پلیت قرار داده شد، پلیت‌ها را با نوار پارافیلم بسته، در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده و بعد از ۱۲۰ ساعت توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی اندازه‌گیری شد (۱۳).

توانایی تولید آنزیم α- آمیلاز: برای بررسی توان تولید آنزیم α- آمیلاز از روش وانگ و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. در این روش جدایه‌هایی که در محیط YMA خالص‌سازی شدند را بر روی محیط جامد حاوی نشاسته ۱٪، گلوکز ۰/٤٪، عصاره مخمر ۰/٤٪ و آگار ۱/۵٪ کشت داده و در دمای ۲۹ درجه سلسیوس به‌مدت ۳ روز در انکوباتور خوابانیده شدند. برای مشاهده توانایی تشکیل هاله نیز بعد از ۳ روز محیط را به‌وسیله محلول ایودین رنگ‌آمیزی کرده و جدایه‌هایی که در اطراف کلنی آن‌ها هاله تشکیل شد به‌عنوان جدایه‌های توانمند در تولید آنزیم α- آمیلاز در نظر گرفته شدند.

توانایی تولید پروتئاز: به این منظور ایزوله‌های انتخابی به روش مورفر و همکاران (۱۹۹۵) بر روی محیط اسکیم میلک آگار (اسکیم میلک، ۵ گرم، عصاره مخمر، ۵ گرم، بلاد آگار، ٤ گرم و آگار ١٤ گرم در لیتر) کشت داده و به‌مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۹ درجه سلسیوس در اتاق کشت خوابانیده شدند. تولید هاله در اطراف کلنی به‌عنوان شاخص تولید آنزیم پروتئاز در نظر گرفته شد.

توانایی تولید سلولاز: توانایی تولید آنریم سلولاز در محیط مندل- ریس که حاوی کربوکسیل متیل سلولز (CMC)[2] به‌عنوان تنها منبع کربن بود انجام شد (٢٤). جدایه‌ها بر روی CMC آگار حاوی KH_2PO_4، ۰/٤ گرم، $CaCl_2$، ۰/۰۲ گرم، NaCl، ۰/۰۲ گرم، $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۰۲ گرم، CMC، ۲/۵ گرم و آگار، ۱۵ گرم، کشت شدند. pH محیط نیز به‌وسیله سود یک نرمال بر روی ۷/۲ تنظیم شد. سپس پلیت‌ها به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۲۹ درجه سلسیوس در اتاق کشت نگهداری شدند. بعد از پایان زمان حرارت‌گذاری برای تعیین میزان توانایی جدایه‌ها در

1- Trypton soy agar

2- Carboxymethyl cellulose

تجزیه سلولز، از طریق تشکیل هاله، رنگ‌آمیزی با کنگورد (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) انجام شد. پس از ۲۰ دقیقه، کلرید سدیم یک نرمال به پلیت ها اضافه و به‌مدت ۱۵ دقیقه بروی پلیت باقی ماند. در نهایت پلیت‌ها شسته شده و توانمندی تولید هاله در اطراف کلنی‌ها بررسی شد.

نتایج و بحث

آزمون گرم‌زایی گیاه به‌وسیله جدایه‌های ریزوبیومی خالص‌سازی شده: بر اساس خصوصیات مورفولوژیک تمامی جدایه‌های ریزوبیومی خالص‌سازی شده از انواع تند رشد بوده و از لحاظ شکل ظاهری نیز هیچ شباهتی با باکتری‌های جنس *Bradyrhizobium* نداشتند. باکتری *Bradyrhizobium japonicum* معمولاً دارای کلنی‌های سفید، شیری، چسبنده و نسبتاً گرد هستند در حالی‌که جدایه‌های حاصل از گره‌های ریشه‌ای سویا در این پژوهش همگی حالت لزج و مخاطی داشتند. جدایه‌های باکتریایی *Bradyrhizobium japonicum* علاوه بر کندی رشد باعث قلیایی شدن محیط رشد خود می‌شوند. در حالی‌که ریزوبیوم‌های تند رشد منجر به اسیدی شدن محیط شده و رنگ محیط YMB حاوی کنگورد را به بنفش تغییر می‌دهند (۳۸). جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش نیز همگی منجر به کاهش pH محیط YM شده و ایجاد رنگ بنفش در محیط فقط در مورد جدایه‌هایی مشاهده شد که منجر به کاهش بیش‌تری در pH شده بودند. ژائو و همکاران (۲۰۱٤) بیان داشتند که از مجموع ۱۵۵ جدایه باکتریایی حاصل از گره‌های ریشه‌ای سویا (*Glycine soja*) هیچ‌یک متعلق به *Bradyrhizobium* نبودند. از میان ۲۱ جدایه خالص‌سازی شده ۱۱ جدایه توانایی تولید گره در ریشه را دارا بودند که جدایه ۲۱ با ٦۹ گره در گلدان بیش‌ترین و جدایه ٦ با ۳ گره در هر گلدان کم‌ترین تعداد گره را تولید کردند (جدول ۱). لازم به ذکر است که عدم گره‌بندی با استفاده از جدایه‌های ریزوبیومی پدیده غیرقابل انتظاری نیست. وزن خشک اندام هوایی، به‌عنوان معیاری غیرمستقیم از توان تثبیت زیستی، تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای در بین جدایه‌های مورد بررسی داشت به‌طوری‌که مقدار آن از ۹۱۲ تا ۲۱۷۰ میلی‌گرم در گلدان متفاوت بود. سامه و همکاران (۲۰۱٤) بیان داشتند که تمامی جدایه‌های ریزوبیومی خالص‌سازی شده از مناطق مختلف تحت کشت سویا در مصر توان گره‌دار کردن ریشه‌های سویا را دارا بوده و وزن خشک گره‌ها و اندام هوایی در گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های مختلف تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای با یکدیگر داشتند. یادگاری و همکاران (۱۳۸۳) در پژوهشی که بر روی اثرات تلقیح سویا با سویه‌های مختلف باکتری *Bradyrhizobium japonicum* بر گره‌بندی و تثبیت نیتروژن سویا انجام دادند گزارش کردند که تلقیح بذرها با سویه های استیک نسبت به سویه‌های هلی نیترو و سویار از کارایی گره‌بندی و تثبیت نیتروژن بیش‌تری برخوردار بودند.

سنجش مقاومت به علف‌کش‌ها: در این پژوهش مقاومت به علف‌کش‌های تریفلورالین و سوپرگالانت بر روی ۱۱ جدایه برتر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۳٦ درصد از جدایه‌های مورد بررسی فاقد توانایی رشد در محیط حاوی علف‌کش تریفلورالین بودند در حالی‌که در حضور علف کش سوپرگالانت دو جدایه نتوانستند رشد نمایند (جدول ۲). جدایه‌های ریزوبیومی که قادر به رشد در حضور دو علف‌کش بودند، حساسیت بیش‌تری نسبت به تریفلورالین داشتند به‌طوری‌که با افزایش غلظت این علف‌کش از یک به پنج درصد جمعیت تمامی آن‌ها روندی کاهشی داشت. روند کاهش جمعیت با افزایش غلظت علف‌کش سوپرگالانت به‌جز

جدایه‌های ١٨ و ٦ در سایر جدایه‌ها مشاهده نشد. جمعیت را در بین جدایه‌هایی داشتند که قادر به رشد جدایه‌های ١٤ و ٢٠ بیش‌ترین و کم‌ترین کاهش در حضور علف‌کش تریفلورالین بودند (جدول ٢).

جدول ١- ارزیابی کارایی جدایه‌های ریزوبیومی مختلف در گیاه سویا.

Table 1. Evaluation the effectiveness of different rhizobial isolates on soybean plants.

جدایه‌ها Isolates	تعداد گره The number of nodules	غده فعال (+)/ غده غیرفعال (-) Active nodule (+) Inactive nodule (-)	وزن خشک اندام هوایی (میلی‌گرم در گلدان) Shoot dry weight (mg/pot)
2	42	+	1130
5	25	+	1035
6	3	+	912
10	39	+	1230
12	20	+	1335
14	10	+	950
15	57	+	1080
16	49	+	1060
18	66	+	1650
20	45	+	1550
21	69	+	2170
-N	0	0	890
+N	0	0	1100

جدول ٢- رشد جدایه‌های منتخب باکتریایی در غلظت‌های مختلف علف‌کش بر اساس روش شمارش کلنی.

Table 2. Growth of selected bacterial isolates in different concentrations of herbicides based on colony forming count method.

جدایه‌ها Isolates	تریفلورالین				سوپرگالانت			
	شاهد blank	١(٪) 1(%)	٣(٪) 3(%)	٥ (٪) 5(%)	شاهد blank	١(٪) 1(%)	٣(٪) 3(%)	٥ (٪) 5(%)
2	$3*10^8$	-	-	-	$3*10^8$	-	-	-
5	$3*10^8$	$3*10^8$	$2*10^8$	$1.3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$
6	$3*10^8$	$3*10^8$	$1.2*10^8$	$5.6*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$1.6*10^8$	$1.5*10^8$
10	$3*10^8$	$3*10^8$	-	-	$3*10^8$	$3*10^8$	-	-
12	$3*10^8$	$3*10^8$	$8*10^7$	$4*10^7$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$
14	$3*10^8$	$2*10^8$	$1.85*10^8$	$1.5*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$
15	$3*10^8$	-	-	-	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$
16	$3*10^8$	-	-	-	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$
18	$3*10^8$	-	-	-	$3*10^8$	$1.8*10^8$	-	-
20	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$0.8*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$2*10^8$
21	$3*10^8$	$1.4*10^8$	$5.9*10^7$	$2.2*10^7$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$	$3*10^8$

علف‌کش تریفلورالین یکی از سموم پرکاربرد در سویا به‌شمار می‌رود. گائور (۱۹۸۰) یافته‌های سایر پژوهشگران را درباره اثر آفت‌کش‌ها بر تثبیت زیستی نیتروژن بررسی نموده و بیان داشت که تریفلورالین می‌تواند روی جمعیت ریزوبیوم‌ها و کارایی آن‌ها مؤثر باشد. گزارش‌های متناقضی از اثر علف‌کش‌ها بر لگوم‌ها و ریزوبیوم‌های همزیست آن‌ها وجود دارد. سانتوس و همکاران (۲۰۰۵) بیان داشتند که رشد ریزوبیوم‌ها به‌طور معنی‌داری با کاربرد برخی از علف‌کش‌ها کاهش یافت. در حالی‌که استفاده از علف‌کش با غلظت دو برابر مقدار آن در شرایط مزرعه‌ای بر رشد ریزوبیوم‌ها تأثیر نداشت ولی توانمندی آن‌ها در تشکیل گره را کاهش داد. بایستی توجه نمود که رشد ریزوبیوم‌ها تنها یک جنبه از فرآیند همزیستی است و این فرآیند به تشکیل گره، رشد و عملکرد گره نیز بستگی دارد. همه این فرآیندها ممکن است متأثر از کاربرد علف‌کش باشد.

بررسی توانمندی تحمل به خشکی: تفاوت قابل‌توجهی از نظر مقاومت به خشکی در بین جدایه‌های مورد بررسی وجود داشت (جدول ۳). همه جدایه‌ها به خوبی در محیط‌های فاقد پلی‌اتیلن گلیکول رشد نمودند. مقایسه نسبت رشد در شاهد و سطح اول تیمار خشکی نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تحمل این سطح خشکی بوده و مقدار رشد باکتریایی از ۳۰ تا ۹۳/۷ درصد نسبت به شاهد فاقد PEG-6000 متغیر بود. گرچه روند کاهش رشد با افزایش میزان خشکی اعمال شده به‌وسیله PEG-6000 در تمامی جدایه‌های ریزوبیومی مشاهده شد (جدول ۳) ولی میزان کاهش رشد در جدایه ۱٤ با افزایش خشکی بسیار شدید بود و در سطح دوم خشکی به کم‌تر از ۵ درصد از میزان رشد آن در تیمار شاهد رسید. عبدالسلام و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که جدایه‌های ریزوبیومی مورد بررسی آن‌ها از نظر مقاومت به خشکی دارای تفاوت قابل‌توجهی با یکدیگر بوده و جدایه‌های *Rhizobium leguminosarum* bv *Trifolii* مقاومت به خشکی بیش‌تری نسبت به جدایه‌های *Sinorhizobium meliloti* داشتند. اوما و همکاران (۲۰۱۳) نیز در بررسی مقاومت به خشکی جدایه‌های *Bradyrhizobium* بیان داشتند که برخی از جدایه‌های مورد بررسی آن‌ها به خوبی در سطح ۳۰ درصد PEG رشد نمودند.

سلول‌های میکروبی نسبت به سلول‌های گیاهی از مقاومت بیش‌تری در مقابله با تنش خشکی برخوردارند و معمولاً باکتری‌های ریزوبیومی نسبت به لگوم‌ها مقاومت بیش‌تری به خشکی از خود نشان می‌دهند. در نتیجه از مرحله شروع آلودگی ریزوبیوم‌ها تا زمانی که گره‌های تمایز یافته به وظیفه خود عمل می‌نمایند، مهم‌ترین فاکتورهای محدودکننده تثبیت نیتروژن در شرایط تنش آبی، وابسته به گیاه خواهد بود. در محیط طبیعی خاک‌ها باکتری‌های گروه ریزوبیومی از نظر حساسیت به اثرات مضر خشکی با یکدیگر متفاوت می‌باشند. ریزوبیوم‌های کند رشد نسبت به انواع تند رشد بهتر می‌توانند شرایط تنش خشکی را تحمل نمایند (۳۹).

جدول ٣- اثر خشکی اعمال شده با PEG-6000 بر میزان رشد جدایه‌های *ریزوبیومی* اندازه‌گیری شده به روش اسپکتوفتومتری.

Table 3. Effect of drought stress imposed by PEG-6000 on the rhizobia growth as measured by spectrophotometric method.

جدایه‌ها Isolates	سطوح غلظت پلی‌اتیلن گلایکول (گرم در یک لیتر) Polyethylene glycol levels (g/L)		
	0	144	288
5	1.790	0.851	0.213
6	1.06	0.391	0.168
12	1.683	0.506	0.239
14	1.398	1.11	0.079
16	1.688	0.746	0.24
20	1.674	1.567	0.435
21	1.471	0.746	0.297

ارزیابی تحمل به شوری در جدایه‌های مختلف: نتایج حاصل از میزان تحمل به نمک در ١١ جدایه مختلف نشان داد که با افزایش میزان نمک، رشد جدایه‌ها کاهش یافت اما میزان تأثیر آن بر جدایه‌های مختلف متفاوت بود. تمامی جدایه‌ها به‌جز جدایه ١٦ توانستند تا غلظت ٥ درصد NaCl را تحمل نمایند (جدول ٤). در حالی‌که تنها ٥ جدایه (٥، ٦، ١٢، ١٤ و ٢٠) رشد ضعیف تا متوسطی در غلظت ٧ درصد نمک از خود نشان دادند. نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های رضا و همکاران (٢٠٠١) مطابقت داشت. این پژوهشگران بیان داشتند که جدایه‌های ریزوبیومی مورد بررسی آن‌ها از نظر تحمل به نمک به دو گروه قابل تفکیک بودند. گروه اول شامل تمامی جدایه‌های ریزوبیومی بود که توانستند تا غلظت ٥ درصد نمک را تحمل نمایند و گروه دوم، آن دسته از ریزوبیوم‌ها را شامل می‌شد که توان تحمل نمک تا میزان ٧ درصد را نیز دارا بودند.

از میان جدایه‌های مورد بررسی همه جدایه‌ها رشد مطلوبی تا میزان نمک ٣ درصد داشتند ولی جدایه ٢١ میزان حساسیت بیش‌تری از خود نشان داد به‌طوری‌که از مقدار نمک ٣ درصد شروع به کاهش رشد نموده و جدایه ٢٠ مقاوم‌ترین جدایه به میزان‌های مختلف نمک بود که تا میزان نمک ٦ درصد نمک هم رشد مطلوبی داشت.

گره‌زایی و تثبیت نیتروژن در همزیستی ریزوبیوم- لگوم متأثر از شوری بوده و می‌تواند مانع استقرار و رشد یا کاهش عملکرد گیاهان لگوم گردد. بر خلاف گیاهان لگوم، ریزوبیوم‌ها می‌توانند در حضور مقادیر بالای نمک نیز زنده بمانند، گرچه تفاوت فاحشی از نظر تحمل به نمک در بین ریزوبیوم‌ها وجود دارد (٤٢). عدم موفقیت در برقراری همزیستی در شرایط شور ممکن است به‌دلیل عدم توانایی استقرار ریزوبیوم‌ها در ریزوسفر، عدم شروع فرآیند آلودگی و اثر بازدارنده شوری بر گره‌زایی باشد (٣٧). تنش‌های غیرزیستی مثل شوری و دما ممکن است الگوی سنتز برخی از اجزاء ضروری سلول از قبیل پروتئین‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها در ریزوبیوم‌های متحمل به نمک را تغییر دهد. برای مثال در *R. etli* متحمل به نمک، میزان بیان ٤٩ پروتئین آن در شوری ٤ درصد تغییر پیدا نمود (٣٧). ریزوبیوم‌هایی که در معرض شوری قرار می‌گیرند می‌توانند تعادل اسمزی اطراف غشاء را با خروج نمک‌ها و از طریق تجمع درون‌سلولی نمک‌های معدنی و یا آلی حفظ نمایند. وریزن و همکاران (٢٠٠٧) بیان داشتند که *S. meliloti* از

طریق تجمع نمک‌هایی مثل پتاسیم، گلوتامات، پرولین، گلایسین بتائین، پرولین بتائین و ترهالوز مانع ازاثر بازدارندگی تنش اسمزی بر رشد خود می‌شود. علیخانی و همکاران (۱۳۸۹) در پژوهشی روی ۱۸٤ سویه *ریزوبیوم لگومینوزاروم* و بیووار *ویسیه* همزیست عدس ۱۰۱ سویه *ریزوبیومی* را کاملاً حساس (EC=10 ds/m) و ۲۵ سویه به‌عنوان خیلی متحمل و ۱۰ سویه به‌عنوان سوپر استرین‌های کاملاً متحمل به شوری گزارش کردند.

جدول ٤- تحمل به شوری جدایه‌های باکتریایی حاصل از گره‌های ریشه‌ای سویا.

Table 4. Salinity tolerance of bacterial isolates derived from soybean root nodules.

شوری salinity / جدایه‌ها Isolates	0.1	0.5	1	2	3	4	5	6	7
2	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	–	–
5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+
6	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+
10	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	–	–
12	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+
14	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	+
15	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	–
16	++++	++++	++++	++++	++++	+	–	–	–
18	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	–	–
20	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++
21	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	–	–

– عدم رشد، + رشد ضعیف، ++ رشد متوسط، +++ رشد خوب، ++++ رشد خیلی‌خوب.

- Lack of growth, + weak growth, ++ moderate growth, +++ good growth, ++++ very good growth.

بررسی توان رشد در دماهای مختلف: بررسی میزان مقاومت به دما در جدایه‌های ریزوبیومی مورد استفاده در این پژوهش نشان داد که تمامی جدایه‌ها به خوبی تا دمای ٤۰ درجه سلسیوس رشد نمودند (جدول ۵). در حالی‌که بررسی رشد جدایه‌ها در دمای ٤۲ درجه سانتی‌گراد نشان داد که جدایه‌های ۲ و ۱٦ تحت‌تأثیر دما قرار گرفته و از رشد مطلوبی برخوردار نبودند.

دمای بهینه رشد برای *ریزوبیوم‌ها* ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس است (٤۵)، با این حال، در هر دو زندگی همزیستی و ساپروفیتی، *ریزوبیوم*ها اغلب در معرض درجه حرارت خارج از این محدوده قرار می‌گیرند. میزان تشکیل گره به‌وسیله جدایه‌های ریزوبیومی در دماهای بالا کاهش یافته و هم‌چنین دماهای بالا منجر به حذف پلاسمیدها در جدایه‌های ریزوبیومی تند رشد می‌شود. بیش‌تر مطالعات بر تحمل به تنش دمایی *ریزوبیوم*ها در سویا و لوبیا متمرکز است که این *ریزوبیوم*ها رشد ضعیف در ٤۰ درجه سلسیوس از خود نشان دادند (۹). بنسال و همکاران (۲۰۱٤) در پژوهشی تحمل دماهای مختلف را روی ۹۱ جدایه باکتری *ریزوبیومی* جدا شده از گره ماش بررسی و

بیان داشتند که تمامی جدایه‌ها به خوبی در دمای ٤٠-٣٠ درجه سانتی‌گراد رشد نمودند در حالی‌که فقط دو جدایه MR23 و MS57 قادر به رشد در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد بودند.

جدول ٥- رشد کیفی باکتری‌ها در دماهای مختلف.

Table 5. The qualitative growth of bacteria at different temperatures.

جدایه‌ها Isolates / دما Temperature	28	35	40	42
2	++++	+++	+++	+
5	++++	++++	++++	++++
6	++++	++++	++++	+++
10	++++	++++	++++	++++
12	++++	++++	++++	++++
14	++++	++++	++++	++++
15	++++	++++	++++	+++
16	++++	++++	++++	++
18	++++	++++	++++	++++
20	++++	++++	++++	+++
21	++++	++++	++++	++++

- عدم رشد، + رشد ضعیف، ++ رشد متوسط، +++ رشد خوب، ++++ رشد خیلی‌خوب.

- Lack of growth, + weak growth, ++ moderate growth, +++ good growth, ++++ very good growth.

سنجش مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها: ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک نشان داد که هیچ‌یک از جدایه‌ها نسبت به تتراسایکلین مقاومت نداشتند. قطر هاله بازدارنده رشد در جدایه‌های مختلف باکتریایی نسبت به تتراسایکلین تفاوت قابل‌ملاحظه‌ای داشت به‌طوری‌که کم‌ترین قطر هاله بازدارندگی ٩ میلی‌متر، مربوط به جدایه ٣ و بیش‌ترین مقدار آن ٢٠ میلی‌متر مربوط به جدایه‌های ١٣ و ١٤ بود (جدول ٦). از ٢١ جدایه مورد بررسی، تنها ٥ جدایه دارای قطر هاله بازدارنده در اطراف دیسک اریترومایسین بودند که بیش‌ترین قطر هاله بازدارنده مربوط به جدایه ١ با قطر هاله ٧ میلی‌متر بود و در مورد آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و استرپتومایسین هاله بازدارنده مشاهده نشد و تمامی جدایه‌ها نسبت به دو آنتی‌بیوتیک مذکور مقاومت داشتند. مقاومت به آنتی‌بیوتیک در میکروارگانیسم‌های خاکزی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است و یکی از سازوکارهایی است که *ریزوبیوم*‌ها می‌توانند با استفاده از آن بر آنتاگونیسم اعمال شده به‌وسیله سایر میکروارگانیسم‌ها، استفاده نمایند. گائوری و همکاران (٢٠١١) بیان داشتند که در جدایه‌های *ریزوبیومی* همزیست شبدر (*Trifolium alexandrinum*) بیش‌ترین حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین وجود داشت که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت. دئورا و همکاران (٢٠١٠) در پژوهشی برروی جدایه‌های *ریزوبیومی* گزارش کردند که قطر هاله مهار رشد باکتریایی در آنتی‌بیوتیک‌های تتراسایکلین،

کانامایسین و استرپتومایسین به‌ترتیب ۹، ۱/۳ و ۲ سانتی‌متر بود. فلورنتینو و همکاران (۲۰۱۰) بیان داشتند که از مجموع جدایه‌های مورد بررسی آن‌ها فقط دو جدایه نسبت به تتراسایکلین حساسیت داشتند. حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند نشان‌دهنده توانمندی رقابت کم‌تر با جدایه‌های بومی خاک باشد زیرا بررسی‌ها نشان داده که انواعی از ریزجاندارهای تولیدکننده آنتی‌بیوتیک از جمله اکتینومایست‌ها در خاک‌ها وجود دارند.

از منظر اکولوژیک افزایش مقاومت *Bradyrhizobium* به آنتی‌بیوتیک‌هایی که در خاک وجود دارند، امکان‌پذیر است. به‌عنوان مثال استرپتومایسین به‌وسیله طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های خاکزی تولید می‌شود و بهبود مقاومت *Bradyrhizobium* به این آنتی‌بیوتیک می‌تواند به‌عنوان سازوکاری جهت بقا باشد (۲۷).

جدول ٦- توانمندی مقاومت به آنتی‌بیوتیک جدایه‌ها در محیط YMA.

Table 6. Antibiotic resistance capability of the isolates on YMA.

جدایه‌ها Isolates	(قطر هاله بازدارنده (میلی‌متر) Inhibition zone diameter (mm)			
	کلرامفنیکل Chloramphenicol	استرپتومایسین Streptomycin	تتراسایکلین Tetracycline	اریترومایسین Erythromycin
1	-	-	12	7
2	-	-	16	14
3	-	-	9	-
4	-	-	17	-
5	-	-	10	6
6	-	-	15	5
7	-	-	12	-
8	-	-	10	-
9	-	-	15	-
10	-	-	12	-
11	-	-	16	-
12	-	-	19	-
13	-	-	20	-
14	-	-	20	-
15	-	-	12	6
16	-	-	19	-
17	-	-	10	-
18	-	-	12	-
19	-	-	12	-
20	-	-	10	-
21	-	-	13	-

توان تولید سیدروفور: نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها نشان داد که آزمون تولید سیدروفور در جدایه‌های مورد آزمایش در سطح ٥ درصد معنی‌دار بوده است. ارزیابی سیدروفور برروی ١١ جدایه برتر و از طریق ایجاد هاله نارنجی در اطراف کلنی‌های آن‌ها در محیط CAS[1] آگار و نسبت قطر هاله به کلنی انجام شد. نتایج نشان داد که که تنها سه جدایه قادر به تولید سیدروفور بوده و سایر جدایه‌ها فاقد توان تولید سیدروفور بودند. جدایه ١٦ با متوسط نسبت قطر هاله به کلنی ٣ بیش‌ترین و دو جدایه ٢١ و ٥ با نسبت قطر هاله به کلنی ٢/٤٤ و ٢/٧٥ مقدار سیدروفور کم‌تری را تولید نمودند. با توجه به حساس بودن سویا نسبت به کمبود آهن استفاده از جدایه‌های ریزوبیومی تولیدکننده سیدروفور می‌تواند به‌عنوان یکی از سازوکارهای مفید در مواجهه با کمبود آهن مورد بررسی قرار گیرد. نتایج حاصل از بررسی ٣٥ جدایه *ریزوبیومی* جداسازی شده از ریزوسفر نخود نشان داد که هیچ‌یک از جدایه‌های مذکور قادر به تولید سیدروفور نبودند در حالی‌که ٧٤/٢ درصد از جدایه‌های *Pseudomonas* و ١٢/٥ درصد از جدایه‌های *Bacillus* جداسازی شده از ریزوسفر همان گیاه توانمندی تولید سیدروفور را از خود نشان دادند (١٩). تولید سیدروفور توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه نقش حیاتی در تغذیه گیاهان و در نتیجه بهبود رشد گیاه ایفا می‌کنند. تولید سیدروفور توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه نقش حیاتی در تغذیه حیات گیاهان و در نتیجه در ارتقا رشد گیاه ایفا می‌کنند. صالح راستین و همکاران (١٣٨٢) در پژوهشی برروی *ریزوبیوم*‌های خاک‌های ایران ٤٤٧ جدایه از گروه‌های مختلف *ریزوبیومی* که از لگوم‌های مهم زراعی، کشت شده در خاک‌های مناطق مختلف ایران به‌شمار می‌آمدند را جداسازی و پس از شناسایی، مورد آزمایش قرار دادند. نتایج نشان داد که اکثر سویه‌های *ریزوبیومی*، قادر به رشد مستقیم برروی محیط CAS- آگار نبودند. کاناهی و همکاران (٢٠١٤) در پژوهشی گزارش کردند سودوموناس فلورسنس و *Rhizopus* sp. بیش‌ترین سیدروفور از نوع کاتشولی و coli *Escherichia* و *Azosprillium flavus* کم‌ترین میزان از سیدروفور کاتشولی را تولید کرده‌اند. همچنین *Escherichia coli* کم‌ترین میزان و ٣ باکتری دیگر بیش‌ترین میزان تولید سیدروفورهای هیدروکساماتی را دارا بودند.

اندازه‌گیری توان تولید سیانید هیدروژن: اندازه‌گیری سیانید هیدروژن (HCN) بر روی همه جدایه‌های خالص‌سازی شده انجام گرفت و هیچ‌کدام از جدایه‌ها قادر به تولید این متابولیت نبودند. جوزف و همکاران (٢٠٠٧) توان تولید سیانید هیدروژن در جدایه‌های باکتریایی خالص‌سازی شده از ریزوسفر نخود را مورد بررسی قرار داده و نتایج آن‌ها نشان داد که از مجموع ١٥٠ جدایه باکتریایی متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Azotobacter*، *Bcillus* و *Rhizobium*، هیچ‌یک توانمندی تولید HCN را نداشتند. در حالی‌که کرمر و سوئیسی (٢٠٠١) بیان داشتند که مقدار HCN تولید شده از صفر تا کمی بیش از ٣٠ نانومول به‌ازای هر میلی‌گرم سلول متغیر بوده است. توانایی تولید HCN به‌طور عمده در بین باکتری‌های سودوموناس متمرکز بوده و برخی از باکتری‌های *ریزوبیومی* نیز توان تولید سیانید را از خود نشان داده‌اند. به عقیده آن‌ها تولید HCN با افزایش مقدار گلایسین در محیط افزایش می‌یابد، آن‌ها همچنین پیشنهاد کردند که توانایی تولید HCN توسط باکتری‌های PGPR یک قابلیت بالقوه و سازوکاری مناسب برای کنترل بیولوژیک علف‌های هرز می‌باشد که باید به‌عنوان یک جنبه مفید در روش‌های تقویت و تحریک رشد گیاهان زراعی

1- Chrome azurol S

و افزایش عملکرد محصول، بیش‌تر مورد توجه قرار گیرد.

توان تولید آنزیم‌ها در جدایه‌های مورد بررسی: آنزیم α- آمیلاز آنزیمی است که هیدرولیز نشاسته را انجام می‌دهد و امروزه اهمیت زیادی در صنایع مختلف نظیر، صنایع غذایی، کاغذسازی و ... دارد. اگر چه این آنزیم از منابع مختلفی مانند منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی تولید می‌شود، اما منابع میکروبی تقاضای صنعتی زیادی دارند. امروزه آمیلاز میکروبی زیادی به‌صورت صنعتی تولید می‌شود (۱۷). از همه جدایه‌های مورد بررسی در این آزمایش تنها سه جدایه (۱٤/۲ درصد) توانایی قابلیت تولید α- آمیلاز را دارا بودند. توانایی این آنزیم هم از طریق تولید هاله اطراف کلنی اثبات شد. همچنین تمامی جدایه‌های منتخب از نظر ترشح آنزیم پروتئاز مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون نیز ده جدایه (٤۷/٦ درصد) توانایی تولید هاله شفاف را داشته که نشان‌دهنده توان تولید پروتئاز است. توان تولید سلولاز در محیط مندل ریس براساس شاخص تولید هاله در اطراف کلنی نشان داد که ۹ جدایه (٤۲/۸ درصد جدایه‌ها) قادر به ایجاد هاله بوده و سایر آن‌ها فعالیتی از خود نشان ندادند (جدول ۷). هیچ‌یک از جدایه‌های مورد بررسی توان تولید هر سه آنزیم را نداشتند (جدول ۷). باکتری‌هایی که بروز یا شدت بیماری‌های گیاهی را کاهش می‌دهند اغلب به‌عنوان عوامل بیوکنترل و آنتاگونیست شناخته می‌شوند. آنزیم‌های کیتیناز، پروتئاز، سلولاز، زایلناز از انواع تجزیه‌کننده دیواره سلولی قارچ‌ها و مخمرها بوده و می‌توانند منجر به کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا گردند (۲۸). کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی از طریق ریزجانداران می‌تواند به‌طور مستقیم و با تولید مواد مؤثر بر یک یا چند مرحله از چرخه زندگی پاتوژن یا به‌طور غیرمستقیم و با فعال کردن سازوکارهای القاء مقاومت گیاه میزبان در مقابل عامل بیماری‌زا باشد (۲۲). همچنین آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز، آمیلاز، اوره‌از و پروتئاز در تجزیه ماده آلی از اهمیت بسیار زیادی برخوردارند و بنابراین در حاصلخیزی خاک نقش مهمی دارند. نیتروژن حاصل از تجزیه پروتئین برای حفظ چرخه دائمی نیتروژن بین گیاهان و اجزاء خاک ضروری می‌باشند.

جدول ۷- توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک در جدایه‌های مختلف.

Table 7. The ability to produce hydrolytic enzymes by different isolates.

جدایه‌ها Isolates	توانایی تولید α- آمیلاز The ability to produce α- amylase	توانایی تولید پروتئاز The ability to produce protease	توانایی تولید سلولاز The ability to produce cellulase
1	−	+	−
2	−	−	+
3	−	−	−
4	−	++	+
5	−	−	+
6	−	−	−
7	+	++	−
8	−	−	−
9	−	−	−
10	−	+	++

ادامه جدول ٧-

Continue Table 7.

جدایه‌ها Isolates	توانایی تولید α- آمیلاز The ability to produce α- amylase	توانایی تولید پروتئاز The ability to produce protease	توانایی تولید سلولاز The ability to produce cellulase
11	++	++	-
12	-	++	+++
13	-	-	-
14	-	-	+
15	-	-	-
16	-	+	-
17	++	-	-
18	-	+	+++
19	-	++	-
20	-	+	++
21	-	-	++

- عدم تولید هاله، + قطرهاله به کلنی بین ١ تا ٢، ++ قطرهاله به کلنی بین ٢ تا ٣، +++ قطر هاله به کلنی بیش‌تر از ٣ میلی‌متر می‌باشد.
- Without clear zone, + halo to colonies 1 - 2, ++ halo to colonies 2 - 3, +++ halo to colony more than 3 mm.

نتیجه‌گیری کلی

هدف از این پژوهش جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوبیومی از گره‌های ریشه‌ای گیاهان سویا از برخی مناطق تحت کشت سویا در استان گلستان و غربال‌گری آن‌ها از نظر ویژگی‌های محرک رشدی و نیز بررسی میزان مقاومت آن‌ها در مقابل برخی تنش‌های غیرزیستی در شرایط آزمایشگاهی بود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که هیچ‌یک از جدایه‌های باکتریای خالص شده از نوع کند رشد نبوده و از لحاظ ظاهری نیز کلنی‌های ریزوبیومی حاصل هیچ شباهتی با *Bradyrhizobium japonicum* نداشتند. هم‌چنین برخی از جدایه‌های حاصل از این پژوهش توانستند دمای ٤٢ درجه سلسیوس و شوری ٧ درصد را نیز تحمل نمایند و تمامی جدایه‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل و استرپتومایسین ازخود مقاومت نشان دادند. توان تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک در جدایه‌های مورد بررسی متفاوت بوده و تولید پروتئاز در جدایه‌های مورد بررسی متداول‌تر از آلفا آمیلاز و سلولاز بود. تولید سیدروفور تنها در ١٤/٣ درصد از جدایه‌های مورد بررسی مشاهده شد. با توجه به اثبات توانمندی برخی از جدایه‌ها در تحمل تنش‌های محیطی و تولید متابولیت‌های محرک رشد، به‌منظور اثبات توانمندی جدایه‌های خالص‌سازی شده در بهبود رشد، عملکرد و جذب عناصر غذایی، انجام آزمایش‌های گلدانی و مزرعه‌ای بایستی صورت پذیرد.

منابع

1.Abdel-Salam, M.S., Ibrahim, S.A., Abd-El-Halim, M.M., Badawy, F.M., and Abo-Aba, S.E.M. 2010. Phenotypic characterization of indigenous Egyptian Rhizobial strains for abiotic stresses performance. J. Amer. Sci. 6: 9. 498-503.

2.Alexander, D.B., and Zuberer, D.A. 1993. Responses by iron-efficient oat cultivation with siderophore-producing bacteria in a calcareous soil. Biol. Fertil. Soils. 16: 118-124.

3.Alikhani, H.A., Mohammadi, L. 2011. Assessing Tolerance of Rhizobial-Lentil Symbiosis Isolates to Salinity and Drought in Dry Land Forming Condition. P. production Tec. 1: 59-67.
4.Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N., and Antoun, H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. Plant and Soil. 287: 35-41.
5.Ardakani, S., Heidary, A., Tayebi, L., and Mohammadi, M. 2010. Promotion of cotton seedling growth characteristics by the development and use of new bioformulations. Int. J. Bot. 6: 2. 95-100.
6.Bansal, M., Kukreja, K., Sunita, S., and Dudeja, S.S. 2014. Symbiotic effectivity of high temperature tolerant mungbean (*Vigna radiata*) rhizobia under different temperature conditions. Int. J Cur. Microbiol. Appl. Sci. 3: 12. 807-821.
7.Bardin, S.D., Huang, H.C., Pinto, J., Amundsen, E.J., and Erickson, R.S. 2004. Biological control of Pythium damping off of pea and sugar beet by *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciae*. Can. J. Bot. 82: 291-296.
8.Beck, D.P., Materon, L.A., and Afandi, F. 1993. Practical rhizobium- legume technology manual. Technical manual no. 19. International center for agricultural research in the dry areas. 389p.
9.Castillo-Monroy, A.P., Bowker, M.A., Maestre, F.T., et al. 2011. Relationships between biological soil crusts, bacterial diversity and abundance, and ecosystem functioning: insights from a semi-arid Mediterranean environment. J. Veg. Sci. 22: 165-174.
10.Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W., and Young, C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl. Soil Ecol. 34: 33-41.
11.Chennappa, G., Adkar-Purushothama, C.R., Umdale Suraj, K., and Sreenivasa, M.Y. 2013. Pesticide tolerant *Azotobacter* isolates from paddy growing areas of northern Karnataka, India. World J. Microbiol. Biotechnol. 30: 1. 1-7.
12.Deora, S., and Singal, K. 2010. Isolation, biochemical characterization and preparation of biofertilizers using Rhizobium straind for commercial use, Biosci. Biotechnol. Res. Comm. 3: 2. 132-136.
13.Dilworth, M.J., Carson, K.C., Giles, R.G.F., Byrne, L.T., and Glenn, A.R. 1998. *Rhizobium leguminosarum* b.v. *viciae* produces a novel cyclic trihydroxamate siderophore, vicibactin. Microbiology, 144: 781-791.
14.Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., and Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary. Plant Soil. 266: 261-272.
15.Florentino, L.A., Sousa, P.M., Silva, J.S., Silva, K.B., and Moreira, F.M.S. 2010. Diversity and efficiency of Bradyrhizobium strains isolated from soil samples collected from around *Sesbania virgata* roots using cowpea as trap species. Revista Brasileira de Ciência do Solo. 34: 2. 1113-1123.
16.Gaur, A.C. 1980. Effect of pesticides on symbiotic nitrogen fixation by legumes. Ind. J. Microbiol. 20: 362-370.
17.Gauri Kumar Singh, A., Prasad Bhatt, R., Pant, S.H., Kaur Bedi, M., and Naglot, A. 2011. Characterization of Rhizobium isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum*. J. Agri. Technol. 7: 6. 1705-1723.
18.Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V.K., and Chauhan, B. 2003. Microbial amylases: A biotechnological perspective. Proc. Biochem. 00: 1-18.
19.Hirsch, A.M., Bauer, W.D., Bird, D.M., Cullimore, J., Tyler, B., and Yoder, J.I. 2003. Molecular signals and receptors controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. Ecology. 84: 858-868.
20.Joseph, B., Ranjan Patra, R., and Lawrence, R. 2007. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). Int. J. Plant Prod. 1: 2. 141-152.

21.Kannahi, M., and Senbagam, N. 2014. Studies on siderophore production by microbial isolates obtained from rhizosphere soil and its antibacterial activity. J. Chem. Pharm. Res. 6: 4. 1142-1145.
22.Kremer, R.J., and Souissi, T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Curr. Microbiol. 43: 182-186.
23.Macagnan, D., Romeiro, R.S., Pomella, A.W.V., and deSouza, J.T. 2008. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex Crinipellis) *Perniciosa* by phylloplane actinomycetes. Biological Control. 47: 309-314.
24.Marulanda, A., Porcel, R., Barea, J.M., and Azcon, R. 2007. Drought tolerance and antioxidant activities in lavender plants colonized by native drought-tolerant or drought-sensitive Glomusspecies. Microb. Ecol. 54: 543-552.
25.Majidi, S., Roayaei, M., and Ghezelbash, G. 2011. Carboxymethyl cellulase and filter paperase activity of new strains isolated from Persian Gulf. Microbiol. J. 1: 8-16.
26.Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1995. Influence of Plant Species on Disease Suppression by *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 with Enhanced Antibiotic Production. Plant Pathol. 44: 40-50.
27.Miethke, M., and Maraheil, M. 2007. Siderophore-based iron acquistion and pathogen control. Microbiol. Mole. Biol. Rev. 71: 3. 413-451.
28.Mueller, J.G., Skipper, E.R., Shipe, E.R., Grimes, L.W., and Wagne, S.C. 1988. Intrinsic antibiotic resistance in Bradyrhizobium japonicum. Soil Biol. Biochem. 20: 6. 879-882.
29.Nabti E., Bensidhoum, L., Tabli, N., Dahel, D., Weiss, A., Rothballer, M., Schmid, M., and Hartmann, A. 2014. Growth stimulation of barley and biocontrol effect on plant pathogenic fungi by a Cellulosimicrobium sp. strain isolated from salt-affected rhizosphere soil in northwestern Algeria. Europ. J. Soil Biol. 61: 20-26.
30.Nadine, J., Coste De, V., Gadkar, J., and Filion, M. 2010. Verticillium dahlia alters Pseudomonas spp. populations and HCN gene expression in the rhizosphere of strawberry. J. Microbiol. 56: 11. 906-915.
31.Perrine, F.M., Rolfe, B.G., Hynes, M.F., and Hocart, C.H. 2004. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of indole acetic acid and tryptophan following aqueous chloroformate derivitisation of Rhizobium exudates. Plant Physiol. Biochem. 42: 723-729.
32.Poole, P.S., Hynes, M.F., Johnston, A.W.B., Tiwari, R.P., Reeve, W.G., and Downie, J.A. 2008. Phsiology of root nodule bacteria. In: Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I. and Newton, W.E.(eds). Nitrogen fixing leguminous symbioses. Springer, Netherland. Pp: 241-292.
33.Rasouli Sadaghiani, M.H., Kavazi, K., Rahimian, H., Malakouti, M.J., and Asadi, H. 2005. Population Density and Identification of *Fluorescent Pseudomonads* Associated with Rhizosphere of Wheat. J. Soil Water Sci. 19: 224-234. (In Persian)
34.Raza, S., Jornsgard, B., Abou-Taleb, H., and Christiansen, J.L. 2001. Tolerance of Bradyrhizobium sp. (Lupini) strains to salinity, pH, $CaCO_3$ and antibiotics. Lett. Appl. Microbiol. 32: 379-383.
35.Saleh-Rastin, N., Antoun, H., and Alikhani, H. Evaluation of siderophore production in native rhizobial strains of Iranian soils. J. Soil Water Sci. 2: 177-189.
36.Sameh, H.Y., Fayrouz, H.A.E.M., Amr, A., Zeinat, K.M., Abdelaal, S., and Saleh, A.S. 2014. Phenotypic characteristics and genetic diversity of rhizobia nodulating soybean in Egyptian soils. Eur. J. Soil Biol. 60: 34-43.
37.Santos, J.B., Ferreira, E.A., Kasuya, M.C.M., Silva, A.A., and Procopio, S.O. 2005. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. Crop Prot. 24: 543-547.
38.Shamseldin, A., Nyalwidhe, J., and Werner, D. 2006. A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* strains. Curr. Microbiol. 52: 333-339.
39.Somasegaran, P., and Hoben, H.J. 1994. Handbook for rhizobia: methods in legume-rhizobium technology. Springer-Verlag New York, 455p.

40. Sprent, J.I., and Zahran, H.H. 1988. Infection, development and functioning of nodules under drought and salinity. In: Beck D.P., Materon L.A. (eds) Mediterranean agriculture. Martinus Nijhoff/ Dr.W. Junk, Dordrecht, the Netherlands, Pp: 145-151.
41. Triplett, E.W. 1988. Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum bv trifolii* T24. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85: 3810-3814.
42. Uma, C., Sivagurunathan, P., and Sangeetha, D. 2013. Performance of bradyrhizobial isolates under drought conditions. Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 2: 228-232.
43. Vriezen, J.A.C., De Bruijn, F.J., and Nu¨sslein, K. 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen and temperature. Appl. Env. Microbial. 73: 3451-3459.
44. Wang, Z., Li, S., Shen, W., Chen, X., and Shi, G. 2011. Secretory Expression of *Rhizopus oryzae* a-Amylase in *Kluyveromyces lactis*. Afric. J. Biotechnol. 10: 4190-4196.
45. Yadegari, M., Akbari, Gh.A., Allahdadi, I., Daneshian, J., and Rahmani, H. 2004. Study of inoculation of soybean with different strains of *Bradyrhizobium Japonicum* on nodulation and nitrogen fixation. J. Iran. Crop Sci. 6: 36-52. (In Persian)
46. Zhang, F., Lynch, D.H., and Smith, D.L. 1995. Impact of low root zone temperatures in soybean (*Glycine mux* L. Merr.) on nodulation and nitrogen fixation. Environ. Exp. Bot. 35: 3. 279-285.
47. Zhao, L., Fan, M., Zhang, D., Yang, R., Zhang, F., Xu, L., Wei, X., Shen, Y., and Wei, G. 2014. Distribution and diversity of rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in Northwest China. Systematic and Applied Microbiology. 37: 449-456.
48. Zhu, J.K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R. 1997. Molecular aspects of osmotic stress in plants. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 253-277.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 6(2), 2016
http://ejsms.gau.ac.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Evaluation of phenotypic and growth promotion characteristics of rhizobia isolated from soybean root nodules

F. Tashakori[1], *R. Ghorbani Nasrabadi[2], M. Barani Motlagh[2] and S.A.R. Movahedi Naeeni[3]

[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Associate Prof., Dept. of Soil Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Received: 01/02/2016; Accepted: 05/23/2016

Abstract

Background and Objectives: Nitrogen fixation is a biological process, which provides atmospheric nitrogen in usable form for plants, and satisfies the plants N requirement and can replace chemical nitrogen fertilizers in high proportion. On the other hand, calcareous and soils with high pH have usually small amounts of nutrients in available forms and use of plant growth promoting rhizobacteria can increase the availability of nutrients. Soybean nodulating rhizobia and establishment of their symbiosis is affected by different factors in soil. The objective of this research was to isolate and screen the root nodule rhizobia of soybean and evaluation of their resistance to some stresses and capability production of some growth promotion metabolites and biocontrol agents in selected bacteria.

Materials and Methods: Soybean root nodules have been collected from 21 different fields in various zones of Golestan province, Iran. Root nodules surface sterilization was performed by immersing intact nodules for 30 seconds in 95% alcohol and immediately transferred into 2.5% sodium hypochlorite for 2-3 minutes and finally were rinsed seven times by sterile distilled water. The sterilized nodules were crushed using 1 ml of sterile water in test tube and the slurry was streaked on Yeast Extract Mannitol Agar (YMA) containing Congo red. The inoculated petri plates were incubated at 28 °C for 3-6 days. Plant nodulation test was done with 21 rhizobial isolates under sand condition in pot experiment. The different rhizobial isolates were screened for stresses tolerance (salinity, drought, temperature), herbicide and antibiotics resistance, production of hydrolytic enzymes, siderophore and hydrogen cyanid (HCN).

Results: Nodulation assay showed only 11 of 21 isolated strains formed nodule on soybean roots. Only three of the isolates produced siderophore and none of them showed HCN production capability. The results showed that all the strains tolerated up to 5% NaCl. Evaluation of tolerance to temperatures showed that only isolates No. 2 and 16 were sensitive to 42 °C and the other strains grew well at high temperature. All the isolates were sensitive to tetracycline antibiotic while no inhibitory effect of the chloramphenicol and streptomycin was observed on growth of rhizobial isolates. Between two herbicides Trifluralin showed more inhibitory effect on rhizobial growth than Gallant super. Drought stress imposed by polyethylene glycol affect negatively the rhizobial growth and the severity effect depends on rhzobial isolates and drought levels. Capability of hydrolytic enzymes secretion showed that 14.2, 42.8 and 47.6% of the isolstes produced α-amlyase, cellulose and protease, respectively.

Conclusion: Plant growth promotion characteristics of bacterial isolates, in this research, showed that some of the isolates had the potential to be used as PGPB. Those isolates capable to produce siderophore and protease, amylase and cellulase secretion as well as have the ability to grow under various stresses conditions, could be used as potential isolates in inoculum production to evaluate their nitrogen fixation in soybean–rhizobium symbiosis under pot and field culture.

Keywords: Siderophore, Hydrogen cyanid, Antibiotic, Herbicide, Cellulose

* Corresponding Authors; Email: rgnasr@yahoo.com