نشریه دانش آب و خاک / جلد23 شماره4 صفحه‌های 215 تا 234/ سال 1392

ارزیابی جمعیت و خواص محرک رشدی باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری در نهال‌های پسته

فاطمه حجت‌نوقی [*1]، عبدالرضا اخگر [2]، عیسی اسفندیارپور [3] و کاظم خاوازی [4]

تاریخ دریافت: 91/04/21 تاریخ پذیرش: 91/01/26

[1] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان

[2] استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان

[3] استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه ولی عصر(عج) رفسنجان

[4] استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج

[*] مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: F_hojjat90@yahoo.com

چکیده

در یک آزمون گلخانه‌ای، جمعیت و خواص محرک رشدی باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری نهال‌های پسته، مورد مطالعه قرار گرفت. با گذشت دو ماه از کشت، جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری (R) و غیرریزوسفری (S) تعیین و 33 جدایه اندوریزوسفری، 25 جدایه ریزوسفری و 23 جدایه غیرریزوسفری خالص‌سازی گردید. آنگاه جدایه‌های مذکور از نظر تولید ایندول استیک اسید (IAA) و تثبیت نیتروژن مورد بررسی قرار گرفتند و نیز جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری از نظر توان انحلال تری‌کلسیم فسفات و تولید سیدروفور مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که جمعیت باکتری‌های ریزوسفری (4×10^7)، نسبت به جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری ($3/8 \times 10^5$) و غیرریزوسفری ($1/3 \times 10^6$) بیشتر بود و تأثیر تحریک کنندگی ترشحات ریشه‌ای بر جمعیت باکتری‌ها با استفاده از نسبت R/S ارزیابی گردید و معادل 31 به‌دست آمد. نتایج حاصل از تعیین برخی خصوصیات مهم محرک رشد نیز نشان داد که فراوانی جدایه‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری در تولید ایندول استیک اسید (IAA)، به ترتیب، 48/5، 60 و 47/8 درصد و فراوانی جدایه‌ها در تثبیت نیتروژن، به ترتیب، 27/3، 64 و 17/4 درصد بود و تمامی جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری قادر به انحلال تری‌کلسیم فسفات بودند؛ لیکن جدایه‌های ریزوسفری نسبت به جدایه‌های غیرریزوسفری، توانایی بالاتری در انحلال تری‌کلسیم فسفات نشان دادند. ارزیابی توان تولید سیدروفور نیز نشان داد که 48 درصد از جدایه‌های ریزوسفری و 13درصد از جدایه‌های غیرریزوسفری، قادر به تولید سیدروفور به مقدار اندک می‌باشند. به طور کلی نتایج نشان داد، ترشحات ریزوسفری وبافت درونی گیاه نه تنها بر جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری و ریزوسفری تأثیر گذاشتند بلکه باعث افزایش فراوانی باکتری‌های ریزوسفری واندوریزوسفری محرک رشد گیاه شدند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اندوریزوسفری، پسته، تنوع عملکردی، ریزوسفری، غیرریزوسفری

Evaluation of Population and Properties of PGPB of Endorhizosphere, Rhizosphere and Nonrhizosphere in Pistachio Seedlings

F Hojjat Noughi[*1], AR Akhgar[2], I Esfandiarpour[3] and K Khavazi[4]

Received: 11 July 2012 Accepted: 15 April 2013
[1-] M.Sc. Student, Dept. of Soil Sci. Vali-e-Asr Univ. of Rafsanjan, Iran
[2-]Assist. Prof., Dept. of Soil Sci., Vali-e-Asr Univ. of Rafsanjan, Iran
[3-]Assist. Prof., Dept. of Soil Sci., Vali-e-Asr Univ. of Rafsanjan, Iran
[4-]Assist. Prof., of Soil and Water Research Institute,Karaj, Iran
*Corresponding Author Email: F_hojjat90@yahoo.com

Abstract

A greenhouse study was conducted to compare population and properties of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) of endorhizosphere, rhizosphere and nonrhizosphere in pistachio seedlings. After two months, population densities of theses bacteria were determined and purified 33 endorhizosphere, 25 rhizosphere and 23 nonrhizosphere bacteria. Then all the isolates were investigated for producing Indole Acetic Acid (IAA) and N_2 fixation, and also rhizosphere and nonrhizosphere isolates were considered from tricalcium phosphate dissolving potency and siderophore producing viewpoint. Results showed that the population of the rhizosphere bacteria (4×10^4) was more than the population of endorhizosphere (3.8×10^5) and that of the nonrhizosphere bacteria (1.3×10^6), and stimulating effect of rhizosphere exudates on the bacteria population was evaluated using R/S which was equal to 31. The frequencies of endorhizosphere, rhizosphere and nonrhizosphere bacteria producing IAA were 48.5, 60 and 47.8 % and those of fixing N_2 were 27.3, 64 and 17.4 %, respectively. All of non-rhizosphere bacteria as well as rhizosphere bacteria were able to solubilize inorganic phosphorous. The results also indicated that 48 % of rhizosphere bacteria and 13 % of nonrhizosphere bacteria were able to produce a few amount of siderophore. Generally the results indicated, rhizosphere exudates and inner tissue of plant not only affected the population density of bacteria in the rhizosphere and endorhizosphere, also incresed frequencies of plant growth promoting of rhizosphere and endorhizosphere bacteria.

Keywords: Endorhizosphere bacteria, Functional diversity, Nonrhizosphere, Pistachio, Rhizosphere

مقدمه

ریزوسفر به لایه نازکی (یک تا سه میلی‌متر) از خاک اطراف ریشه گفته می‌شود که موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمّی و کیفی، تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه (نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای) قرار دارند (بون و روویرا 1999). ریشه‌های گیاهان، مقادیر بسیار زیادی

از ترشحات ریشه را به درون ریزوسفر رها می‌کنند که نتیجه آن، افزایش تراکم و فعالیت میکروبی در این ناحیه است. این مواد ترشح‌شده از ریشه‌ها شامل ترکیبات با وزن مولکولی مختلف، مونومرهایی چون گلوکز و اسیدهای آمینه، پلی‌مرهایی مانند پلی-ساکاریدها، پروتئین‌ها، بافت‌های فرسوده و سلول‌های مرده دیواره سلولی ریشه‌ها، یون‌های کربنات و بی-کربنات، دی‌اکسیدکربن و آب می‌باشند (هیوز و همکاران 2003، یورن 2007). خاک، حاوی میکروارگانیسم‌های گوناگونی است که تحت تأثیر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک، دما و پوشش گیاهی هستند (جاه و همکاران 1992). باکتری‌ها از مهمترین میکروارگانیسم‌های موجود در خاک می‌باشند و تعدادشان در خاک‌های حاصلخیز می‌تواند در محدوده 10^6 تا 10^8 سلول در هر گرم خاک تغییر کند. این میکروارگانیسم‌ها نقش مهمی در تجزیه مواد آلی، ساخت و آزادسازی ترکیبات معدنی و قابل استفاده گیاه دارند (ستیادی 1989).

به‌طور کلی، باکتری‌های ریزوسفری که بر رشد و عملکرد گیاه اثر مثبت دارند را به دو گروه عمومی تقسیم می‌کنند. گروه اول، رابطه همزیستی با گیاه ایجاد می‌کنند؛ حال آن‌که گروه دوم، در ظاهر آزادزی هستند؛ ولی اغلب نزدیک ریشه‌ها و یا در سطح و حتی درون آن‌ها دارای ارتباط همیاری با گیاهان می‌باشند (کلوپر و همکاران 1988). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (**PGPR**[1]) همان باکتری‌های آزادزی و مفید خاک هستند که می‌توانند از طریق مکانسیم‌های مختلف باعث افزایش رشد گیاه شوند (دیویسون 1988). این باکتری-ها می‌توانند به‌طور غیرمستقیم و یا مستقیم، رشد گیاه را افزایش دهند. مکانیسم‌های غیرمستقیم شامل تولید آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتری‌های پاتوژن، کاهش یا ممانعت از دسترسی پاتوژن‌های گیاهی به آهن از طریق تولید سیدروفورها در ریزوسفر، تولید و ترشح آنزیم-های لیزکننده دیواره سلولی قارچ‌ها و رقابت با میکروارگانیسم‌های مضر برای کُلُنیزه‌کردن ریشه گیاهان می‌باشند. مکانسیم‌های مستقیم شامل افزایش فسفر قابل دسترس، تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها و کم کردن سطح اتیلن از طریق تولید آنزیم ACC - دِآمیناز و در نتیجه، افزایش تحمل گیاه به تنش‌هایی مانند شوری، خشکی، عناصر سنگین و آفت‌کش‌ها در گیاه می‌باشند (گلیک و همکاران 1999). هم‌چنین، باکتری‌های PGPR می‌توانند با تولید اسیدهای آلی باعث هوادیدگی سنگ‌ها و کانی‌ها شوند و عناصر معدنی مورد نیاز گیاهان از جمله روی، آهن، منگنز و غیره را آزاد کنند و در اختیار آن‌ها قرار دهند (ایلمر و همکاران 1995).

علاوه بر باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، باکتری‌هایی از این نوع وجود دارند که قادرند به-طور اختصاصی به بخش درونی گیاه از جمله بذر و تخمک، میوه، ساقه، ریشه نفوذ کنند و در این مکان‌ها مستقر شوند. این میکروارگانیسم‌ها به‌طور معمول دارای آنزیم‌های حل‌کننده دیواره سلولی برای نفوذ در این اندام‌ها هستند (گرمیدا و همکاران 1998). این باکتری‌ها در داخل گیاه ممکن است در ناحیه ورودشان و یا در سراسر گیاه پخش شوند (هالمان و همکاران 1997). جمعیت باکتری‌های اندوفیت داخل ریشه، بالاتر از جمعیت آن‌ها در سایر اندام‌های گیاه می‌باشد. به‌طور میانگین، جمعیت این باکتری‌ها را در ریشه گیاهان مختلف در حدود 10^5، در ساقه‌ها، حدود 10^4 و در برگ‌ها، حدود 10^3 برآورد کرده‌اند (هالمان و برگ 2006). این باکتری‌های اندوفیتی می‌توانند موجب افزایش مقاومت **سیستمیک** در مقابل بیماری‌های گیاهی یا افزایش رشد گیاه شوند (چانوی 1996).

یکی از مهمترین مکانیسم‌هایی که باکتری‌های PGPR از طریق آن باعث افزایش رشد و نمو گیاه می-شوند، تولید و ترشح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه (به-خصوص اکسین‌ها) می‌باشد. اکسین‌ها گروهی از

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

هورمون‌های گیاهی هستند که ایندول-3- استیک اسید (IAA)، معمول‌ترین و شناخته شده‌ترین آن‌ها است (گلیک 1995). IAA، یکی از فعال‌ترین اکسین‌ها از نظر فیزیولوژی است. ثابت شده است که IAA هم باعث افزایش طول سلول‌های گیاهی و هم باعث تحریک تقسیم سلولی و تمایز در گیاه می‌شود (کلیلند 1990). IAA یک محصول حاصل از متابولیسم ال-تریپتوفان (TRP) می‌باشد که به‌وسیله قارچ‌ها و باکتری‌هایی که قادر به تحریک رشد گیاه هستند تولید می‌شود (لانچ 1985). میکروارگانیسم‌های خاک قادرند پس از اضافه شدن ال-تریپتوفان به خاک، تولید IAA کنند و رشد و نمو گیاه را افزایش دهند (مارتن و فرانکبرگر 1992). مطالعات انجام‌شده نشان داده‌اند که 80 درصد میکروارگانیسم‌های جداشده از ریزوسفر گیاهان مختلف، توانایی تولید IAA به‌عنوان یک متابولیت ثانویه را دارند (لوپر و شروت 1986). IAA تولیدشده توسط باکتری‌های ریزوسفری می‌تواند از طریق افزایش تعداد تارهای کشنده و ریشه‌های فرعی، موجب افزایش رشد گیاه شود (اکون و کاپولنیک 1986). باکتری‌های تثبیت-کننده نیتروژن، گروهی از باکتری‌ها هستند که قادرند با ایجاد ارتباط با گیاهان لگوم و غیرلگوم، نیتروژن را در دسترس گیاه قرار دهند و از این رو، نقش مهمی در حاصلخیزی خاک ایفا نمایند (رائو 1994). هاسن (2003) گزارش کرد که برخی باکتری‌های آزادزی می-توانند از طریق تثبیت بیولوژیک نیتروژن، باعث افزایش دسترسی گیاه به نیتروژن شوند. باکتری‌های آزادزی تثبیت‌کننده نیتروژن نسبت به باکتری‌های همزیست (ریزوبیوم‌ها)، مقدار نیتروژن کمتری را برای گیاه فراهم می‌کنند (شنوی و همکاران 2001). باکتری‌های حل‌کننده فسفات نیز می‌توانند با ترشح اسیدهای آلی، انحلال فسفات‌های نامحلول خاک و دسترسی گیاه به فسفر را افزایش دهند (کیم و همکاران 1997). سیدروفورها ترکیب‌های آلی با وزن مولکولی کم (500 تا 2000 دالتون) میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای تشکیل پیوند با آهن فریک دارند. این مواد توسط سلول‌های میکروبی در شرایط کمبود آهن (کمتر از 10 میکرومول) ترشح و با آهن فریک کمپلکس پایدار تشکیل می‌دهند و آن را به‌صورت ترکیب متحرک و قابل دسترس در می آورند (لئونی و همکاران 2002). برخی باکتری‌های ریزوسفری می‌توانند با تولید سیدروفور، آهن را، به-خصوص در خاک‌های خنثی و قلیایی، در اختیار گیاه قرار دهند و باعث کاهش دسترسی آهن برای پاتوژن‌ها شوند (سوبا رائو 1999). تولید سیدروفور در تعداد زیادی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی اختیاری و قارچ‌ها وجود دارد. غلظت سیدروفورهای باکتریایی بین 4 تا 300 میکرومول و انواع قارچی آن 30 تا 240 میکرومول گزارش شده است (بارتون و هامینگ 1993).

نظر به پتانسیل باکتری‌های مفید ریزوسفری در بهبود و افزایش رشد گیاه و نیز عدم وجود اطلاعات کافی از جمعیت و ترکیب جمعیتی باکتری‌ها در ریزوسفر نهال‌های پسته، برنامه این پژوهش طراحی گردید. هدف از این پژوهش، تعیین جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری و مقایسه جمعیت و خواص محرک رشد مختلف در این سه بخش در ارتباط با نهال‌های پسته بوده است. نتایج این پژوهش می‌تواند میزان تأثیر ترشحات ریشه در جلب باکتری‌های ریزوسفری و نیز باکتری‌های محرک رشد گیاه را مشخص کند و ما را در شناخت هر چه بهتر تنوع جمعیتی باکتری‌های محرک رشد در منطقه ریشه‌ی نهال‌های پسته یاری نماید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک و کشت نهال‌های پسته

به‌منظور تعیین جمعیت و مقایسه باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری از نظر برخی خصوصیات محرک رشد، از یک خاک با بافت متوسط (لوم شنی) استفاده شد. خاک مورد نظر، از یک باغ پسته واقع در شهرستان رفسنجان و در محدوده

سایه‌انداز درخت تهیه گردید. نمونه خاک مزبور، پس از هوا خشک شدن، کوبیدن و الک‌کردن، به یک گلدان 2/5 کیلوگرمی منتقل شد و رطوبت آن به ظرفیت مزرعه رسانده شد. در طول دوره رشد از محلول غذایی هوگلند به‌منظور تامین عناصر غذایی مورد نیاز نهال-های پسته استفاده شد (هوگلند و آرنون، 1950). از شش بذر پسته (رقم بادامی زرند) برای کشت استفاده گردید. بذرها پس از جداسازی پوست سخت، ضد عفونی سطحی شدند. برای ضد عفونی، بذرها به‌مدت 10 دقیقه در محلول 10 درصد (0/5 درصد کلر فعال) هیپوکلریت سدیم نگهداری شدند و 8 تا 10 بار با آب مقطر استریل شست‌وشو گردیدند و به‌مدت 24 ساعت در یک لیتر آب مقطر استریل نگهداری شدند. آنگاه بر روی محیط آب آگار[1] به‌مدت 48 ساعت در دمای 25 درجه سلسیوس درون انکوباتور قرار داده شدند تا جوانه‌دار شوند (حسنی و همکاران 1391). بذرهای جوانه‌دار در خاک گلدان کشت شدند و گلدان برای مدت 2 ماه در شرایط گلخانه نگهداری شد.

تعیین جمعیت و جداسازی باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری

به‌منظور تعیین جمعیت و جداسازی باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری، 10 گرم از ریشه‌ها به همراه خاک ریزوسفری (خاک چسبیده به ریشه‌ها) و همچنین 10 گرم از خاک دور از منطقه ریشه (خاک غیرریزوسفری)، به‌طور جداگانه به یک ارلن 250 میلی-لیتری حاوی 90 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم 0/85 درصد) اضافه شد و برای مدت 20 دقیقه بر روی شیکر با دمای 28 درجه سلسیوس و 110 دور در دقیقه تکان داده شد. سپس، از ارلن مذکور، رقت‌های مختلف (10^{-2} تا 10^{-8}) تهیه شدند و مقدار 0/1 میلی‌لیتر از هر رقت بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت NA[2] پخش گردید. برای تعیین جمعیت و جداسازی باکتری‌های اندوریزوسفری، ابتدا ریشه‌ها با آب مقطر شسته و سپس ضد عفونی سطحی شدند. برای ضد عفونی، ریشه‌ها به مدت یک دقیقه در الکل 96 درصد و همچنین به‌مدت یک دقیقه در محلول 0/1 درصد $HgCl_2$ قرار داده شدند تا باکتری‌های سطح ریشه به‌طور کامل از بین بروند (استارز و همکاران 1998). آنگاه به‌دلیل سمی بودن محلول $HgCl_2$، ریشه‌ها 8 تا 10 بار با آب مقطر استریل شست‌وشو گردیدند و سپس در شرایط استریل، کاملاً له شدند. آنگاه از سوسپانسیون حاصل، رقت‌های مختلف (10^{-2} تا 10^{-8}) تهیه شد و مقدار 0/1 میلی‌لیتر از هر رقت بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت NA پخش گردید. محیط کشت NA تهیه شده حاوی 80 میلی‌گرم بر لیتر قارچ‌کش سیکلوهگزامید استریل‌شده بود تا در شمارش باکتری‌ها خطایی حاصل نشود. سوسپانسیون اولیه حاوی ریشه‌های له‌شده در دمای 70 درجه سلسیوس قرار داده شد تا ریشه‌ها کاملاً خشک گردند و پس از تبخیر شدن آب آن‌ها، ریشه‌های خشک‌شده توزین گردیدند. تعیین وزن خشک ریشه به‌کار رفته این امکان را به‌وجود می‌آورد تا بتوان جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری را به ازای واحد وزن خشک ریشه به‌دست آورد. پس از 48 ساعت از رشد باکتری‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس، جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری با استفاده از روش شمارش کلنی، در سه تکرار تعیین گردید.

پس از تهیه سری رقت و پخش در پلیت‌های حاوی محیط کشت NA و تعیین جمعیت باکتری‌ها، پلیت‌های تلقیح‌شده باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری با رقت‌های به ترتیب 10^{-2}، 10^{-5} و 10^{-3} که محتوی 20 تا 50 کلنی بودند انتخاب شدند و تمامی کلنی‌های رشدیافته در پلیت با چند بار کشت متوالی، خالص‌سازی شدند (33 جدایه

[1] Water agar

[2] Nutrient Agar

اندوریزوسفری، 25 جدایه ریزوسفری و 23 جدایه غیرریزوسفری). پس از حصول اطمینان کامل از خلوص و تا زمان استفاده بعدی، باکتری‌ها بر روی محیط کشت شیب‌دار در یخچال و در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تعیین برخی خصوصیات محرک رشد گیاه در باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری

تنظیم چگالی سوسپانسیون OD[1]

به‌دلیل عدم یکنواختی رشد باکتری‌ها، چگالی سوسپانسیون‌های باکتریایی که برای تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند ابتدا از طریق رقیق‌سازی یا تغلیظ در طول موج 600 نانومتر، OD برابر یک تنظیم گردیدند.

اندازه‌گیری میزان تولید اکسین

بدین منظور، ابتدا جدایه‌ها به‌مدت 24 ساعت در محیط TSB[2] کشت داده شدند. سپس، 50 میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها مجدداً به 20 میلی‌لیتر محیط TSB محتوی 50 میلی‌گرم در میلی‌لیتر ال-تریپتوفان منتقل شد و برای مدت 72 ساعت در 120 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سلسیوس تکان داده شد. این سوسپانسیون‌ها در 10000g به‌مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند و آن‌گاه یک میلی‌لیتر از محلول رویی با 4 میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی[3] (شامل 150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5 میلی‌لیتر کلرید آهن ($FeCl_3.6H_2O$ نیم‌مولار) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به‌مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در طول موج 535 نانومتر قرائت شد. مقدار تولید IAA توسط هر جدایه، از مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه‌شده با غلظت‌های 0، 5، 10، 15، 20 و 30 میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید محاسبه گردید (بنت و همکاران 2000).

آزمون توانایی تثبیت نیتروژن

بدین منظور از محیط بدون نیتروژن رنی[4] (1980) درون لوله (به‌صورت مایع) و همچنین در پلیت (به‌صورت جامد) استفاده شد. این محیط در هر لیتر شامل سوکروز (5 گرم)، مانیتول (5 گرم)، لاکتات سدیم (0/3 گرم)، K_2HPO_4 (0/8 گرم)، KH_2PO_4 (0/2 گرم)، NaCl (0/1 گرم)، $Na_2MoO_4.2H_2O$ (0/025 گرم)، NaFeEDTA (0/028 گرم)، $CaCl_2.2H_2O$ (0/06 گرم)، $MgSO_4.7H_2O$ (0/02 گرم)، بیوتین (0/005 گرم)، PABA[5] (0/01 میلی‌گرم) و آگارنوبل (محیط مایع 1/5 گرم و محیط جامد 15 گرم) بود که در pH=7/2 تنظیم گردید. لازم به ذکر است که برای استفاده از بیوتین و PABA، ابتدا محلول مادر هر کدام از این مواد (0/05 گرم در لیتر برای بیوتین، 0/01 گرم در 100 میلی‌لیتر آب مقطر برای PABA) تهیه شد. سپس از هر محلول مادر، 0/1 میلی‌لیتر به 5 میلی‌لیتر محلول حاوی 0/2 گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$ اضافه گردید. آن‌گاه، به‌وسیله فیلتر کردن با کاغذ صافی با قطر روزنه 0/45 میکرومتر، استریل شد و قبل از پخش در پلیت به محیط کشت اضافه گردید. در مورد آزمون درون لوله، ابتدا محلول حاصل به حجم 20 میلی‌لیتر رسانده شد و پس از استریل کردن با استفاده از فیلتر، به میزان 100 میکرولیتر به هر لوله حاوی 5 میلی‌لیتر محیط اتوکلاوشده اضافه گردید. تلقیح محیط درون لوله‌ها به‌وسیله سوزن پلاتینی آغشته به باکتری و از طریق فرو بردن آن در محیط کشت انجام گرفت. پلیت‌ها و لوله‌ها برای مدت پنج روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. مشاهده رشد باکتری هم در لوله و هم

[1] Optical density
[2] Tryptone Soybean Broth
[3] Salkowski reagent
[4] Rennie
[5] Amino Benzoic Acid

در پلیت، نشان‌دهنده توانایی تثبیت نیتروژن هر جدایه بود.

تعیین برخی خصوصیات محرک رشد گیاه در باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری

تعیین توان انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول

به‌منظور بررسی توان جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، از محیط کشت اسپربر (1985) استفاده گردید. پس از کشت هر جدایه در محیط TSB، مقدار 50 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 25 میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع (شامل گلوکز (10 گرم)، عصاره مخمر (0/5گرم)، $MgSO_4.7H_2O$ (0/32گرم)، $CaCl_2$ (0/14گرم)، $Ca_3(PO_4)_2$ (2/5 گرم)، 1000 میلی‌لیتر آب مقطر و pH =7/2) منتقل شد. نمونه‌ها به‌مدت 120 ساعت بر روی شیکر تکان داده شدند و پس از این مدت، ابتدا pH نمونه‌ها قرائت شد و سپس سوسپانسیون هر باکتری با دور 10000 سانتریفیوژ گردید و 1 میلی‌لیتر از محلول رویی با 3 میلی‌لیتر آب مقطر و 1 میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات-وانادات مخلوط شد. بعد از گذشت 20 دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از اسپکتروفتومتر در 470 نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر آزادشده توسط هر جدایه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده از غلظت-های مختلف KH_2PO_4 محاسبه گردید.

تعیین توانایی تولید سیدروفور

برای تشخیص نیمه‌کمّی توان تولید سیدروفور از محیط کشت CAS-Agar[1] استفاده شد. این محیط کشت بر اساس روش اصلاح شده الکساندر و زوبرا (1991) تهیه شد و به دو روش زیر در پلیت‌ها پخش گردید:

الف) روش سنجش عمومی CAS[2] (کشت مستقیم): به‌منظور بررسی توانایی جدایه‌های گرم منفی، محیط CAS-Agar به مقدار 30 میلی‌لیتر در ظروف پتری استریل پخش شد و پس از انجماد، با تیغ استریل به 4 قسمت مساوی تقسیم شد. سپس سوسپانسیون تازه هر جدایه به مقدار 5 میکرولیتر در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری تلقیح شد. همزمان با تلقیح جدایه‌ها، از سویه‌های PGPR خارجی (GRP_3) و داخلی (P187) به‌عنوان شاهد مثبت (sid^+) در همان محیط کشت تلقیح انجام گرفت. پلیت‌های تلقیح‌شده، در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی‌رنگ تشکیل‌شده در پیرامون کلنی باکتری‌ها، در فواصل زمانی 24، 48، 72 و 96 ساعت ارزیابی شد.

ب) روش تغییر یافته میلاگرس[3] (کشت نیمانیم): این روش که توسط میلاگرس و همکاران (1999) ارایه شده است قادر به تولید سیدروفور توسط قارچ‌ها و باکتری‌هایی می‌باشد که بر روی پلیت‌های حاوی CAS-Agar رشد نمی‌کنند. بدین منظور ابتدا محیط کشت TSA به‌عنوان محیط غذایی مناسب برای رشد باکتری‌ها به مقدار 30 میلی‌لیتر در ظروف پتری استریل پخش گردید. پس از انجماد کامل این محیط، نیمی از این محیط با رعایت شرایط استریل برش داده شد و از ظرف خارج شد. سپس نیمه‌ی خالی با محیط CAS-Agar پر گردید. آن‌گاه از سوسپانسیون تازه جدایه‌های گرم مثبت، به مقدار 5 میکرولیتر نزدیک خط مرزی بین دو محیط، به‌طوری که کلنی روی محیط TSA قرار گیرد، برای تلقیح استفاده شد تا در این‌صورت این جدایه‌ها که به سمیت HDTMA حساس هستند بتوانند رشد نمایند. پلیت‌های تلقیح‌شده، در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور جدایه‌ها از روی تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در محیط CAS-Agar، در فواصل زمانی 24، 48، 72 و 96 ساعت ارزیابی شد.

[1] Universal Chrome Azurol S
[2] Universal Cas Assay
[3] Millagress

تجزیه‌های آماری

پس از تعیین خصوصیات محرک رشد جدایه‌ها در سه تکرار، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح 5 درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری، $3/8 \times 10^5$ سلول به ازای هر گرم وزن ریشه و جمعیت باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری به‌ترتیب، ، 4×10^7 و $1/3 \times 10^6$ سلول به ازای هر گرم خاک بود. همچنین تأثیر ترشحات ریشه‌ای بر جمعیت باکتری‌ها از طریق محاسبه‌ی مقدار R/S تعیین و معادل 31 به‌دست آمد. R/S بالاتر از یک، بدان معنی است که ترشحات ریشه‌ای و ترکیبات قابل دسترس میکروارگانیسم‌ها در ناحیه ریزوسفر در حدی بوده که توانسته باعث افزایش نسبت باکتری‌های ریزوسفری به باکتری‌های غیرریزوسفری شود (بیس و همکاران 2006). همچنین ترشحات ریشه‌ای در ریزوسفر باعث افزایش جمعیت باکتری‌های ریزوسفری نسبت به باکتری‌های اندوریزوسفری نیز شده‌اند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که ترشحات ریشه‌ای شامل سلول‌های فرسوده ریشه، قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه هستند که باعث افزایش جمعیت و فعالیت باکتری‌ها در این ناحیه می‌شوند (برتین و همکاران 2003، بیس و همکاران 2006). کالایگاندی و همکاران (2010) جمعیت ازتوباکتر ریزوسفری و غیرریزوسفری را در یک مزرعه صیفی‌کاری در هند تعیین کردند. آن‌ها نشان دادند که جمعیت ازتوباکتر ریزوسفری از $3/2\times 10^2$ تا $1/1\times10^3$ و جمعیت باکتری-های غیرریزوسفری از $3/1\times10^2$ تا $6/9\times10^2$ سلول به ازای هر گرم خاک متغیر بود. جاکبز و همکاران (1985) و مک سینروی و کلوپر (1995) نیز جمعیت باکتری‌های اندوریزوسفری پنبه و ذرت شیرین را 10^3 تا 10^7، چغندر قند را 10^3 تا 10^6 و سیب‌زمینی و درختان کاج را 10^5 گزارش کردند.

نتایج آزمون تعیین توان تولید اکسین در باکتری‌های اندوریزوسفری نشان داد که 48/5 درصد از باکتری‌های مورد مطالعه، قادر به تولید IAA بودند. جدول 1 مقایسه میانگین تولید IAA باکتری‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بین مقادیر تولید IAA توسط باکتری‌های اندوریزوسفری، تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین مقدار تولید IAA در جدایه S40-PER1 (5/32 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین مقدار در جدایه S26-PER1 (0/28 میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد.

نتایج نشان داد که 60 درصد از باکتری‌های ریزوسفری مورد مطالعه، قادر به تولید IAA در محیط TSB حاوی 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان بودند. جدول 1 مقایسه میانگین تولید IAA باکتری‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بین مقادیر تولید IAA توسط باکتری‌های ریزوسفری تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین مقدار تولید IAA در جدایه S53-PR1 (10/72 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین مقدار در جدایه S23-PR1 (2/43 میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده شد.

در ارتباط با باکتری‌های غیرریزوسفری، نتایج نشان داد که بیش از 47 درصد از باکتری‌های غیرریزوسفری مورد مطالعه، قادر به تولید IAA در محیط TSB حاوی 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان بودند. مقایسه میانگین مقادیر IAA تولیدشده توسط این باکتری‌ها نیز نشان داد که بین مقادیر تولید IAA تفاوت معنی‌داری وجود داشت (جدول 1). بیشترین مقدار تولید در جدایه S11-PS1 (9/05 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین مقدار در جدایه S2-PS1 (0/46 میکروگرم بر میلی‌لیتر) مشاهده گردید. شکل 1 درصد فراوانی باکتری‌های ریزوسفری، اندوریزوسفری و

غیرریزوسفری با مقادیر مختلف تولید IAA را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود تولید IAA در 44 درصد از باکتری‌های ریزوسفری در محدوده‌ی کمتر از 3 میکروگرم بر میلی‌لیتر و 36 درصد در محدوده‌ی بالاتر از 6 میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفت. در حالی‌که اکثر باکتری‌های اندوریزوسفری و غیرریزوسفری به‌ترتیب 91 و 74 درصد در محدوده‌ی کمتر از 3 میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار گرفتند و فراوانی باکتری‌ها با افزایش توان تولید اکسین کاهش یافت.

جدول 2 تجزیه واریانس مربوط به مقادیر تولید IAA توسط جدایه‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری را نشان می‌دهد. همچنین نسبت جدایه‌های دارای توان تولید IAA ریزوسفری به جدایه‌های غیرریزوسفری (R/S) حدود 1/3 بود. فراوانی و توانایی بیشتر جدایه‌های ریزوسفری در تولید IAA را می‌توان به ترشحات ریشه‌ای نسبت داد. باکتری‌ها برای تولید IAA نیاز به ال-تریپتوفان دارند و این ماده در ترشحات ریشه‌ای ناحیه اطراف ریشه نسبت به توده خاک و بافت داخلی گیاه به مقدار خیلی بیشتری وجود دارد. گزارش شده است که 80 درصد از باکتری‌های ریزوسفری، توانایی تولید IAA را دارند که برای تولید آن از ال-تریپتوفان به‌عنوان پیش‌ماده استفاده می‌کنند (اصغر و همکاران 2004).

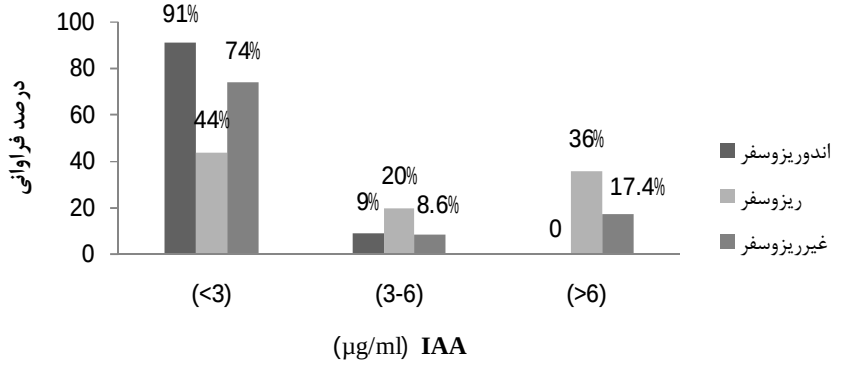
یکی از مهمترین راه‌هایی که باکتری‌ها می‌توانند بر رشد و نمو گیاهان اثر بگذارند، تولید هورمون ایندول-3-استیک اسید (IAA) می‌باشد. این هورمون باعث توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه و به دنبال آن، افزایش جذب عناصر غذایی توسط آن می‌گردد. رجایی و همکاران (1386) توانایی *ازتوباکتر کروکوکوم* جداسازی‌شده از ریزوسفر گندم را در تولید IAA مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند از بین 63 جدایه، 60 جدایه (95 درصد) قادر به تولید IAA بودند. هاسن و همکاران (2003) با پژوهشی بر روی 14 سویه باکتریایی از جمله باکتری‌های *ازتوباکتر وینلاندی* و *باسیلوس سرئوس* نشان دادند که 12 باکتری (86 درصد) قادر به تولید IAA بودند. مودمانی (2005) توانایی انتروباکتر (اندوفیت) جداسازی‌شده از دانه‌های گرده درخت کاج در تولید IAA را مورد بررسی قرار داد و نتیجه گرفت که این باکتری قادر است در حضور غلظت‌های متفاوت ال-تریپتوفان (0، 0/01، 0/1 و 1 میلی‌مول بر لیتر)، به مقدار 9/2، 9/2، 120 و 4/57 میکروگرم بر میلی‌لیتر IAA تولید کند. خاکی‌پور و همکاران (2008) در تحقیقی 50 سویه سودوموناس فلورسنت را از نظر تولید IAA مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند 78 درصد سویه‌ها قادر به تولید IAA بودند. حسنی و همکاران (1391) با پژوهشی بر روی 52 جدایه سودوموناس فلورسنت جداسازی شده از نهال‌های پسته، توانایی جدایه‌ها را در تولید IAA بر روی محیط TSB حاوی 50 میکروگرم بر میلی لیتر ال-تریپتوفان مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند تمامی جدایه‌ها قادر به تولید IAA بودند.

جدول 1- مقایسه میانگین مقادیر IAA تولیدشده توسط باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری.

جدایه‌های اندوریزوسفری	میانگین مقدار تولید اکسین (µg/ml)	جدایه‌های ریزوسفری	میانگین مقدار تولید اکسین (µg/ml)	جدایه‌های غیرریزوسفری	میانگین مقدار تولید اکسین (µg/ml)
S3-PER1	۱/۲۷ bc	S2-PR1	۳/۲۶ gh	S1-PS1	nd
S4-PER1	۰/۷۳ bc	S3-PR1	nd	S2-PS1	۰/۴۶ e
S7-PER1	۰/۲۹ c	S4-PR1	۷/۰۷ c-e	S3-PS1	۱/۰۳ e
S8-PER1	nd	S12-PR1	۸/۵۶ a-d	S4-PS1	۲/۸۹ d
S9-PER1	nd	S13-PR1	nd	S5-PS1	nd
S10-PER1	nd	S14-PR1	nd	S6-PS1	nd
S12-PER1	۰/۵۰ c	S19-PR1	۳/۸۰ gh	S7-PS1	nd
S14-PER1	nd	S20-PR1	۹/۱۹ a-c	S8-PS1	nd
S18-PER1	nd	S22-PR1	nd	S10-PS1	۲/۸۵ d
S19-PER1	nd	S23-PR1	۲/۴۳ g	S11-PS1	۹/۰۵ a
S21-PER1	nd	S24-PR1	۳/۴۶ fg	S13-PS1	nd
S24-PER1	nd	S25-PR1	۸/۳۰ a-d	S14-PS1	nd
S25-PER1	۱/۱۷ bc	S27-PR1	۱۰/۱۷ ab	S15-PS1	nd
S26-PER1	۰/۲۸ c	S29-PR1	۷/۸۴ b-d	S16-PS1	nd
S27-PER1	nd	S31-PR1	۴/۷۵ e-g	S18-PS1	nd
S28-PER1	۰/۴۶ c	S32-PR1	nd	S21-PS1	۸/۰۳ ab
S29-PER1	nd	S33-PR1	۶/۸۸ c-e	S22-PS1	nd
S30-PER1	۴/۴۱ a	S38-PR1	nd	S26-PS1	۴/۲۸ c
S33-PER1	nd	S41-PR1	۵/۸۱ d-f	S28-PS1	۷/۳۷ b
S34-PER1	nd	S46-PR1	nd	S30-PS1	۰/۹۴ e
S35-PER1	nd	S48-PR1	۷/۲۷ c-e	S35-PS1	۳/۶۸ cd
S36-PER1	nd	S50-PR1	nd	S37-PS1	۷/۸۹ b
S39-PER1	۱/۶۲ bc	S52-PR1	nd	S55-PS1	nd
S40-PER1	۵/۳۲ a	S53-PR1	۱۰/۷۲ a		
S41-PER1	۲/۱۲ b	S55-PR1	nd		
S42-PER1	۴/۸۸ a				
S43-PER1	nd				
S45-PER1	nd				
S50-PER1	۱/۰۹ bc				
S51-PER1	۱/۳۸ bc				
S52-PER1	۱/۵۸ bc				
S53-PER1	nd				
S54-PER1	۱/۷۵ bc				

میانگین‌هایی که در یک حرف کوچک مشترک هستند، طبق آزمون دانکن از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشند

nd، کمتر از حد قابل اندازه‌گیری



شکل 1- درصد فراوانی جدایه‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری قادر به تولید IAA.

جدول 2- تجزیه واریانس جدایه‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری در تولید IAA.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تولید IAA	P < F
جدایه اندوریزوسفری	32	118/5565917	< 0/0001 ***
خطا	55	21/4190000	-
CV	-	45/37838	-
جدایه‌های ریزوسفری	24	286/9006133	<0/0001***
خطا	50	64/8412667	-
CV	-	22/16102	-
جدایه‌های غیرریزوسفری	22	456/3491778	<0/0001***
خطا	46	13/1650000	-
CV	-	20/49503	-

***** معنی‌دار بودن در سطح 0/01 را نشان می‌دهد**

نتایج ارزیابی توانایی تثبیت نیتروژن نشان داد که 27/3 درصد از جدایه‌های اندوریزوسفری، 64 درصد جدایه‌های ریزوسفری و 17/4 درصد جدایه‌های غیرریزوسفری، قادر به رشد در محیط کشت بدون نیتروژن رنی و توانا در تثبیت نیتروژن بودند (جدول 3). به‌نظر می‌رسد که دلیل توانایی بیشتر جدایه‌های ریزوسفری در تثبیت نیتروژن نسبت به جدایه‌های اندوریزوسفری و غیرریزوسفری، وجود ترکیباتی مانند هیدرات‌های کربن، قندها و ترکیبات آلی در ترشحات ریشه‌ای ناحیه اطراف ریشه نسبت به توده خاک و بافت داخلی گیاه باشد. بنابراین، بر اساس اصل انتخاب طبیعی، فراوانی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در ناحیه ریزوسفری نسبت به بافت داخلی گیاه و ناحیه غیرریزوسفری بیشتر بود. موچانگ و همکاران (2006) 168 جدایه برتر محرک رشد گیاه را از نظر توانایی تثبیت نیتروژن مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که 56 جدایه قادر به تثبیت نیتروژن بودند. رجایی و همکاران (1386) توانایی باکتری *ازتوباکتر کروکوکوم* را در تثبیت بیولوژیک نیتروژن با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که از میان 63 جدایه، 34 جدایه (54 درصد از جدایه‌ها) قادر به تثبیت نیتروژن مولکولی بودند. بالدانی و همکاران (2000) نشان دادند در گیاه برنج گونه‌های باکتری *بورخولدریا* و *هرباسپیریلیوم* به‌صورت اندوفیت هستند و می‌توانند 31 تا 54 درصد نیتروژن مورد نیاز گیاه را تثبیت کنند. ریمان و همکاران (2007) از سه نوع باکتری دی‌آزوتروف تثبیت‌کننده نیتروژن به منظور تلقیح به گیاه برنج در شرایط غیرغرقاب و غرقاب استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند در شرایط غیرغرقاب بعد از 6 روز تلقیح، باکتری‌ها فقط وزن خشک اندام هوایی و طول ریشه را افزایش دادند؛ اما بعد از 33 روز، مقدار نیتروژن کل نیز در گیاهان برنج تلقیح‌شده با باکتری‌ها افزایش یافت. این در حالی بود که در شرایط غرقاب بعد 6 روز تلقیح، فقط باکتری *سودوموناس* توانسته رشد ریشه‌ها و بعد از 33 روز مقدار نیتروژن کل را افزایش دهد. همچنین نتایج نشان داد که جمعیت *سودوموناس‌ها* نسبت به باکتری‌های دیگر، هم در ریزوسفر و هم در اندوریزوسفر بیشتر بود. در پژوهشی دیگر نیز جمعیت باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در 11 نوع خاک متفاوت بررسی گردید. نتایج نشان دادند که جمعیت باکتری‌ها از 5×10^3 تا $10^7 \times 1/5$ سلول در هر گرم خاک تغییر می‌کرد. همچنین شناسایی باکتری‌ها نشان داد که باکتری‌های *ازتوباکتر*، *ریزوبیوم* و *آزوسپیریلیوم* مهمترین باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در این خاک‌ها بودند (سولیاسی و ویداوتی، 2005).

جدول 3- توان تثبیت نیتروژن توسط باکتری‌های اندوریزوسفری، ریزوسفری و غیرریزوسفری.

جدایه‌های اندوریزوسفری	توانایی تثبیت نیتروژن	جدایه‌های ریزوسفری	توانایی تثبیت نیتروژن	جدایه‌های غیرریزوسفری	توانایی تثبیت نیتروژن
S3-PER1	-	S2-PR1	-	S1-PS1	-
S4-PER1	-	S3-PR1	+	S2-PS1	-
S7-PER1	-	S4-PR1	+	S3-PS1	-
S8-PER1	-	S12-PR1	+	S4-PS1	-
S9-PER1	-	S13-PR1	-	S5-PS1	+
S10-PER1	-	S14-PR1	+	S6-PS1	-
S12-PER1	-	S19-PR1	-	S7-PS1	-
S14-PER1	+	S20-PR1	-	S8-PS1	-
S18-PER1	-	S22-PR1	+	S10-PS1	-
S19-PER1	-	S23-PR1	-	S11-PS1	-
S21-PER1	+	S24-PR1	-	S13-PS1	-
S24-PER1	-	S25-PR1	-	S14-PS1	+
S25-PER1	+	S27-PR1	+	S15-PS1	-
S26-PER1	-	S29-PR1	+	S16-PS1	-
S27-PER1	-	S31-PR1	-	S18-PS1	+
S28-PER1	-	S32-PR1	-	S21-PS1	-
S29-PER1	-	S33-PR1	+	S22-PS1	+
S30-PER1	+	S38-PR1	+	S26-PS1	-
S33-PER1	-	S41-PR1	+	S28-PS1	-
S34-PER1	-	S46-PR1	+	S30-PS1	-
S35-PER1	-	S48-PR1	+	S35-PS1	-
S36-PER1	-	S50-PR1	+	S37-PS1	-
S39-PER1	+	S52-PR1	+	S55-PS1	-
S40-PER1	+	S53-PR1	+		
S41-PER1	-	S55-PR1	+		
S42-PER1	-				
S43-PER1	-				
S45-PER1	-				
S50-PER1	-				
S51-PER1	-				
S52-PER1	+				
S53-PER1	+				
S54-PER1	+				

نتایج حاصل از ارزیابی توانایی جدایه‌های ریزوسفری در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد مطالعه، قادر به انحلال تری‌کلسیم فسفات و آزاد کردن فسفر در محیط مایع اسپربر حاوی 2/5 گرم در لیتر تری کلسیم فسفات بودند. جدول 4 مقایسه میانگین مقادیر فسفر حل‌شده توسط باکتری‌های ریزوسفری را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود بین جدایه‌ها از نظر توانایی حل تری‌کلسیم فسفات، تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین مقدار فسفر حل‌شده در محیط اسپربر در حضور جدایه S33-PR1 (498/95 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین آن در حضور جدایه S13-PR1 (147/61 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود.

مقایسه pH سوسپانسیون جدایه‌های ریزوسفری رشدیافته در محیط اسپربر با شاهد نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به کاهش pH محیط رشد خود بودند. بیشترین کاهش pH در حضور جدایه S4-PR1 مشاهده شد به‌طوری که این کاهش از 5/82 به

3/15 بود و کمترین آن در حضور جدایه S13-PR1 به‌دست آمد. بین pH محیط رشد جدایه‌های ریزوسفری وانحلال تری‌کلسیم فسفات، همبستگی منفی بالا (0/9- =R^2) و معنی‌داری مشاهده گردید (شکل 2).

نتایج حاصل از ارزیابی توانایی جدایه‌های غیرریزوسفری در حل فسفات‌های معدنی نامحلول نیز نشان داد که تمامی جدایه‌های مورد مطالعه، قادر به انحلال تری‌کلسیم فسفات و آزاد کردن فسفر در محیط مایع اسپربر بودند. جدول 4 مقایسه میانگین مقادیر فسفر حل‌شده توسط باکتری‌های غیرریزوسفری را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود بین جدایه‌ها از نظر توانایی حل تری‌کلسیم فسفات، تفاوت معنی‌داری وجود داشت. بیشترین مقدار فسفر حل‌شده در محیط اسپربر در حضور جدایه‌های S4-PS1 و S10-PS1 (497/17 میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین آن در حضور جدایه S6-PS1 (97/64 میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود.

مقایسه pH سوسپانسیون جدایه‌های غیرریزوسفری رشدیافته در محیط اسپربر با pH شاهد نشان داد که pH تمامی سوسپانسیون‌ها در حضور باکتری‌ها کاهش یافت. بیشترین کاهش pH در حضور جدایه S14-PS1 مشاهده شد به‌طوری که این کاهش از 6/92 تا 3/22 بود و کمترین آن در حضور جدایه S6-PS1به‌دست آمد. بین pH محیط رشد جدایه‌های غیرریزوسفری و انحلال تری‌کلسیم فسفات نیز همبستگی منفی بالا (0/98- =R^2) و معنی‌داری مشاهده گردید (شکل 3).

اگرچه تمامی جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری قادر به انحلال تری‌کلسیم فسفات و آزاد کردن فسفر در محیط مایع اسپربر بودند، لیکن فراوانی جدایه‌های ریزوسفری با توانایی بیشتر (600-400 میکروگرم بر میلی‌لیتر) نسبت به فراوانی جدایه‌های غیرریزوسفری، بیشتر بود؛ به‌طوری که فراوانی جدایه‌های ریزوسفری، 68 درصد و فراوانی جدایه‌های غیرریزوسفری، 43/5 درصد بود (شکل‌های 4 و 5).

جدول 5 تجزیه واریانس مربوط به مقادیر انحلال فسفات و مقادیر pH سوسپانسیون توسط جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری را نشان می‌دهند.

موچانگ و همکاران (2006) 168 جدایه PGPR را جداسازی کردند و از نظر حل فسفات‌های معدنی نامحلول مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که 62 جدایه (37 درصد) قادر به حل فسفر هستند. در پژوهشی دیگر جمعیت باکتری‌های حل‌کننده فسفر در 11 نوع خاک متفاوت بررسی گردید. نتایج نشان داد که، جمعیت باکتری‌ها از 5×10^3 تا $7/5\times10^6$ سلول در هر گرم خاک تغییر می‌کرد. همچنین شناسایی باکتری‌ها نشان داد که باکتری‌های *سودوموناس*، *باسیلوس*، *فلاوباکتریوم*، *کلبسیلا* و *انترباکتر* مهمترین باکتری‌های حل‌کننده فسفر در این خاک‌ها بودند (سولیاسی و ویداوتی، 2005). رجایی و همکاران (1386) جدایه‌های *ازتوباکتر* کروکوکوم بومی منطقه چهارمحال و بختیاری را مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها از سه نوع محیط کشت اسپربر، LG، NBRI و BPB استفاده کردند و نشان دادند که این جدایه‌ها فاقد توانایی انحلال فسفات در هر سه محیط کشت بودند. اسپربر (1985) در پژوهشی نشان داد، باکتری‌های *زانتوموناس*، *آرتروباکتر*، *سودوموناس*، *فلاوباکتریوم* و *آکروموباکتر* از مهمترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات‌های معدنی هستند و خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک، نوع پوشش گیاهی، تناوب زراعی و شرایط محیطی بر روی جمعیت آن‌ها تأثیر می‌گذارد. رشید و همکاران (2004) توانایی 10 سویه باکتریایی در حل نمودن تری‌کلسیم فسفات را در محیط مایع بررسی کردند و نتیجه گرفتند که افزایش غلظت فسفر با کاهش pH همراه بود. آن‌ها همچنین نشان دادند که تلقیح سویه‌های باکتری به محیط اسپربر حاوی تری‌کلسیم فسفات باعث کاهش pH

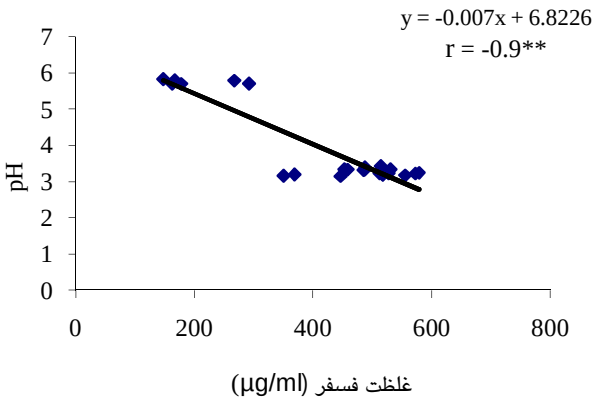
سوسپانسیون از 5/88 تا 3/02 شد. همچنین، همبستگی منفی معنی‌داری (r= -0/4) بین pH و انحلال فسفر به‌دست آمد. ونکاتسورل و همکاران (1984) نیز همبستگی منفی معنی‌داری (r= -0/93) بین pH و حلالیت فسفر به‌دست آوردند. سلطانی و همکاران (1386) 25 جدایه سودوموناس فلورسنت جداسازی‌شده از ریزوسفر گندم را مورد ارزیابی قرار دادند و بیان نمودند که تمامی جدایه‌ها از توان حل فسفات‌های معدنی نامحلول برخوردار بودند. همچنین، همبستگی منفی معنی‌داری (r= -0/71) بین pH و انحلال فسفر به‌دست آوردند.

جدول 4- مقایسه میانگین توان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی نامحلول توسط باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری.

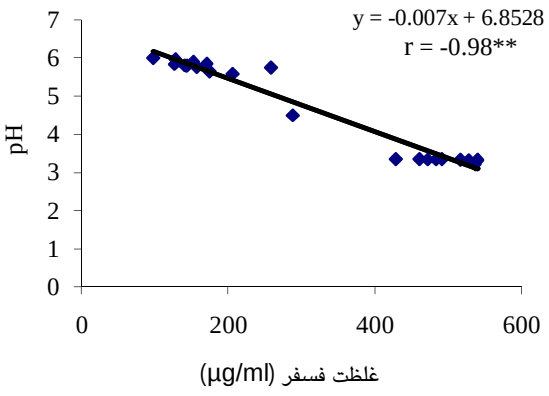
جدایه‌های ریزوسفری	میانگین مقدار فسفر آزادشده (µg/ml)	pH	جدایه‌های غیرریزوسفری	میانگین مقدار فسفر آزادشده (µg/ml)	pH
S2-PR1	۲۹۲/۱۵ gh	۵/۷۰ a	S1-PS1	۱۴۳/۶۱ hi	۵/۸۱ cd
S3-PR1	۴۹۲/۴۱ a-d	۳/۱۹ de	S2-PS1	۱۷۰/۸۰ g-i	۵/۸۶ b-d
S4-PR1	۴۴۶/۱۱ e	۳/۱۵ e	S3-PS1	۲۵۸/۳۷ f	۵/۷۵ de
S12-PR1	۴۹۷/۳۳ a	۳/۲۲ c-e	S4-PS1	۴۹۷/۱۷ a	۳/۳۲ h
S13-PR1	۱۴۷/۶۱ i	۵/۸۲ a	S5-PS1	۱۲۶/۸۲ ij	۵/۸۴ b-d
S14-PR1	۴۹۳/۸۵ a-c	۳/۲۳ c-e	S6-PS1	۹۷/۶۴ j	۶/۰۰ a
S19-PR1	۴۹۰/۷۱ a-e	۳/۴۳ b	S7-PS1	۱۴۳/۲۱ hi	۵/۷۹ c-e
S20-PR1	۴۹۵/۱۶ ab	۳/۳۴ b-d	S8-PS1	۱۲۸/۰۴ ij	۵/۹۷ ab
S22-PR1	۴۹۲/۰۹ a-d	۳/۲۶ c-e	S10-PS1	۴۹۷/۱۷ a	۳/۳۴ h
S23-PR1	۴۵۲/۳۰ de	۳/۳۴ b-d	S11-PS1	۴۶۰/۸۳ de	۳/۳۵ h
S24-PR1	۴۹۵/۳۳ ab	۳/۱۷ de	S13-PS1	۲۸۸/۳۴ f	۴/۵۰ g
S25-PR1	۴۹۲/۳۹ a-d	۳/۲۷ b-e	S14-PS1	۴۹۶/۶۷ a	۳/۲۲ h
S27-PR1	۴۵۸/۰۱ c-e	۳/۳۳ b-e	S15-PS1	۱۵۷/۲۱ hi	۵/۷۶ de
S29-PR1	۳۶۸/۶۵ f	۳/۱۹ de	S16-PS1	۲۰۵/۹۷ g	۵/۵۹ f
S31-PR1	۴۹۱/۵۶ a-d	۳/۱۹ de	S18-PS1	۱۴۰/۴۲ hi	۵/۸۱ cd
S32-PR1	۱۶۲/۴۰ i	۵/۶۹ a	S21-PS1	۴۸۳/۴۵ cd	۳/۳۴ h
S33-PR1	۴۹۸/۹۵ a	۳/۲۴ c-e	S22-PS1	۱۵۲/۳۵ hi	۵/۹۱ a-c
S38-PR1	۴۹۰/۶۱ a-e	۳/۲۳ c-e	S26-PS1	۴۲۸/۹۳ e	۳/۳۵ h
S41-PR1	۳۴۹/۶۹ fg	۳/۱۶ e	S28-PS1	۴۹۱/۸۳ b-d	۳/۳۵ h
S46-PR1	۱۷۷/۶۰ i	۵/۶۹ a	S30-PS1	۱۷۴/۴۰ gh	۵/۶۵ ef
S48-PR1	۴۸۷/۰۹ b-e	۳/۳۴ b-d	S35-PS1	۴۹۵/۳۰ ab	۳/۳۲ h
S50-PR1	۲۶۷/۳۴ h	۵/۷۸ a	S37-PS1	۴۹۳/۸۱ a-c	۳/۳۳ h
S52-PR1	۱۶۷/۲۱ i	۵/۷۹ a	S55-PS1	۴۷۱/۹۵ d	۳/۳۴ h
S53-PR1	۴۸۴/۵۵ b-e	۳/۳۱ b-e			
S55-PR1	۴۸۷/۰۹ b-e	۳/۳۹ bc			

میانگین‌هایی که در یک حرف کوچک مشترک هستند، طبق آزمون دانکن از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشند

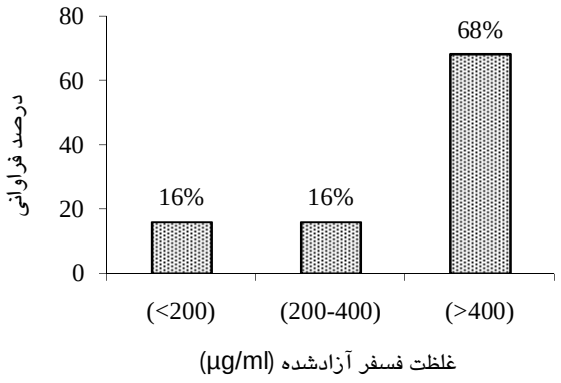
nd، کمتر از حد قابل اندازه‌گیری.



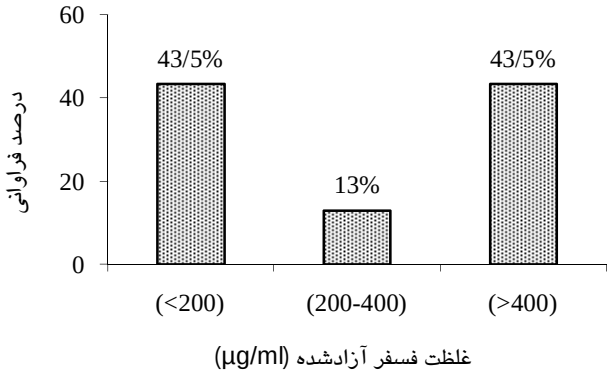
شکل 2- رابطه pH با غلظت فسفر در جدایه‌های ریزوسفری.



شکل 3- رابطه pH با غلظت فسفر در جدایه‌های غیرریزوسفری.



شکل 4- درصد فراوانی جدایه‌های ریزوسفری در حل فسفات-های معدنی نامحلول



شکل 5- درصد فراوانی جدایه‌های غیرریزوسفری در حل فسفات‌های معدنی نامحلول

جدول 5- تجزیه واریانس جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری در حل تری‌کلسیم فسفات.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		حلالیت فسفر	pH	P < F
جدایه‌های ریزوسفری	24	59041/617	3/52821133	<0/0001 ***
خطا	50	67644/640	0/38986667	-
CV	-	8/665921	2/288737	-
جدایه‌های غیرریزوسفری	22	91340/122	4/6252437	<0/0001***
خطا	46	25738/947	0/2701333	-
CV	-	7/570779	1/639416	-

*** معنی‌دار بودن در سطح 0/01 را نشان می‌دهد

به‌منظور بررسی توان تولید سیدروفور در جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری، ابتدا آزمون واکنش گرم بر روی باکتری‌ها انجام گرفت و باکتری‌ها به دو دسته گرم منفی و گرم مثبت تفکیک شدند. 32 درصد جدایه‌های ریزوسفری و 8/7 درصد جدایه‌های غیرریزوسفری، از نوع گرم منفی بودند که به روش کشت مستقیم و مابقی جدایه‌ها که گرم مثبت بودند به روش کشت نیمانیم تلقیح شدند و توانایی آن‌ها در تولید سیدروفور مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد 48 درصد از جدایه‌های ریزوسفری و 13 درصد از جدایه‌های غیرریزوسفری در محیط جامد CAS-Agar قادر به تولید سیدروفور بودند. جدول‌های 6 و 7 به ترتیب مقایسه میانگین مقادیر تولید سیدروفور توسط جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری را نشان می-دهند. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین مقدار تولید سیدروفور در جدایه‌های ریزوسفری توسط جدایه S4-PR1 (1/35 سانتی‌متر پس از 24 ساعت) و در جدایه‌های غیرریزوسفری توسط جدایه S14-PS1 (1/28 سانتی‌متر پس از 48 ساعت) بود و کمترین مقدار تولید در جدایه‌های ریزوسفری در حضور جدایه S14-PR1 (1/00 سانتی‌متر پس از 24 ساعت) و در جدایه‌های غیرریزوسفری در حضور جدایه‌های S14-PS1 و S15-PS1 (1/00 سانتی‌متر پس از 24 و 96 ساعت) بود. جدول‌های 8 و 9 به ترتیب تجزیه واریانس مربوط جدایه‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری را نشان می-دهند.

علیخانی و همکاران (1382) توان سویه‌های ریزوبیومی خاک‌های ایران در تولید سیدروفور را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها با استفاده از محیط کشت جامد کرم آزورل S (CAS- آگار) و با استفاده از روش قطره‌گذاری، سویه‌ها را مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش آن‌ها نسبت قطر هاله نارنجی اطراف کلنی به قطر کلنی را اندازه‌گیری نمودند و به عنوان معیاری از توان تولید سیدروفور سویه‌ها در نظر گرفتند. آن‌ها نشان دادند 86 درصد سویه‌های ریزوبیومی قادر به تولید سیدروفور بودند. سویه‌های مزوریزوبیوم *سیسری* بیشترین (77/3 درصد) تعداد و سویه‌های *سینوریزوبیوم ملیلوتی* کمترین (7 درصد) تعداد توان تولید سیدروفور را داشتند. رسولی‌صدقیانی و همکاران (1385) توان سویه‌های *سودوموناس‌های فلورسنت* جداسازی شده از ریزوسفر گندم را از نظر توانایی‌شان در تولید سیدروفور مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها نشان دادند که تمام سویه‌های *سودوموناس فلورسنت* در محیط جامد (CAS-آگار) قادر به تولید سیدروفور بودند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده، به‌نظر می‌رسد که ترشحات ریشه‌ای موجود در ناحیه ریزوسفری و بافت درونی گیاه، نه تنها بر جمعیت باکتری‌های ریزوسفری و اندوریزوسفری تأثیر گذاشته‌اند، بلکه بر توانایی باکتری‌ها در تولید برخی خواص محرک رشد که در پژوهش حاضر مورد مطالعه قرار گرفتند، نیز تأثیرگذار بوده‌است.

جدول 6- مقایسه میانگین مقادیر سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌های ریزوسفری.

جدایه‌های ریزوسفری	میانگین قطر هاله به قطر کلنی		آزمون Gram
	24 ساعت	48 ساعت	
S3-PR1	1/18a-c	1/06 bc	+
S4-PR1	1/35a	1/14 b	-
S12-PR1	1/28a-c	1/12 bc	+
S14-PR1	1/00f	1/28 a	-
S22-PR1	1/25 a-d	1/11 bc	-
S25-PR1	1/24 a-e	1/06 bc	+
S27-PR1	1/22 b-e	1/13 b	-
S31-PR1	1/23 a-e	1/13 b	-
S33-PR1	1/33 e	1/11 bc	+
S38-PR1	1/16 c-e	1/11 bc	+
S41-PR1	1/30 ab	1/11 bc	+
S55-PR1	1/16 de	1/04 c	-

میانگین‌هایی که در یک حرف کوچک مشترک هستند، طبق آزمون دانکن از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشند.

جدول 7- مقایسه میانگین مقادیر سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌های غیرریزوسفری.

جدایه‌های غیرریزوسفری	میانگین قطر هاله به قطر کلنی				آزمون Gram
	24 ساعت	48ساعت	72ساعت	96ساعت	
S13-PS1	1/16 c	1/07 c	1/08 c	1/07 cd	+
S14-PS1	1/00 d	1/28 b	1/16 c	1/15 c	+
S15-PS1	1/10 cd	1/04 c	1/04 c	1/00 d	+
GRP_3	1/49 b	2/23 a	2/62 a	2/51 a	-
P187	2/26 a	2/25 a	1/95 b	1/80 b	-

میانگین‌هایی که در یک حرف کوچک مشترک هستند، طبق آزمون دانکن از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشند.

جدول 8- تجزیه واریانس جدایه‌های ریزوسفری در تولید سیدروفور .

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تولید سیدروفور	P < F
جدایه‌های تولید کننده پس از24 ساعت	11	0/02606869	< 0/0001***
خطا	24	0/00381667	-
CV	-	5/068483	-
جدایه‌های تولید کننده پس از 48 ساعت	11	0/01045126	<0/0003***
خطا	24	0/00196944	-
CV	-	3/949625	-
جدایه‌های تولید کننده پس از 72 ساعت	11	0/00157854	<0/246
خطا	24	0/00114722	-
CV	-	3/038485	-
جدایه‌های تولید کننده پس از 96 ساعت	11	0/00179066	<0/070
خطا	24	0/00072222	-
CV	-	2/468668	-

*** **معنی‌دار بودن در سطح 0/01 را نشان می‌دهد**

جدول 9- تجزیه واریانس جدایه‌های غیرریزوسفری در تولید سیدروفور.

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تولید سیدروفور	P < F
جدایه‌های تولید کننده پس از24 ساعت	4	0/80006667	< 0/0001***
خطا	10	0/00674667	-
CV	-	5/85371	-
جدایه‌های تولید کننده پس از 48 ساعت	4	1/12719333	< 0/0001***
خطا	10	0/00556667	-
CV	-	4/728143	-
جدایه‌های تولید کننده پس از 72 ساعت	4	1/44675667	< 0/0001***
خطا	10	0/00685333	-
CV	-	5/252847	-
جدایه‌های تولید کننده پس از 96 ساعت	4	1/24695667	< 0/0001***
خطا	10	0/00596667	-
CV	-	5/124560	-

*** **معنی‌دار بودن در سطح 0/01 را نشان می‌دهد.**

منابع مورد استفاده

حسنی گ، اخگر ا و تاج‌آبادی ا، 1391. بررسی تأثیر تلقیح سویه‌های سودوموناس فلورسنت دارای توان تولید IAA و ACC دآمیناز بر رشد نهال‌های پسته. مجله پژوهش‌های خاک و آب. جلد 26، شماره 1. صفحه‌های 89 تا 97.

رجایی س، رئیسی ف و علیخانی حع، 1386. ارزیابی توانایی برخی از جدایه‌های Azotobacter chroococcum بومی خاک‌های استان چهار محال بختیاری در تولید مواد محرک رشد گیاه. مجله علم کشاورزی. جلد 30، شماره 4. صفحه‌های 33 تا 47.

رسولی صدقیانی مح، خاوازی ک، رحیمیان ح و ملکوتی مج و اسدی رحمانی ه، 1385. ارزیابی توان سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور. مجله علوم خاک و آب، جلد 20، شماره 1. صفحه‌های 133تا 143.

سلطانی طولارور ع‌ا، صالح راستین ن، خاوازی ک، اسدی رحمانی ه و عباس‌زاده دهجی پ، 1386. جداسازی و بررسی صفات محرک رشد گیاهی (PGP) برخی از سودوموناس‌های فلورسنت بومی خاک‌های ایران. جلد 21، شماره 2. صفحه‌های 277 تا 289.

علیخانی حع، صالح‌راستین ن و آنتون ه، 1382. ارزیابی توان تولید سیدروفور در سویه‌های ریزوبیومی بومی خاک‌های ایران. مجله علوم خاک و آب، جلد 17، شماره 1. صفحه‌های 187 تا 200. 133تا 143.

Alexander DB, and Zuberer DA, 1991. Use of chrome azurol Sreagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biol Fertil Soils 2:39-4.

Asghar HN, Zahir ZA and Arshd M, 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yeild and oil content of canola(Brassica nappus L.). Aust J Agr Res 55:187-194.

Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S and Vivanco JM, 2006. The role of root exudates in rhizosphere interations with plants and other organisms. Annu Rev Plant Biol 57:233-266.

Baldani VLD, Baldani JI and Dobereiner J, 2000. Inocolation of rice plants with the endophytic diazotrophs Herbaspirillum seropedicae and Burkholderia spp. Biol Fertil Soils 30:485-491.

Barton LL and Hemming BC, 1993. Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms. Acamemic Press, San Diego, USA.

Bent E, Tuzan S, Chanway CP and Enebak S, 2000. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgeple pines inoculatied with rhizobacteria. Can J Microbiol 47:793-800.

Bertin C, Yang X and Weston LA, 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant Soil 256:67-83.

Boven GD and Rovira AD, 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. Adv Agron 66:1-102.

Chanway CP, 1996. Endophytes: They're not just fungi. Can J Biol 74:321-322.

Cleland RE, 1990. Auxin and cell elongation. Pp:132-148. In: Davies, PJ (eds.). Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Davison J, 1988. Plant beneficial bacteria. Biotechnology 6:282-286.

Germida JJ, Siciliano SD, De Freitas R and Seib AM, 1998. Diversity of root- associated bacteria associated with field-grown canola (Brassica nupus L.) and wheat (Triticum aestivum L.). FEMS Microbiol Ecol 26:43-50.

Glick BR, 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can J Microbiol 41:109-117.

Glick BR, Patten CL, Holguin G and Penrose DM, 1999. Biochemical and Genetic Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting Bacteria. Imperial College Press, London, UK.

Hallmann J, Quadt- Hallmann A, Mahafee WF and Kloepper JW, 1997. Bacterial endophytesin agricultural crops J Microbial 43:895-914.

Hallmann, J. and G. Berg. 2006. Spectrum andpopulation dynamics of bacterial root endophytes. Soil Biol 9:5-3.

Hawes MC, Bengough G, Cassab G and Ponce G, 2003. Root caps and rhizosphere. J Plant Growth Regul 21:352-367.

Hoagland DR and Arnon DI, 1950. The water-culture method for growing plants without soil. College of Agriculture, Univ of Cal Berkeley, Cal. Cicrcular 347.

Husen E, 2003. Screening of soil bacteria for plant growth promotion activities in vitro. Indonesian j Agr Sc.:27-31.

Illmer P, Barbato A and Schinner F, 1995. Solubilization of hardy soluble $AlPO_4$ with P- solubilizing microorganisms. Soil Biol Biochem 27:265-270.

Jacobs M J, Bugbee WM and Gabrielson DA, 1985. Enumeration, location and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. Can J Bot 63:1262-1265.

Jha DK, Sharma GD and Mishara RR, 1992. Ecology of soil microflora and mycorrhizal symbionts. Biol Fertil Soils 12:72-278.

Kalaigandhi V, Kannapiran E, Michael A, Sivakumar T and Thirumalai V, 2010. Azotobacter population in rhizosphere and non- rhizosphere sediments of Tondi coast. International J Biol Tech 1:63-65.

Khakipour N, Khavazi K, Majallali H, Pazira E and Asadirahmani H, 2008. Production of Auxin Hormone by fluorescent Pseudomonas. American-Eurasion J Agric Environ Sci 4(6):678-692.

Kim KY, McDonald GA and Jordan D, 1997. Solubilization of hydroxyapatite by Enterobacter agglomerans and cloned Escherichia in culture medium. Biol Fertill Soils 24:347-352.

Kloeeper JW, Lifshitz R and Schroth MN, 1988. Psueduomonas inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci Anim Plant Sci Pp:60-64.

Leoni L, Ambrosi C, Petrucca A and Visca P, 2002. Transcriptional regulation of Pseudobactin synthesis in the plant growth- promoting pseudomonas Bio FEMS Microbiol Let 208:219-255.

Loper JE and Schroth MN, 1986. Influence of bacterial sources of indole- 2- acetic acid on root elongation of sugar beet. Phytopathol 76:386-389.

Lynch JM, 1985. Origin, nature and biological activity of aliphatic substances and growth hormones found in soil. In: Vaughan and R. E. Malcom (eds.). Soil Organic Matter and Biological Activity. D. Martinus Nijhoff. Dr. W. Junk Publishers. Dordrecht, Boston, Lancaster.

Martens DA and Frankenberger WT, 1992. Stability of microbia- produce auxins derived from L- tryptophan adoded to soil. Plant and Soil 263-270.

Mc cinroy JA and Kloepper JW, 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant and Soil 173:337-342.

Meunchang S, Thongra P, Sanoh S, Kaewsuralikhit S and Ando S, 2006. Development of rhizobacteria as a biofertilizer for rice production. Pp. 6- 20. International workshop on Sustained Management of the Soi- Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use. Bangkok, Thailand.

Milagres AMF, Machuca A and Napoleao D, 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. J Microbiol Methods 37:1-6.

Modmony A,Chernin L, Pleban S, Peleg and Riov J, 2005. Enterobacter cloacae, an obligatory endophyte of pollen grains of Mediterranean pines. Folia Microbiol 50(3): 209-216.

Okon Y and Kapulnik Y, 1986. Development and function of Azospirillum- inoculated roots . Plant and Soil 90:3-16.

Raimam M P, Albino U, Cruz M F and Lavato G M, 2007. Interaction among free- living N- fixing bacteria isolated from Drosera villosa Var. villosa and AM fungi (Glomus clarum) in rice (oryza sativa). Appl Soil Ecol 35:25-34.

Rao NSS, 1994. Microorganism. Tanah Dan Fertumbuhan Tanaman. Edisi ke 2. Universitas Indonesia.

Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S and Latif F, 2004. Organic acids productions by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pak J Biol Sci 7(2):187-196.

Rennie RJ, 1980. A single medium for the isolation of ecetylene-reducting (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. Can Microbiol 27:8-14.

Setiadi, 1989. Utilization of microorganisms in the forest. Bogor Agricultural Institut.

Shenoy VV, Kalagudi GM and Gurudatta BV, 2001. Nitrogen autotrophic rice. Curr Sci 81:451- 457.

Sperber JI, 1985. Incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. Aust J Agr Res 9:778-781.

Sturz AV, Christie BR and Matheson BG, 1998. Associations of bacterial endophyte populations from read clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. Can J Microbiol 44:162-167.

Subba Rao NS, 1999. Soil Microbiology (Fourth edition of soil micro organisms and plant growth). Science Publishers, Inc. New Hamspire, USA.

Suliasih S and Widawaiti R I, 2005. Isolation and identification of phosphate solubilizing and nitrogen fixing bacteria from soil in Wamena Biological Garden, Jayawijaya, Papua. Biodirersitas. 6(5):137-153.

Uren NC, 2007. Types, amounts and possible functions of compounds released in to rhizosphere by soil- grown plants. Pp:1-21. In: R Pinton, Z. Varanini and P. Nannipieri(eds.). The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil- plant Interface. Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL.

Venkateswarlu B, Rao A, Raina P and Ahmad N, 1984. Evaluation of phosphate solubilization by microorganisms isolated from aridisols. J. Indian. Soc Soil Sci 32:273-277.