

## The Effect of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Producing ACC-Deaminase, IAA, Siderophore and Phosphate Solubilization on Growth Indices, Chlorophyll, Proline and Protein in Alfalfa at Different Levels of Salinity

Seyed Hassan Tafaraji<sup>1</sup>, Ali Abtahi<sup>2\*</sup>, Mojtaba Jafari Nia<sup>3</sup>, Mehdi Ebadi<sup>4</sup>

- 1- Ph.D. Student of Soil Science, Department of Soil Science, Faculty Agriculture, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
- 2- Professor, Department of Soil Science, Faculty Agriculture, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran (seyedaliabtahi@yahoo.com)
- 3- Assistant Professor, Department of Biology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Larestan Branch, Islamic Azad University, Larestan, Iran

**Citation:** Tafaraji, S. H., Abtahi, A., Jafari Nia, M., & Ebadi, M. (2022). The effect of plant growth-promoting rhizobacteria producing ACC-deaminase, IAA, siderophore and phosphate solubilization on growth indices, chlorophyll, proline and protein in alfalfa at different levels of salinity. *Plant Productions*, 45(3), 375-384.

### Abstract

#### Introduction

Agriculture practices involve the extensive utilization of chemical fertilizers that lead to several impacts, namely groundwater pollution, eutrophication, and production of greenhouse gases. These ultimately lead to environmental pollution and pose several health risks. With this respect, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) consist of a diverse collection of rhizobacteria that occur in the rhizospheric zone and interact with plant roots. Moreover plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) are a heterogeneous group of bacteria found in the rhizosphere, associated with roots and root surfaces or living freely in the soil and influencing plant growth directly or indirectly. A large number of bacteria is reported to contribute to plant growth, including species of *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Burkholderia*, *Bacillus*, and *Serratia*. Additionally, several reports indicate the application of ACC-deaminase-producing PGPR in facilitating plant growth and inducing tolerance in various abiotic stresses, namely (1) salt stress, (2) drought stress, (3) heat stress, (4) chilling stress, etc. The present study was performed to screen PGPR strains with different PGP traits in calcareous soils under salinity condition and to use such PGPR strains as biological inoculation.

---

\* **Corresponding Author:** Ali Abtahi  
**E-mail:** seyedaliabtahi@yahoo.com



### Materials and Methods

In this study, 45 rhizospheric soil samples were collected from different crops in agricultural farms and placed in plastic bags, and transported to a laboratory, where it was refrigerated at 4 ° C until further use. To obtain a solution of  $10^{-4}$  to  $10^{-6}$  dilutions, one milliliter of suspension was serially diluted and 100 microliters of this suspension solution were spread onto the sterile nutrient agar medium. plates were incubated at  $28\pm 2^{\circ}\text{C}$  for 48 hours in a BOD incubator. Rhizobacterial isolates with a different morphological appearance and fast growth on agar plates were randomly selected and purified by repetitive streaking on the fresh medium. After purification, these PGPR isolates were screened for PGP traits. Isolates with phosphate solubilization, siderophore production, IAA production and ACC-deaminase production were screened and finally three isolates were selected for molecular identification and pot experiments.

### Results and Discussion

In this research, a total of 45 rhizospheric soil samples were collected from the rhizosphere of different plants. 181 isolates were purified and isolated. In the initial screening, some of them were characterized by phosphate solubilization, siderophore production and indole acetic acid (IAA) production. In the secondary screening, superior isolates were selected in these three growth-promoting traits, and in the ACC-deaminase production test, all three isolates were able to produce this enzyme. Molecular identification of the isolates was performed by 16S rRNA gene sequencing technique and the isolates belonged to *Bacillus Cereus*, *Pseudomonas Syringae* and *Pseudomonas Alcaliphila* which were registered in the NCBI database. In greenhouse experiments, inoculation of *Pseudomonas Alcaliphila* showed the best performance shoot length, shoot dry weight, chlorophyll production, crude protein production of alfalfa (*medicago sativa* L.) and lowest proline production under salinity stress, while inoculation of *Pseudomonas Syringae* had better yield at root length and root dry weight.

### Conclusion

Extremely cost-effective methods such as applications of microorganisms with PGPR activities can enhance plant growth, speed up seed germination, improve seedling emergence, and protect plants. In conclusion, the applied plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) bacterial SF1050 strain (*Pseudomonas Alcaliphila*) proved to be a potential candidate for improving alfalfa crops in salinity conditions. Nevertheless, it is suggested to validate the current results by conducting field trials.

**Keywords:** ACC-deaminase, Alfalfa, PGP-trait, PGPR, Salinity

## تأثیر باکتری‌های محرک رشد تولیدکننده ACC - دآمیناز، IAA، سیدروفور و حل‌کننده فسفات بر شاخص‌های رشد، کلروفیل، پرولین و پروتئین یونجه در سطوح مختلف شوری

سید حسن نفرجی<sup>۱</sup>، علی ابطحی<sup>۲\*</sup>، مجتبی جعفری نیا<sup>۳</sup>، مهدی عبادی<sup>۴</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری خاک‌شناسی، گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
- ۲- استاد، گروه خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
- ۳- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران
- ۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد لارستان، دانشگاه آزاد اسلامی، لارستان، ایران

### چکیده

باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) گروه وسیعی از باکتری‌ها را شامل می‌شود که می‌توانند به‌طور مستقیم و یا غیرمستقیم، کمیت و کیفیت رشد گیاه را بهبود بخشند. این پژوهش به منظور غربالگری سویه‌های PGPR با صفات مختلف محرک رشد در خاک‌های آهکی و استفاده از این سویه‌های PGPR به‌عنوان تلقیح بیولوژیکی یونجه انجام شد. در این راستا در پاییز ۱۳۹۹ در مجموع ۴۵ نمونه خاک آهکی از ناحیه ریزوسفری گیاهان مختلف در جنوب استان فارس برداشت شد. تعداد ۱۸۱ جدایه، جداسازی شدند. در غربالگری اولیه تعدادی از آن‌ها دارای خصوصیت انحلال فسفات، تولید سیدروفور و تولید ایندول استیک اسید (IAA) بودند. در غربالگری ثانویه، جدایه‌های برتر در این سه خصوصیت محرک رشدی انتخاب شدند و جدایه SF1038 در انحلال فسفر، جدایه SF1092 در تولید سیدروفور و جدایه SF1050 در تولید IAA به‌عنوان جدایه برتر انتخاب گردیدند. در آزمون تولید ACC-دآمیناز، هر سه جدایه برتر توانستند این آنزیم را تولید کنند. شناسایی مولکولی جدایه‌ها، از طریق تکنیک توالی یابی ژن 16S rRNA صورت گرفت و جدایه‌های SF1038، SF1050 و SF1092 به ترتیب متعلق به گونه‌های *Bacillus Cereus*، *Pseudomonas Syringae* و *Pseudomonas Alcaliphila* بودند که در پایگاه NCBI ثبت گردیدند. در آزمایشات گلخانه‌ای مشخص گردید، تلقیح باکتری *Pseudomonas Alcaliphila* بهترین عملکرد را در طول اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، تولید کلروفیل، تولید پروتئین خام یونجه (*medicago sativa* L.) و کمترین تولید پرولین را تحت تنش شوری نشان داد، در حالی که تلقیح باکتری *Pseudomonas Syringae* عملکرد بهتری را در طول و وزن خشک ریشه داشت. گرچه تلقیح باکتری *Bacillus Cereus* باعث افزایش در شاخص‌های رشد و پارامترهای بیوشیمیایی نسبت به شاهد گردید، اما از دو جدایه برتر دیگر عملکرد ضعیفتری داشت. تلقیح با *Pseudomonas Alcaliphila* میزان کلروفیل کل معادل ۱۰/۲۳ میلی‌گرم بر گرم را به ثبت رساند که افزایش ۱۳ درصدی را نسبت به شاهد در شوری ۲ dS m<sup>-1</sup> داشته است. در مورد تولید پرولین تیمار شاهد در شوری ۷ dS m<sup>-1</sup> با میانگین ۱/۱۷۷ میکرومول بر گرم بیشترین، و تیمار تلقیح‌شده با *Pseudomonas Alcaliphila* در شوری ۲ dS m<sup>-1</sup> با تولید ۰/۱۷۳ میکرومول بر گرم کمترین پرولین را تولید نموده است. همچنین تولید پروتئین خام در تیمارهای تلقیح‌شده با *Pseudomonas Alcaliphila* و *Pseudomonas Syringae* در شوری ۲ dS m<sup>-1</sup> به ترتیب با ۱۳/۹۴ و ۱۳/۸۷ میلی‌گرم بر گرم بهترین عملکرد را داشته‌اند و اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ درصد ندارند. در همه تیمارهای باکتریایی، با افزایش شوری از ۲ به ۷ دسی‌زیمنس بر متر، در همه شاخص‌های رشد کاهش معنی‌دار رخ داده است، اما تلقیح با باکتری‌های PGPR سبب افزایش شاخص‌های رشد و پارامترهای بیوشیمیایی نسبت به شاهد در شرایط شوری بیشتر شده است. به این ترتیب، می‌توان نتیجه گرفت، سویه *Pseudomonas Alcaliphila* می‌تواند برای بهره‌برداری به‌عنوان یک تلقیح زیستی یا کود زیستی در خاک‌های آهکی و تحت تنش شوری استفاده شود تا بهره‌وری بهتر و بویایی اکولوژیکی را فراهم نماید.

کلیدواژه‌ها: خصوصیات محرک رشد، شوری، یونجه، ACC-دآمیناز، PGPR

\* نویسنده مسئول: علی ابطحی  
seyedaliabtahi@yahoo.com  
رایانامه:

## مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) مجموعه متنوعی از باکتری‌ها شامل گونه‌های سودوموناس، آزوسپیریلوم، آروتوباکتر، کلیسیلا، انتروتوباکتر، اسپینتوباکتر، آکالیژنز، آرتروباکتر، بورخلدربا، باسیلوس و سراتیا هستند که در ناحیه ریزوسفری وجود دارند و به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم بر رشد گیاه تأثیر می‌گذارند (Ahmad et al., 2008). همچنین با مکانیسم‌های مختلف از جمله تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، بیوسنتز فیتوهورمون‌ها، حل شدن عناصر غذایی معدنی و افزایش مقاومت گیاه میزبان در برابر عوامل استرس‌زا رشد گیاه را افزایش می‌دهد (Ahmad & Kibret, 2014). فسفر غیرقابل دسترس، می‌تواند توسط چندین باکتری حل‌کننده فسفات به اشکال در دسترس و قابل جذب تبدیل شود (Gyaneshwar et al., 2002). تحقیقات (Acevedo et al., 2014) نشان داده است که ظرفیت انحلال بسیاری از جدایه‌های باکتریایی، به‌دلیل آزادسازی اسیدهای آلی توسط آنها و کاهش pH مرتبط است. ضمناً در خاک‌های آهکی به دلیل pH بالا و میزان کربنات کلسیم زیاد، مقدار آهن قابل جذب پایین است (Karami et al., 2020) و سیدروفورها به‌عنوان عوامل حل‌کننده آهن نقش ایفا می‌کنند، بطوری که با  $Fe^{+3}$  روی غشای باکتریایی کمپلکس می‌سازند، سپس آن را به  $Fe^{+2}$  احیا می‌کنند و آن را برای گیاهان تحت شرایط کمبود آهن، در دسترس قرار می‌دهند (Indiragandhi et al., 2008). باکتری‌های تولیدکننده ACC-دآمیناز از ACC (آمینوسیکلو پروپان کربوکسیلات) به‌عنوان منبع نیتروژن و انرژی استفاده می‌کنند و آن را به آمونیاک و  $\alpha$ -کتوتوئیرات تبدیل می‌کنند تا از تجمع اتیلن جلوگیری کند (Khan & Singh, 2021) و سیستم ریشه را برای مقابله با استرس‌های محیطی تقویت کند (Murali et al., 2021). از طرف دیگر تنش حرارتی باعث گلدھی سریع‌تر گیاه می‌گردد و سبب کاهش پروتئین خام می‌گردد (Nekoyanfar et al., 2017). باکتری‌هایی که ویژگی تولید IAA (ایندول استیک اسید) و فعالیت ACC-دآمیناز بالا دارند، به‌عنوان PGPR مؤثر در نظر گرفته می‌شوند (Cavite et al., 2021a). خوشبختانه، در سال‌های اخیر، استفاده از PGPR برای کشاورزی پایدار به‌طور گسترده‌ای افزایش یافته است و به‌طور قابل توجهی رشد و عملکرد محصولات را افزایش داده است. مطالعه حاضر به منظور غربالگری سویه‌های PGPR با صفات مختلف محرک رشد در خاک‌های آهکی و استفاده از این سویه‌های PGPR به‌عنوان تلقیح بیولوژیکی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### نمونه‌برداری از خاک ریزوسفری

۴۵ نمونه خاک از ریزوسفر محصولات مختلف در مزارع

کشاورزی شهر بیرم در جنوب استان فارس جمع‌آوری شد. خاک‌های مورد نظر همگی pH قلیایی داشتند و دارای مقادیر زیادی کربنات کلسیم (آهک) بودند. برای جداسازی خاک ریزوسفری، از خاکی که به فاصله ۲-۳ میلی متر از ریشه‌های ریز و باریک فاصله داشت، استفاده شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی قرار گرفت و به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد (Tirry et al., 2021).

### جداسازی باکتری‌های ریزوسفری

در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری، ۱۰ گرم خاک در ۹۰ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل (۰/۸۵ درصد NaCl) معلق شد. سوسپانسیون خاک در شیکر چرخشی در دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد. برای دستیابی به محلولی از رقت  $10^{-4}$  تا  $10^{-6}$ ، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون به‌صورت متوالی رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول سوسپانسیون بر روی محیط استریل نوترینت آگار (۵ گرم پپتون، ۳ گرم عصاره بیف، ۵ گرم نمک کلرید سدیم و ۲۰ گرم آگار) پخش شد. پس از خالص‌سازی، این جدایه‌های PGPR که تعداد ۱۸۱ جدایه را شامل می‌شد، از نظر صفات محرک رشدی غربالگری شدند. برای تحقیقات بیشتر جدایه‌های PGPR در کپسول گلیسرول در دمای  $20^{\circ}C$ - درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Liang et al., 2020).

### تعیین خصوصیات محرک رشد

#### انحلال فسفات

غربالگری اولیه برای انحلال فسفات بر روی محیط آگار Pikovskaya انجام شد. حجم ۵ میکرولیتر از کشت باکتری‌ها، روی پلیت‌های آگار Pikovskaya کشت داده شد و در دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و پس از ۳ روز انکوباسیون، کلنی‌های باکتریایی مورد مشاهده واقع شد. ناحیه هاله اطراف کلنی اندازه‌گیری و به‌عنوان باکتری‌های حل‌کننده فسفات تایید شد (Vazquez et al., 2000). تجزیه و تحلیل کمی انحلال فسفات در محیط مایع با استفاده از تری کلسیم فسفات نامحلول انجام شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز روی شیکر چرخشی (۲۰۰ دور در دقیقه) pH محیط‌های کشت اندازه‌گیری شد و کشت‌ها با سرعت ۱۷۴۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. غلظت فسفات محلول در مایع‌رویی با استفاده از جذب رنگ زرد در ۴۳۰ نانومتر در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Perkin Elmer, Lambda2) اندازه‌گیری شد. مقدار فسفر حل

مدت ۲ ساعت و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید جدا شدند. محصولات تکثیر (با اندازه ۱۵۰۶ جفت باز) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محصول PCR تحت توالی‌یابی چرخه‌ای در جهت‌های رو به جلو قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از ترموسایکلر (Bio-Rad T100; USA) انجام شد. تجزیه و تحلیل توالی با استفاده از BLAST (مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]) انجام شد. همترازی چند توالی با استفاده از نرم‌افزار MegaX نسخه ۵.۰.۱۰ انجام شد. شناسایی باکتری‌ها بر اساس تشابه توالی ژن 16S rRNA انجام شد. رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از همترازی‌های بالا به روش همسایگی (neighbor-joining method) با تکرار ۱۰۰۰ انجام شدند.

### آزمایش گلخانه‌ای

جدایه‌های PGPR با ویژگی‌های محرک رشدی جهت بررسی توان آن‌ها در بهبود رشد یونجه رقم بمی انتخاب شدند. بذرها از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال تهیه شد. بذرها تلقیح شده با PGPRهای منتخب، به روش Singh et al., (2020) در هوا خشک شدند و دانه‌های خیس شده با آب مقطر بدون جدایه باکتری نیز به‌عنوان شاهد استفاده شدند. بذر یونجه در گلدان پلاستیکی با سه تکرار از هر تیمار PGPR کاشته شد و حداقل سه بوته در هر گلدان نگهداری شد. برای این پژوهش از یک خاک مناسب که حداقل‌های مورد نیاز رشد یونجه را دارا باشد استفاده شد. خاک لوم شنی با  $pH=8/13$ ، کربنات کلسیم معادل ۵۴۱ گرم بر کیلوگرم، هدایت الکتریکی ۲/۱۲ دسی‌زیمنس بر متر، کربن آلی ۰/۲۷ درصد، نیتروژن کل ۰/۰۸ درصد، فسفر قابل دسترس ۶/۲۷ میلی‌گرم در کیلوگرم و پتاسیم قابل دسترس ۱۸۵/۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم برای آزمایش‌های گلدانی استفاده شد. بررسی‌های گلخانه‌ای به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه به اجرا درآمد. این مطالعات شامل دو آزمایش مجزا بود و هدف از آن ۱- پیدا کردن بهترین باکتری محرک رشد از بین جدایه‌های مورد بررسی و اثر آن بر شاخص‌های گیاهی ۲- اثر تنش‌های شوری بر جدایه‌های باکتریایی و بر شاخص‌های گیاهی بود. آزمایش اول شامل ۴ سطح تلقیح باکتریایی (control (شاهد)، *Pseudomonas*، *Bacillus Cereus* و *Pseudomonas Syringae*) و شوری خاک در دو سطح (۲ و ۷ دسی‌زیمنس بر متر) با سه تکرار و کاشت گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) بود. پارامترهای رشد گیاه مانند طول ریشه و اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و هم‌چنین کلروفیل کل به

شده با کمک منحنی استاندارد  $KH_2PO_4$  اندازه‌گیری گردید (Jeon et al., 2003).

### تولید سیدروفور

غربالگری اولیه برای جدایه‌های PGPR تولیدکننده سیدروفور، با لکه‌گیری و کشت یک شبه محلول باکتریایی رشدیافته بر روی صفحات آبی کروم آزرول سولفونات (CAS) انجام شد و در دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. تشکیل یک ناحیه روشن با هاله رنگی مایل به زرد، صورتی یا سفید اطراف کلونی در محیط آبی تیره، نشان‌دهنده تولید سیدروفور است. تجزیه و تحلیل کمی سیدروفور با استفاده از روش شاتل CAS انجام شد (Alexander & Zuberer, 1991). پس از ۲۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer, Lambda2) ثبت شد. واحد سیدروفور (/) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\frac{Ar-As}{Ar} \times 100 = (\%) \text{ واحد سیدروفور}$$

که در آن، Ar جذب مرجع در ۶۳۰ نانومتر، As جذب نمونه در ۶۳۰ نانومتر است (Alexander & Zuberer, 1991).

### تولید IAA

جدایه‌های PGPR انتخاب شده از غربالگری اولیه و تجزیه و تحلیل کمی در نوترینت براث رشد داده شدند. سپس محیط مایع استریل در دمای  $28 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور چرخشی با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴۴ ساعت انکوبه شد. جذب توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Perkin Elmer, Lambda2) در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید. غلظت IAA موجود در مایع رویی با استفاده از منحنی استاندارد IAA محاسبه شد (Gordon & Weber, 1951).

### تولید ACC - دامیناز

توانایی تولید ACC-دامیناز جدایه‌ها به روش اسپکتروفتومتری در ۵۴۰ نانومتر بر حسب  $\alpha$ -کتوتیترات تولید شده برآورد گردید (Shrivastava & Kumar, 2013). فعالیت آنزیم ACC-دامیناز بر حسب نانو مول در هر میکروگرم پروتئین سلولی در ساعت بیان شد.

### شناسایی مولکولی جدایه‌های PGPR با توالی یابی ژن 16S rRNA

در این مرحله ژن 16S rRNA از DNA ژنومی جدا شده از باکتری با استفاده از پروتکل‌های استاندارد PCR تکثیر شد. پرایمرهای (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 27F و (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 1492R برای تکثیر ژن‌های ریبوزومی 16S rRNA استفاده شدند. محصولات PCR با الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد به

دادند که به ترتیب تا ۴۰۱/۶۷، ۳۴۵/۰۰ و ۳۳۹/۰۰ میلی‌گرم در لیتر تری کلسیم فسفات را حل کردند (جدول ۱). مقادیر pH (جدول ۱) نشان می‌دهد غلظت فسفر در همه جدایه‌ها و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، نسبت معکوس با pH محیط دارد. باکتری‌های حل‌کننده فسفات انواع مختلفی از اسیدهای آلی مانند اسید استیک، اسید آدیپیک، اسید بوتیریک، اسید فوماریک، اسید گلیکونیک، اسید مالونیک، اسید مالیک، اسید لاکتیک، اسید اگزالیک، اسید سوکسینیک را تولید می‌کنند، که منجر به کاهش pH محیط مایع می‌شود و در نتیجه غلظت فسفر را افزایش می‌دهد (Liang et al., 2020; Rodríguez & Fraga, 1999). در این مرحله جدایه SF1038 به عنوان جدایه برتر در انحلال فسفر شناخته شد.

#### تولید سیدروفور

در غربالگری اولیه تعداد ۲۴ جدایه توانایی تولید سیدروفور را در غربالگری اولیه از خود نشان دادند که از بین آن‌ها تعداد ۵ جدایه‌ای که بیشترین هاله نارنجی را تولید کرده بودند، جهت اندازه‌گیری واحدهای سیدروفور انتخاب گردیدند و اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد با هم داشتند، به طوری که جدایه SF1092 بیشترین درصد واحدهای سیدروفور را داشته است و جدایه‌های SF1044 و SF1075 با اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد به وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در رتبه‌های بعدی هستند. در این مرحله نیز جدایه SF1092 به عنوان جدایه برتر در تولید سیدروفور مشخص گردید.

روش (Lichtenthaler, 1987)، محتوای پرولین به روش (Bates et al., 1973) بوسیله اسپکتروفتومتر، و پروتئین خام به کمک دستگاه Near Infra Red (NIR) پس از هشت هفته کاشت ثبت شد. گیاهان در آون ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند تا وزن خشک کل محاسبه گردد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

همه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. داده‌های به دست آمده از طریق تحلیل واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ مورد ارزیابی قرار گرفت. هم‌چنین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد ( $P \leq 0.05\%$ ) مقایسه شدند.

#### نتایج و بحث

##### انحلال فسفات

در غربالگری اولیه مشخص شد، تعداد ۳۷ جدایه ظرفیت حل شدن فسفر از تری کلسیم فسفات نامحلول در محیط جامد Pikovskaya را داشتند. از این تعداد، ۹ جدایه PGPR بر اساس داشتن بزرگترین قطر هاله در غربالگری اولیه انتخاب شدند. داده‌های کمی انحلال فسفات توسط PGPR نشان داد که جدایه SF1160 حداکثر انحلال فسفات را در ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون (۵۰۸/۳۳ میلی‌گرم در لیتر) و ۴۸ ساعت (۴۶۷/۳۳ میلی‌گرم در لیتر) داشت. با این حال، SF1038 حداکثر انحلال فسفات را در ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون به خود اختصاص داد و به دنبال آن SF1167 و SF1032 نشان

Table 1. Capability of selected PGPR isolates of solubilizing tricalcium phosphate ( $\text{mg L}^{-1}$ )

PGPR Isolates	24 h		48 h		72 h	
	Phosphate solubilization ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH	Phosphate solubilization ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH	Phosphate solubilization ( $\text{mg L}^{-1}$ )	pH
Control	16.67±3.18 <sup>g</sup>	6.10	9.00±0.58 <sup>i</sup>	6.00	10.67±2.33 <sup>f</sup>	6.20
SF1006	285.33±3.48 <sup>d</sup>	4.90	262.00±2.31 <sup>e</sup>	4.70	324.00±6.11 <sup>bcd</sup>	4.50
SF1032	331.00±16.62 <sup>c</sup>	4.60	290.67±2.33 <sup>d</sup>	4.50	339.00±16.46 <sup>bc</sup>	4.30
SF1038	369.33±11.70 <sup>b</sup>	4.30	342.33±1.45 <sup>c</sup>	4.30	401.67±12.71 <sup>a</sup>	3.80
SF1044	482.33±6.96 <sup>a</sup>	3.70	436.67±1.86 <sup>b</sup>	3.50	302.33±8.45 <sup>d</sup>	4.10
SF1063	187.00±7.57 <sup>f</sup>	5.50	424.00±1.15 <sup>f</sup>	5.50	211.67±7.26 <sup>e</sup>	5.40
SF1124	184.33±6.77 <sup>f</sup>	5.50	257.00±3.21 <sup>e</sup>	5.30	315.33±11.98 <sup>bcd</sup>	3.80
SF1160	508.33±16.17 <sup>a</sup>	3.50	467.33±2.91 <sup>a</sup>	3.30	307.67±6.57 <sup>cd</sup>	4.00
SF1167	225.67±9.96 <sup>e</sup>	5.20	227.33±1.45 <sup>g</sup>	5.20	345.00±17.69 <sup>b</sup>	3.60
SF1178	204.33±7.31 <sup>ef</sup>	5.30	208.67±1.20 <sup>h</sup>	5.30	200.67±6.06 <sup>e</sup>	5.60

Means±SE sharing the same letter(s) do not differ significantly ( $p \leq 0.05$ ), by Duncan's multiple range test.

تولید شده در جدایه SF1113 به میزان ۳۹/۷۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. نتایج مشابه تولید IAA توسط ایزوله‌های PGPR توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Halimursyadah & Rizva, 2022). علاوه بر این، تلقیح باکتری‌های مولد IAA می‌تواند تشکیل ریشه‌های جانبی و موهای

#### تولید IAA

بر اساس یافته‌های (جدول ۳)، از ۱۲ جدایه PGPR در غربالگری اولیه، همه جدایه‌ها دارای ظرفیت تولید IAA بودند. به طور خاص، جدایه SF1050 حداکثر IAA به میزان ۵۲/۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را تولید کرد. به همین ترتیب، حداقل IAA

OL979228 ثبت گردید. علاوه بر این، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک جدایه‌های SF1038 و SF1050 و SF1092 با استفاده از MEGA X نسخه ۱۰,۰,۵ با روش همسایگی در ارزش تکراری بوت‌استرپ  $n=1000$  انجام شد که در شکل ۲ نشان داده شده است.

#### مطالعات گلخانه‌ای

نتایج جدول ۴ نشان داد تیمار تلقیح باکتریایی با *Pseudomonas Syringae* بهترین عملکرد را در طول ریشه و وزن خشک ریشه از خود نشان داده است، در حالی که تیمار تلقیح باکتریایی با *Pseudomonas Alcaliphila* بهترین عملکرد را در طول اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی داشته است و این تفاوت میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد معنی‌دار شده است. هم‌چنین در همه تیمارها با افزایش شوری از ۲ تا ۷ دسی‌زیمنس بر متر، در همه شاخص‌های رشد کاهش معنی‌دار رخ داده است، اما تلقیح با باکتری‌های PGPR سبب افزایش شاخص‌های رشد نسبت به شاهد در شرایط شوری بیشتر شده است که با نتایج (Egamberdieva et al., 2019) مطابقت دارد.

هم‌چنین نتایج جدول ۵ نشان می‌دهد میانگین کلروفیل کل در تیمار تلقیح با *Pseudomonas Alcaliphila* معادل ۱۰/۲۳ میلی‌گرم بر گرم افزایش ۱۳ درصدی را نسبت به شاهد در شوری ۲  $dS m^{-1}$  داشته است در حالی که در شوری ۷  $dS m^{-1}$  افزایش ۳ درصدی را نشان می‌دهد. در مورد تولید پرولین تیمار شاهد در شوری ۷  $dS m^{-1}$  با میانگین ۱/۱۷۷ میکرومول بر گرم بیشترین، و تیمار تلقیح‌شده با *Pseudomonas Alcaliphila* در شوری ۲  $dS m^{-1}$  با تولید ۰/۱۷۳ میکرومول بر گرم کمترین پرولین را تولید نموده است. هم‌چنین تولید پروتئین خام در تیمارهای تلقیح‌شده با *Pseudomonas Alcaliphila* و *Pseudomonas Syringae* در شوری ۲  $dS m^{-1}$  به ترتیب با ۱۳/۸۷ و ۱۳/۹۴ میلی‌گرم بر گرم بهترین عملکرد را داشته‌اند و اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند، از طرف دیگر تیمار شاهد در شوری ۷  $dS m^{-1}$  با تولید ۴/۶۲ میلی‌گرم بر گرم کمترین پروتئین را تولید نموده است. بر اساس مطالعات مشابه (Tirry et al., 2021) اثر تلقیح دو جنس *Pseudomonas*، جنس *Klebsiella* و جنس *Alcaligenes* بر روی یونجه گلدانی تحت شرایط شور، شاخص‌های رشد و محتوای کلروفیل را افزایش و میزان پرولین را نسبت به شاهد کاهش یافت. در تحقیقی دیگر (Upadhyay et al., 2019) گزارش دادند سطح پرولین در گندم تلقیح نشده، نسبت به گندم تلقیح شده با باسیلوس و آرتروباکتر بطور قابل توجهی افزایش یافت.

ریشه را افزایش دهد و می‌تواند تحمل گیاهان را به شوری افزایش دهد (Cavite et al., 2021b). در این مرحله جدایه SF1050 به‌عنوان جدایه برتر در تولید IAA شناخته شد.

**Table 2. Capability of selected PGPR isolates of siderophore production**

PGPR isolates	Siderofore Unit (%)
SF1044	36.75±1.31 b
SF1075	29.16±0.82 c
SF1092	48.94±0.53 a
SF1139	24.67±1.64 d
SF1158	17.63±0.87 e

Means±SE sharing the same letter(s) do not differ significantly ( $p \leq 0.05$ ), by Duncan's multiple range test.

**Table 3. IAA production by selected rhizobacterial isolates**

Selected Isolated	IAA Production ( $\mu g \cdot mL^{-1}$ )
SF1006	42.03±0.94 <sup>gh</sup>
SF1038	49.70±0.58 <sup>bc</sup>
SF1044	44.63±0.81 <sup>ef</sup>
SF1050	52.10±0.86 <sup>a</sup>
SF1075	46.80±0.62 <sup>de</sup>
SF1078	51.30±0.31 <sup>ab</sup>
SF1082	40.00±0.93 <sup>h</sup>
SF1092	47.90±0.91 <sup>cd</sup>
SF1107	44.23±0.63 <sup>fg</sup>
SF1113	39.77±0.72 <sup>h</sup>
SF1131	40.67±0.86 <sup>h</sup>
SF1160	48.50±0.72 <sup>cd</sup>

Means±SE sharing the same letter(s) do not differ significantly ( $p \leq 0.05$ ), by Duncan's multiple range test.

#### شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر PGPR

در این مطالعه، هر سه جدایه برتر در غربالگری شامل SF1038، SF1050 و SF1092، قابلیت تولید ACCD را داشتند. از این رو، پس از تکثیر ژن 16SrRNA به کمک PCR و مشاهده باند ۱۵۰۰ جفت بازی اقدام به توالی‌یابی باند تکثیر یافته نمودیم. با مراجعه به سایت NCBI تشابه توالی‌های به‌دست آمده، با جنس و گونه‌های باکتریایی ارزیابی شد و نتایج Blast-n توالی‌های حاصل از تکثیر ژن رمزکننده 16SrRNA نشان داد که جدایه‌های SF1038، SF1050 و SF1092 با درصد مشابهت ۹۶/۴۰، ۹۲/۸۰ و ۹۴/۷۹ به ترتیب متعلق به گونه *Pseudomonas Syringae*، *Bacillus Cereus* و *Pseudomonas Alcaliphila* هستند و با ارسال توالی‌ها به پایگاه داده GenBank NCBI، شماره‌های دسترسی (Accession Number) آن‌ها به ترتیب OL946146، OL979178 و



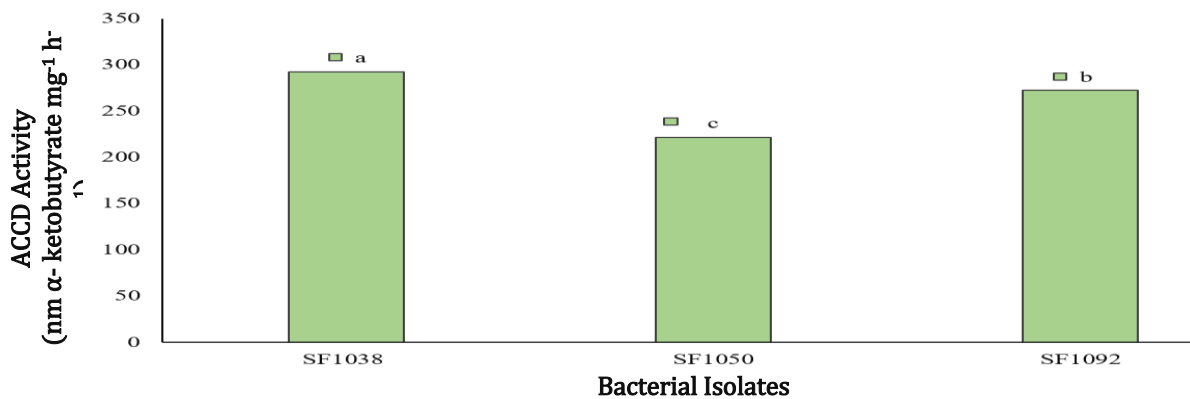


Figure 1. ACC – deaminase activity in selected superior bacterial isolates

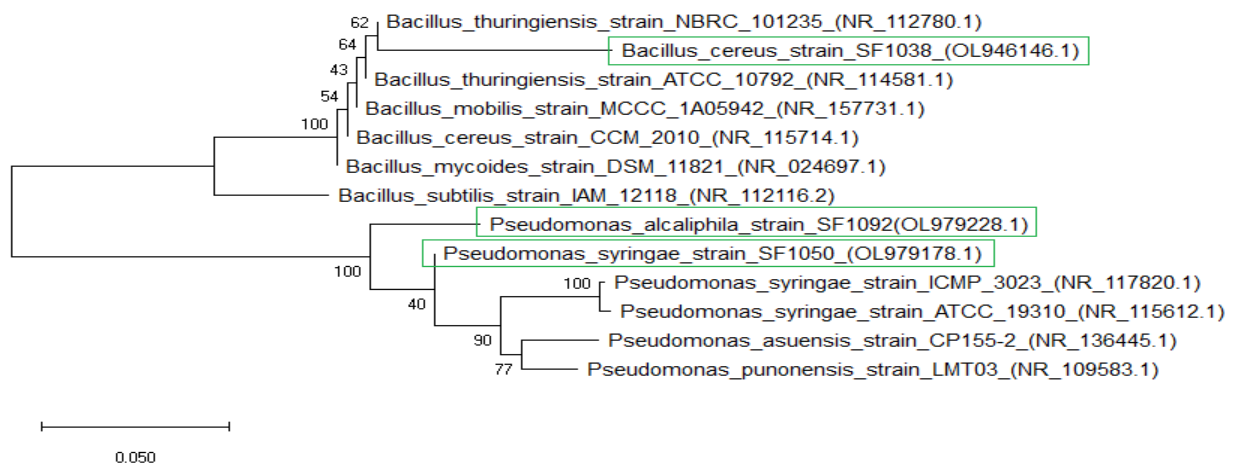


Figure 2. Phylogenetic tree constructed by neighborhood method from 16S rRNA gene sequence analysis

Table 4. Mean Comparisons for the effects of PGPR and salinity treatments on alfalfa growth parameters

Treatments	Root Length (cm)		Shoot Length (cm)		Root dry weight (gr)		Shoot dry weight (gr)	
	Salinity		Salinity		Salinity		Salinity	
	2 dS m <sup>-1</sup>	7 dS m <sup>-1</sup>	2 dS m <sup>-1</sup>	7 dS m <sup>-1</sup>	2 dS m <sup>-1</sup>	7 dS m <sup>-1</sup>	2 dS m <sup>-1</sup>	7 dS m <sup>-1</sup>
Control	16.87 c	7.17 f	30.10 d	24.03 g	0.089 c	0.037 f	1.533 d	1.222 g
Bacillus Cereus	19.33 b	11.37 e	31.27 c	24.40 f	0.102 b	0.060 e	1.580 c	1.237 f
Pseudomonas Syringae	21.27 a	14.60 d	33.40 b	24.77 e	0.113 a	0.077 d	1.694 b	1.257 e
Pseudomonas	19.47 b	11.23 e	34.37 a	24.93 e	0.103 b	0.059 e	1.743 a	1.263 e

Means sharing the same letter(s) do not differ significantly ( $p \leq 0.05$ ), by Duncan's multiple range test.

Table 5. Mean Comparisons for the effects of PGPR and salinity treatments on alfalfa biochemical parameters

Treatments	Chlorophyll (mg.gr <sup>-1</sup> )		Prolin (μmol.gr <sup>-1</sup> )		Crude protein (mg.gr <sup>-1</sup> )	
	Salinity		Salinity		Salinity	
	2 dS m <sup>-1</sup>	7 dS m <sup>-1</sup>	2 dS m <sup>-1</sup>	7 dS m <sup>-1</sup>	2 dS m <sup>-1</sup>	7 dS m <sup>-1</sup>
Control	9.05 d	7.22 g	0.240 c	1.177 a	10.97 c	4.62 f
Bacillus Cereus	9.34 c	7.32 f	0.213 c	1.100 ab	12.55 b	7.43 e
Pseudomonas Syringae	9.96 b	7.37 ef	0.180 c	1.077 b	13.87 a	9.53 d
Pseudomonas	10.23 a	7.44 e	0.173 c	1.150 ab	13.94 a	7.53 e

Means sharing the same letter(s) do not differ significantly ( $p \leq 0.05$ ), by Duncan's multiple range test.



می‌شود که نتایج این تحقیق با انجام آزمایش‌های مزرعه‌ای اعتبار سنجی گردد و در صورت تأیید به‌عنوان کود زیستی در خاک‌های آهکی و تحت تنش شوری مورد استفاده محصول یونجه قرار گیرد.

### سپاس‌گزاری

نویسندگان از حمایت‌های معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه که در انجام این پژوهش صمیمانه همکاری داشتند، قدردانی می‌نمایند.

### نتیجه‌گیری

در مجموع بر اساس افزایش رشد یونجه و پارامترهای بیوشیمیایی در آزمایش‌های گلدانی، جدایه SF1092 نتایج بهتری در پارامترهای گیاهی نشان داد و می‌توان از آن به‌عنوان یک تلقیح زیستی برای تغذیه خاک در شرایط مزرعه برای کشت یونجه استفاده کرد. در نتیجه، سویه SF1050 که در بررسی‌های مولکولی، بیشترین شباهت را به *Pseudomonas Alcaliphila* داشته است، به‌عنوان یک باکتری محرک رشد گیاه (PGPR) برای بهبود محصول یونجه است. با این وجود، پیشنهاد

### References

- Acevedo, E., Galindo-Castañeda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis Jacq.*) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, 80, 26-33.
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King saud University-Science*, 26(1), 1-20 .
- Ahmad, F., Ahmad, I., & Khan, M. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, 163(2), 173-181 .
- Alexander, D., & Zuberer, D. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12, 39-45 .
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
- Cavite, H. J. M., Mactal, A. G., Evangelista, E. V., & Cruz, J. A. (2021a). Biochemical characteristics and inoculation effects of multi-trait plant growth-promoting rhizobacteria on upland rice (*Oryza sativa* L. cv PSB Rc23) seedling growth. *Archives of Microbiology*, 203(6), 3533-3540.
- Cavite, H. J. M., Mactal, A. G., Evangelista, E. V., & Cruz, J. A. (2021b). Growth and Yield Response of Upland Rice to Application of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40(2), 494-508.
- Egamberdieva, D., Wirth, S., Bellingrath-Kimura, S. D., Mishra, J., & Arora, N. K. (2019). Salt-tolerant plant growth promoting rhizobacteria for enhancing crop productivity of saline soils. *Frontiers in Microbiology*, 18, 2791.
- Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26(1), 192-195.
- Gupta, A., Bano, A., Rai, S., Kumar, M., Ali, J., Sharma, S., & Pathak, N. (2021). ACC deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in *Pisum sativum*. *3 Biotech*, 11(12), 514.
- Gyaneshwar, P., Kumar, G. N., Parekh, L., & Poole, P. (2002). Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil*, 245(1), 83-93 .
- Halimursyadah, H., & Rizva, D. (2022). *Exploration, isolation and characterization of indigenous rhizobacteria from patchouli rhizosphere as PGPR candidates in producing IAA and solubilizing phosphate*. Paper presented at the IOP Conference Series, Earth and Environmental Science.
- Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M., Kim, G. H., & Sa, T. (2008). Cross-utilization and expression of outer membrane receptor proteins for siderophore uptake by Diamondback moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) gut bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 289(1), 27-33.
- Jeon, J. S., Lee, S. S., Kim, H. Y., Ahn, T. S., & Song, H. G. (2003). Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganisms. *Journal of Microbiology*, 41(4), 271-276 .
- Karami, S., Yasrebi, J., Safarzadeh Shirazi, S., Whalen, J. K., Ronaghi, A., & Ghasemi-Fasaei, R. (2020). Sugar processing residuals as an iron source for grain crops grown in calcareous soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 51(1), 60-69 .
- Khan, A., & Singh, A. V. (2021). Multifarious effect of ACC deaminase and EPS producing *Pseudomonas* sp. and *Serratia marcescens* to augment drought stress tolerance and nutrient status of wheat. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(12), 198.

- Liang, J. L., Liu, J., Jia, P., Yang, T., Zeng, Q. W., Zhang, S. C., ... & Li, J.T. (2020). Novel phosphate-solubilizing bacteria enhance soil phosphorus cycling following ecological restoration of land degraded by mining. *The ISME Journal*, 14(6), 1600-1613.
- Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382
- Murali, M., Gowtham, H., Singh, S. B., Shilpa, N., Aiyaz, M., Niranjana, S., & Amruthesh, K. (2021). Bio-prospecting of ACC deaminase producing Rhizobacteria towards sustainable agriculture: A special emphasis on abiotic stress in plants. *Applied Soil Ecology*, 168, 104142 .
- Nekoyanfar, Z., Lack, Sh., & Abadou, Gh. R. (2017). Assessment effect of cutting time and soil salinity on quality and quantity forage yield of five alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties under Ahvaz conditions. *Plant Productions*, 40(3), 113-127. [In Persian]
- Pandey, S., & Gupta, S. (2020). Diversity analysis of ACC deaminase producing bacteria associated with rhizosphere of coconut tree (*Cocos nucifera* L.) grown in Lakshadweep islands of India and their ability to promote plant growth under saline conditions. *Journal of Biotechnology*, 324, 183-197.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17(4-5), 319-339.
- Shrivastava, U. P., & Kumar, A. (2013). Characterization and optimization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACCD) activity in different rhizospheric PGPR along with *Microbacterium* sp. strain ECI-12A. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 1(1), 11-15.
- Singh, A., Sharma, J., Paichha, M., & Chakrabarti, R. (2020). *Achyranthes aspera* (prickly chaff flower) leaves- and seeds-supplemented diets regulate growth, innate immunity, and oxidative stress in *Aeromonas hydrophila*-challenged *Labeo rohita*. *Journal of Applied Aquaculture*, 32(3), 250-267.
- Tirry, N., Kouchou, A., Laghmari, G., Lemjereb, M., Hnadi, H., Amrani, K., ... & El Ghachtouli, N. (2021). Improved salinity tolerance of *Medicago sativa* and soil enzyme activities by PGPR. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101914 .
- Upadhyay, S. K., Saxena, A. K., Singh, J. S., & Singh, D. P. (2019). Impact of native ST-PGPR (*Bacillus pumilus*; EU927414) on PGP traits, antioxidants activities, wheat plant growth and yield under salinity. *Climate Change and Environmental Sustainability*, 7(2), 157-168.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M., Lopez-Cortes, A., & Bashan, Y. (2000). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils*, 30(5-6), 460-468.