علوم گیاهان زراعی ایران
دورۀ ۴۷، شمارۀ ۱، بهار ۱۳۹۵ (ص ۷۶-۶۷)
DOI: 10.22059/ijfcs.2016.57851

جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد از ریشه‌گاه آویشن دنایی و بررسی توانایی آن‌ها در بهبود جوانه‌زنی بذر

امیرحسین آقااحمدی[1*]، حسین مقدم[2]، فرزاد نجفی[3]، داریوش مظاهری[4] و احمدعلی پوربابایی[5]
۱، ۲ و ٤. دانش‌آموختۀ دکتری زراعت، استادیار و استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار پژوهشکدۀ گیاهان و مواد اولیۀ دارویی، دانشگاه شهید بهشتی
۵. استادیار گروه خاکشناسی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۲۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٤/۸/۱۹)

چکیده

آویشن دنایی (*Thymus daenensis* subsp. *Daenensis*) گیاه دارویی بومی ایران بوده و ازنظر فنول‌های مونوترپن [به‌ویژه تیمول (thymol) و کارواکرول (carvacrol)] غنی است. هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی ریزوباکتری‌های بهبوددهندۀ رشد گیاه (PGPRs) از ریشه‌گاه (ریزوسفر) آویشن دنایی است. غربالگری سویه‌های PGPR با استفاده از آزمون‌های فیزیولوژیکی مانند توانایی تولید اکسین، توانایی تولید ترکیبات آهن‌بر (سیدروفور) و حل‌کنندگی فسفات و همچنین آزمون‌های جوانه‌زنی و قوۀ نامیۀ بذر آویشن دنایی انجام شد. ۲۱ جدایۀ باکتری از نمونۀ ریشه‌گاه آویشن دنایی که از رویشگاه طبیعی گردآوری شده بودند، جداسازی شد و تأثیر تلقیح آن‌ها روی ویژگی‌های جوانه‌زنی آویشن دنایی در یک تحقیق آزمایشگاهی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار بررسی شد. چهار جدایه به‌عنوان جدایه‌های PGPR شناسایی شدند. جدایه‌های TDE3، TDE16 و TDE20 توانایی تولید IAA، ترکیبات سیدروفور و حل‌کنندگی فسفات نامحلول را داشتند. جدایۀ TDE4 (*Achromobacter spiritinus*) تنها جدایه‌ای بود که سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیۀ (ویگور) بذر را به‌طور معنی‌دار افزایش داد. چهار جدایۀ یادشده این قابلیت (پتانسیل) را دارند تا به‌عنوان بهبوددهندۀ رشد گیاه (PGPR)، در کشت آویشن دنایی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: *Thymus daenensis*، PGPR، توان تولید IAA، سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیۀ بذر.

مقدمه

جنس آویشن[1] (از خانوادۀ نعنائیان[2]) حدود ۲۱۵ گونۀ علفی چندساله و بوته‌ای را شامل می‌شود. منطقۀ مدیترانه را می‌توان به‌عنوان خاستگاه پراکنش این جنس در نظر گرفت (Stahl-Biskup & Saez, 2003). گونه‌های آویشن کاربردهای چندی ازجمله دمنوش، مزه‌دهنده (چاشنی و ادویه) و دارویی دارند (Stahl-Biskup & Saez, 2003). از بین چهارده گونۀ آویشن که در ایران می‌رویند (Rechinger, 1982) آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) جزو گونه‌هایی است که کاربرد دارویی

* تلفن: ۰۹۱۲۵۷۰۵۱۰۴
E-mail: amir_ahmadi@ut.ac.ir

1. Thymus
2. Labiate

گسترده‌ای دارد (Nickavar *et al*., 2005). روغن اسانس این‌گونه مانند فنول‌های مونوترپن (به‌ویژه تیمول[1] و کارواکرول[2]) غنی بوده و به همین دلیل می‌تواند جایگزین مناسبی برای کشت آویشن باغی[3] (کشت رایج آویشن) برای کاربردهای دارویی و دیگر کاربردها باشد (Nickavar *et al*., 2005). افزون بر این، آویشن دنایی به‌عنوان منبع غنی از تیمول (حدود ۷۵ درصد از ترکیبات اسانس) این قابلیت (پتانسیل) را دارد تا در کشت‌های گستردهٔ تجاری استفاده شود (Nickavar *et al*., 2005; Sajjadi & Khatamsaz, 2003).

حاصل‌خیزی خاک یکی از موضوع‌های اساسی در زراعی‌سازی گیاهان دارویی است. از آنجایی‌که تولید گیاهان دارویی به‌صورت ارگانیک اهمیت زیادی دارد، درنتیجه، بررسی درزمینهٔ منابع طبیعی کود، مانند کودهای زیستی، باید مدنظر قرار گیرد. ریزموجود (میکروارگانیسم)های فراوانی در خاک به‌ویژه در ریشه‌گاه (ریزوسفر) گیاهان زندگی می‌کنند. آن‌ها می‌توانند اثرگذاری‌های مفیدی بر رشد گیاه داشته باشند (Vessey, 2003). به گروهی از باکتری‌های ریشه‌گاهی که در بسیاری از فرآیندهای بوم‌سازگانی (اکوسیستمی) مهم شامل کنترل زیستی بیماری‌های گیاه، چرخهٔ مواد غذایی و استقرار بذر نقش دارند و در نتیجه از نظر کشاورزی توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده‌اند، در اصطلاح "باکتری‌های محرک رشد گیاه" یا PGPR[4] گفته می‌شوند (Elo *et al*., 2000).

بهبود جوانه‌زنی بذر و در پی آن قوهٔ نامیهٔ گیاهچه نیز تحت تأثیر تلقیح با PGPRها قرار می‌گیرد. تحریک جوانه‌زنی با باکتری به تولید ترکیبات زیستی فعال توسط آن‌ها نسبت داده می‌شود. PGPR تلقیح شده، در حضور ترشحات بذر، اکسین (IAA)[5] تولید می‌کند که می‌تواند باعث جوانه‌زنی سریع‌تر شود (Baset Mia *et al*., 2012). گروهی از باکتری‌های ریشه‌گاهی بنام باکتری‌های ریشه‌گاهی تأخیردهندهٔ رشد DRB[6]، با ترشح میزان زیاد IAA می‌توانند بازدارندهٔ رشد گیاه باشند اما سویه‌های PGPR که میزان متعادلی از IAA را تولید می‌کنند اثرگذاری‌های سودمندی بر رشد ریشه دارند (Barazani & Friedman, 1999).

توانایی تولید ترکیبات آهن‌بر (سیدروفور) (Siderophore) یکی از ویژگی‌های PGPRها است. آهن‌برهای میکروبی، مولکول‌های آلی به‌نسبت درشتی‌اند که در شرایط کمبود آهن قابل‌جذب، در محیط ترشح می‌شوند و میل ترکیبی شدیدی با Fe^{3+} دارند. باکتری‌های محرک رشد با تولید آهن‌بر یا همان مواد کلاته‌کنندهٔ آهن[7]، آهن محیط را از دسترس دیگر اعضای ریز مجموعهٔ گیاهی (میکروفلور) خاک خارج کرده و به این شیوهٔ تغذیهٔ آهن گیاه را افزایش می‌دهند (Guerinot, 1994; Höfte, 1993). افزون بر این، از آنجایی‌که آهن‌برهای تولیدشده توسط PGPRها قدرت جذب آهن بالاتری از آهن‌برهای تولیدشده توسط DRBها دارند بنابراین، ریزموجودهای DRB در رقابت برای جذب آهن مغلوب می‌شوند (De Bellis & Ercolani, 2001).

ریزموجودهای حل‌کنندهٔ فسفات PSM[8] شامل گروه زیادی از باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌شود که می‌توانند در محیط حاوی‌تری کلسیم، آهن و فسفات آلومینیوم، هیدروکسی آپاتیت، پودر استخوان، سنگ فسفات و دیگر ترکیبات فسفات نامحلول به‌عنوان تنها منبع فسفات، رشد کنند (Tilak *et al*., 2005). این ریزموجودها با تأمین فسفر، رشد گیاه را افزایش می‌دهند. همچنین، آن‌ها می‌توانند کارایی تثبیت زیستی (بیولوژیکی) نیتروژن و فراهمی دیگر عناصر مانند آهن، روی، و غیره را افزایش دهند و مواد افزایش‌دهندهٔ رشد گیاه را تولید کنند (Kucey *et al*., 1989).

اثرگذاری‌های PGPRها روی جوانه‌زنی بذر گیاهان مختلف در پژوهش‌های فراوانی بررسی شده است. در بررسی Rana *et al*. (2011)، مجموعه‌ای از صد باکتری که از ریشه‌گاه بوته‌های گندم جداسازی شده بودند بر پایهٔ آزمون جوانه‌زنی بذر غربالگری اولیه شدند. سپس جدایه‌های منتخب، ازنظر ویژگی‌های

1. Thymol
2. Carvacrol
3. *Thymus vulgaris*
4. Plant Growth Promoting Rhizobacteria
5. Indole Acetic Asid
6. Deleterious Rhizobacteria
7. Iron Chelators
8. Phosphate Solubilizing Microorganisms

PGPR مانند تولید IAA و آهن‌بر و حل‌کنندگی فسفات آزمایش شدند. بنا بر نتایج آنان از میان ده جدایه، سه جدایه (AW1، AW5، AW7) را می‌توان به‌عنوان PGPR برای تلقیح استفاده کرد چراکه ویژگی‌های مثبتی همچون استقرار و افزایش در خاک دارند. نتایج یک تحقیق آزمایشگاهی تأثیر تلقیح سویه‌های PGPR روی بعضی از ویژگی‌های جوانه‌زنی برنج نشان داد که این سویه‌ها با بهبود سرعت جوانه‌زنی بذر و ویژگی‌های گیاهچه باعث استقرار سریع‌تر آن و درپی آن رشد بهتر محصول می‌شوند (Baset Mia *et al*., 2012).

در بررسی دیگری، Ashrafuzzaman *et al.* (2009) اقدام به جداسازی و شناسایی سویه‌های PGPR از ریشه‌گاه برنج برای افزایش رشد این محصول کردند. یافته‌های آنان نشان داد که استفاده از چهار جدایه PGPR به‌عنوان کود زیستی می‌تواند برای کشت برنج سودمند باشد چراکه تولید IAA و حل‌کنندگی فسفر و درنهایت رشد گیاه را افزایش دادند. تأثیر سودمند کاربرد PGPR روی جوانه‌زنی و قوهٔ نامیهٔ بذر دیگر گیاهان نیز از جمله: آفتابگردان (Moeinzadeh *et al*., 2010)، گیاه دانه روغنی جاتروفا (Desai *et al*., 2007)، و ذرت (Wu *et al*., 2005) گزارش شده است.

با توجه به اهمیت PGPRها به‌عنوان کود زیستی در کشت گیاهان دارویی، هدف‌های این تحقیق شامل ۱) جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتری همزیست از ریشه‌گاه آویشن دنایی، ۲) شناسایی نسبی سویه‌های PGPR با انجام شماری از آزمون‌های فیزیولوژیک شامل قابلیت‌های تولید اکسین (IAA)، ترکیبات آهن‌بر و حل‌کنندگی فسفات و ۳) بررسی تأثیر آن‌ها روی بعضی از مشخصه (پارامتر)های جوانه‌زنی مانند: درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه برای انتخاب بهترین سویه بود.

مواد و روش‌ها

گردآوری نمونه از ریشه‌گاه آویشن دنایی و جداسازی باکتری‌های آن

نمونه‌های ریشه‌گاه از بوته‌های آویشن دنایی که در مرحلهٔ گلدهی بودند از منطقهٔ بوئین و میاندشت (E ″۵۴ ′۰۹ °۵۰ و N ″۲۵ ′۰۴ °۳۳) با میانگین بارندگی سالیانه ۳۴۰ میلی‌متر) واقع در غرب استان اصفهان، در خردادماه سال ۱۳۹۰ گردآوری شدند. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکدهٔ گیاهان و مواد اولیهٔ دارویی دانشگاه شهید بهشتی برای جداسازی باکتری‌های همزیست منتقل شدند. به‌منظور جداسازی باکتری‌های ریشه‌گاهی، ۱۰ گرم از نمونهٔ ریشه‌گاه به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون‌شده اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه روی دستگاه لرزا (شیکر) قرار داده شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از این مایع دروایه (سوسپانسیون) به یک ظرف ویال ۱۰ میلی‌لیتری منتقل شده و برای ۲ دقیقه روی لرزا قرار داده شد. ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع دروایه روی سینی (پلیت)های حاوی محیط آگار مغذی NA[1] تلقیح شدند. سپس سینی‌ها برای سه روز در دستگاه کابین‌رشد (انکوباتور) با دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. در پایان روز سوم همسانه (کلونی)های باکتری که از لحاظ ویژگی‌های ساختارظاهری (مورفولوژیکی) و فیزیولوژیکی از بقیه متمایز بودند انتخاب شده و با کشت دوباره روی همان محیط خالص شدند.

شناسایی جدایه‌های باکتری

شناسایی ساختارظاهری جدایه‌ها بر پایهٔ راهنمای باکتری‌شناسی رده‌بندی (سیستماتیک) برگیز (Claus & Berkely, 1986) انجام شد. بر این پایه پس از کشت همسانه‌های هر جدایه روی محیط آگار مغذی، به مدت سه روز در کابین‌رشد قرار داده شدند و سپس ویژگی‌های میکروسکپی همسانه‌ها شامل شکل و واکنش گرمی بررسی شد.

به‌منظور انجام شناسایی مولکولی جدایهٔ برتر، استخراج DNA و بیان 16S rDNA در مرکز منابع زیستی جهاد دانشگاهی کرج و تعیین توالی کامل 16S rDNA نیز با استفاده از سامانهٔ ABI 3730 XL توسط شرکت ماکروژن[2] کشور کرهٔ جنوبی انجام شدند.

1. Nutrient Agar
2. Macrogen Co.

غربالگری جدایه‌های PGPR بر پایهٔ آزمون‌های فیزیولوژیک

آزمون توان تولید اکسین (IAA)

اندازه‌گیری کیفی برای ارزیابی توان جدایه ها در تولید اکسین با استفاده از محیط آگار DF[1] بر پایهٔ روش Brick *et al.* (1991) صورت گرفت.

اندازه‌گیری کمی توان تولید اکسین با استفاده از روش رنگ‌آمیزی سالکوفسکی[2] انجام شد (Glickmann & Dessaux, 1995).

آزمون توان حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول

برای انجام این آزمون، محیط کشت سینی‌های آزمایش به روش پیکوواسکی آماده شدند. سپس جدایه‌ها به‌صورت خطی درون هر سینی کشت‌شده و برای هفت روز در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس در کابین‌رشد نگهداری شدند. پس‌ازاین مدت توان حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول برای هر جدایه مشاهده شد، بر این پایه جدایه‌هایی که هالهٔ شفاف داشتند توانسته بودند که فسفات محیط کشت را حل کنند (Pikovaskya, 1948).

آزمون توان تولید ترکیبات آهن‌بر

تشخیص نیمه کمی توان تولید آهن‌بر توسط جدایه‌ها با استفاده از محیط Cas-Agar، به روش Alexander & Zuberer (1991) انجام شد. جدایه‌هایی که قادر به تولید آهن‌بر بودند بر پایهٔ هالهٔ نارنجی‌رنگی که پیرامون همسانه آن‌ها ایجاد می‌شود تشخیص داده شدند. کشت جدایه‌ها به‌گونه‌ای بود که درون هر ظرف پتری چهار جدایهٔ مختلف به روش قطره‌گذاری کشت شد و برای هر جدایه سه تکرار در سه ظرف پتری در نظر گرفته شد. ظرف‌های پتری درون کابین‌رشد با دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس نگهداری و اندازهٔ قطر همسانهٔ باکتری و هالهٔ نارنجی اطراف آن پس از یک هفته اندازه‌گیری شد.

تهیهٔ مایهٔ تلقیح

مایهٔ تلقیح جدایه‌ها بر پایهٔ روش Vincent (1970) تهیه شد. یک لوپ از هر جدایهٔ باکتری به ارلن‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع TSB[3] اضافه شد و سپس ظرف‌ها روی دستگاه لرزا با ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۳ روز قرار گرفتند. پس‌ازاین زمان محیط کشت هر ظرف به رنگ شیری تغییریافته ($>1 \times 10^7$cells/mL) و برای تلقیح بذرهای آویشن استفاده شد.

آزمون جوانه‌زنی و قوهٔ نامیهٔ بذر

بذرهای آویشن دنایی از رویشگاه طبیعی واقع در منطقهٔ بوئین و میاندشت استان اصفهان گردآوری شدند. بذرها در آغاز در آب جاری به مدت سه ساعت قرار داده شده و آن‌گاه در اتانول ۷۰درصد (C_2H_5OH) برای دو دقیقه و سفیدکنندهٔ شیمیایی ۲۵درصد که حاوی ۶درصد هیپوکلورید سدیم (NaClO) بود برای ده دقیقه به‌صورت سطحی ضدعفونی شدند. سپس بذرهای سه مرحله با آب سترون‌شده شستشو و با غوطه‌ور شدن در مایهٔ تلقیح ($>1 \times 10^7$cells/Ml) هر یک از تیمارها به مدت ده دقیقه، تلقیح شدند. بذرهای تیمار شاهد درون همان محیط کشت سترون شده و بدون باکتری غوطه‌ور شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار و بیست‌ودو تیمار انجام شد. تیمارها شامل بیست‌ویک جدایهٔ باکتری و یک تیمار شاهد بود. هر تکرار شامل ظرف سینی حاوی ده عدد بذر بود که روی محیط آگار (۲ درصد w/v) قرار داده شدند. سپس سینی‌ها به مدت ده روز در کابین‌رشد با دمای ۲۴ درجهٔ سلسیوس و دورهٔ روشنایی شنزده ساعت در هر شبانه‌روز قرار گرفتند.

برای اندازه‌گیری سرعت جوانه‌زنی، هر دوازده ساعت بذرهای جوانه‌زده شمارش شد. تنها هنگامی‌که طول ریشه‌چه به ۲ میلی‌متر رسیده بود بذر به‌عنوان جوانه‌زده به‌شمار آمد. در پایان روز دهم درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه اندازه‌گیری شدند. همهٔ اندازه‌گیری‌ها بر پایهٔ دستورکارهای ISTA[4] انجام شد (ISTA, 1985). سرعت جوانه‌زنی (۱) (Abdul Baki & Anderson, 1973) و شاخص بنیه (۲) (Magurie, 1962) با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شدند:

1. DF Salts minimal medium
2. Pikovaskya
3. Tryptone Soybean Broth
4. International Rules for Seed Testing

(۱) سرعت جوانه‌زنی =

$$\frac{\sum \text{(بذرهای جوانه‌زده در هر بار شمارش)}}{\text{زمان شمارش}}$$

(۲) شاخص بنیه =

درصد جوانه‌زنی × (میانگین طول ساقه‌چه + میانگین طول ریشه‌چه)

تجزیهٔ آماری

از طرح بلوک‌های کامل تصادفی برای آزمون جوانه‌زنی استفاده شد. برای محاسبهٔ حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) از نرم‌افزار SAS نسخهٔ ۹٫۰ (SAS Institute Inc., 2006) استفاده و مقایسهٔ میانگین‌ها در سطح احتمال ۵درصد انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی جدایه‌های باکتری

بیست‌ویک جدایهٔ باکتری از ریشه‌گاه آویشن دنایی جداسازی و بنام‌های TDE1، TDE2، تا TDE21 نام‌گذاری شدند. مشاهده‌های میکروسکپی برای ارزیابی ویژگی‌های جدایه‌ها ازنظر شکل و واکنش گرمی در جدول ۱ نشان داده شده است. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده، چهارده جدایه به شکل باسیل اسپوردار و شش جدایه به‌صورت باسیل بودند، درحالی‌که TDE8 تنها جدایه‌ای بود که شکل کروی یا کوکسی داشت. همهٔ جدایه‌ها گرم مثبت بودند.

جدول ۱. ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌ها
Table1. Microscopic observations of isolates.

Isolate	Cell shape	Gram reaction
TDE1	Bacilli	Gram positive
TDE2	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE3	Bacilli	Gram positive
TDE4	Bacilli	Gram negative
TDE5	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE6	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE7	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE8	Cocci	Gram positive
TDE9	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE10	Bacilli	Gram positive
TDE11	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE12	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE13	Bacilli	Gram positive
TDE14	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE15	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE16	Bacilli	Gram positive
TDE17	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE18	Bacilli	Gram negative
TDE19	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE20	spore – forming Bacilli	Gram positive
TDE21	spore – forming Bacilli	Gram positive

شناسایی سمیت جدایه TDE4 که بر پایهٔ آزمون سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه به‌عنوان جدایهٔ برتر انتخاب شد (به بخش نتایج آزمون جوانه‌زنی مراجعه شود) نیز برابر با روش برگیز، منفی بود (Claus & Berkely, 1986). همچنین شناسایی مولکولی این جدایه و تعیین توالی 16S rDNA نشان داد که این جدایه با احتمال ۹۹/۸ درصد همسان با سویه *Achromobacter spiritinus* LMG 26692(T) است و با شمارهٔ دسترسی KJ150709 در بانک ژن شرکت ماکروژن کشور کرهٔ جنوبی ثبت شد.

توان تولید IAA، حل‌کنندگی فسفات و تولید ترکیبات آهن‌بر

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، همهٔ جدایه‌ها توانایی تولید IAA را داشتند. جدایه‌های TDE2، TDE3، TDE8، TDE14 و TDE17 توانایی بالایی در تولید IAA از خود نشان دادند. در مقابل، جدایه‌های TDE4، TDE10، TDE20 و TDE21 ازلحاظ توانایی تولید IAA در حد متوسط و یا متعادل قرار داشتند درحالی‌که سیزده *جدای* دیگر از این نظر ضعیف بودند. همچنین، ارزیابی کمی توان تولید IAA که برای جدایهٔ TDE4 انجام شد میزان ۳۰/۵۲ گرم بر لیتر را نشان داد. ازنظر توان حل‌کنندگی فسفات نامحلول، تنها جدایه‌های TDE3، TDE16 و TDE20 این قابلیت را داشتند (جدول ۲).

تولید ترکیبات آهن‌بر به‌وسیلهٔ همهٔ جدایه‌ها افزایش یافت. بااین‌حال جدایه‌های TDE1، TDE3، TDE16 و TDE20 در مقایسه با دیگر جدایه‌ها توانایی خوبی از این نظر نشان دادند (جدول ۲).

سرعت جوانه‌زنی

همهٔ جدایه‌ها سرعت جوانه‌زنی بالاتری از شاهد داشتند (جدول ۳). جدایه‌های TDE1، TDE4، TDE13 و TDE16 بیشترین و جدایه‌های TDE5، TDE11 و TDE12 کمترین افزایش سرعت جوانه‌زنی را نشان دادند.

درصد جوانه‌زنی

بر پایهٔ جدول ۳، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای باکتری و شاهد ازنظر درصد جوانه‌زنی بذر وجود نداشت.

جدول ۲. ارزیابی توان جدایه‌ها در تولید IAA، ترکیبات آهن‌بر و حل‌کنندگی فسفات نامحلول

Table 2. Production of IAA, siderophores compounds and solubilization of phosphorus by isolates

Isolate	IAA production*	Phosphorus solubilization	Production of siderophores**
TDE1	+	No solubilizing	++
TDE2	+++	No solubilizing	+
TDE3	+++	Solubilizing	++
TDE4	++	No solubilizing	+
TDE5	+	No solubilizing	+
TDE6	+	No solubilizing	+
TDE7	+	No solubilizing	+
TDE8	+++	No solubilizing	+
TDE9	+	No solubilizing	+
TDE10	++	No solubilizing	+
TDE11	+	No solubilizing	+
TDE12	+	No solubilizing	+
TDE13	+	No solubilizing	+
TDE14	+++	No solubilizing	+
TDE15	+	No solubilizing	+
TDE16	+	Solubilizing	++
TDE17	+++	No solubilizing	+
TDE18	+	No solubilizing	+
TDE19	+	No solubilizing	+
TDE20	++	Solubilizing	++
TDE21	++	No solubilizing	+

* +: تولید کم، ++: تولید متعادل، +++: تولید زیاد

** هالهٔ تغییررنگ یافتهٔ اطراف همسانهٔ باکتری در محیط کشت CAS: +، ۴-۵ میلی‌متر؛ ++، ۶-۸ میلی‌متر

*: + = weak producer; ++ = medium producer; and +++ = strong producer.

**: Radii of the discolored halos around bacterial streaks on Chrome Azurol S agar plates, as follows: +, 4 to 5 mm; ++, 6 to 8 mm

جدول ۳. تأثیر جدایه‌ها روی سرعت جوانه‌زنی، درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه

Table 3. Effect of isolates on Seed germination rate, seed germination percentage and vigor index of *Thymus daenensis* Sub sp. Daenensis.

Isolates	Seed germination rate (SGR)	Seed germination percentage (SGP)	Vigor index (VI)
TDE1	16 a	97.6 ab	328 cdefg
TDE2	13.06 bcdef	93.3 ab	170.6 hi
TDE3	11.8 fg	99 a	175.6 hi
TDE4	14.5 ab	99 a	573 a
TDE5	12.26 defg	95.3 ab	351 cdef
TDE6	13.6 bcdef	99 a	322.6 cdefg
TDE7	13.3 bcdef	95.3 ab	271.6 fgh
TDE8	14.06 bcd	97.3 ab	149.3 i
TDE9	13.5 bcdef	95.6 ab	286 efg
TDE10	13 bcdef	90 b	431 bc
TDE11	12.46 cdefg	90 b	368.6 cdef
TDE12	12.46 cdefg	95 ab	397.6 bcd
TDE13	14.23 abc	98.3 a	383.6 bcde
TDE14	14.13 bc	95 ab	240 ghi
TDE15	13.7 bcde	95 ab	317 defg
TDE16	14.33 ab	100 a	272.3 fgh
TDE17	12 efg	95 ab	271 fgh
TDE18	13.23 bcdef	95 ab	286 efg
TDE19	12.73 bcdef	93.3 ab	302 defg
TDE20	12.7 bcdef	98.3 a	407 bcd
TDE21	13.66 bcde	98.3 a	488 ab
Control	10.66 g	95 ab	378 bcdef
Significance	0.01	NS	0.01
CV (%)	8.3	5	20.5

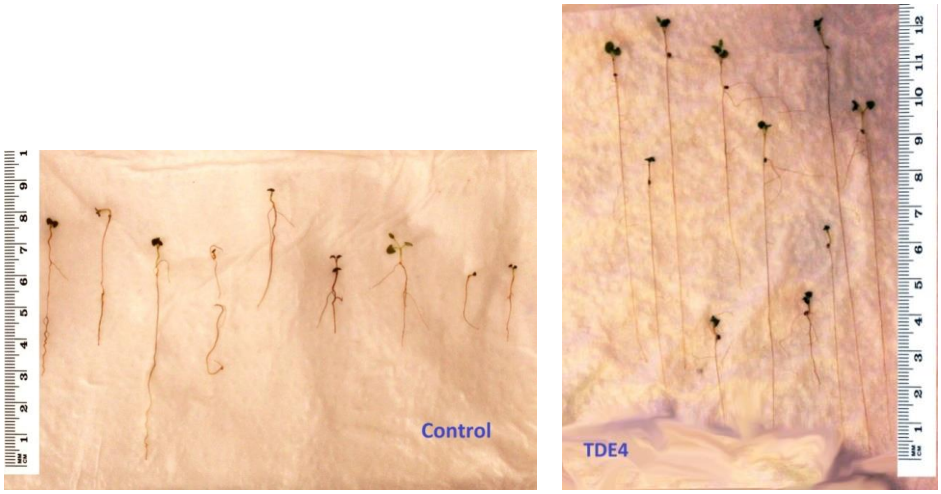
بر پایهٔ آزمون چند دامنهٔ دانکن (P <۰/۰۱) مقادیر دارای حروف همسان در هر ستون اختلاف معنی‌دار ندارند

In a column values having similar letter(s) do not differ significantly as per DMRT.

شاخص بنیه

بین جدایه‌ها ازنظر شاخص بنیه تفاوت معنی‌داری (p<۰/۰۱) وجود داشت، به‌طوری‌که این شاخص از ۵۷۳ تا ۱۴۹/۳ متغیر بود. شاخص بنیه در جدایه TDE4 (۵۷۳) به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد (۳۷۸) بود (جدول ۳ و شکل ۱). این جدایه ازلحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با جدایهٔ TDE21 با شاخص ۴۸۸ نداشت. از سوی دیگر، پانزده جدایه شاخص بنیهٔ

پایین‌تری از شاهد داشتند. کمترین شاخص (۱۴۹/۳) متعلق به جدایهٔ TDE8 بود و پس‌ازآن جدایه‌های TDE2، TDE3 و TDE14 به ترتیب با شاخص‌های ۱۷۰/۶، ۱۷۵/۶ و ۲۴۰ قرار داشتند.



شکل ۱. تأثیر تلقیح جدایهٔ TDE4 روی طول ریشه‌چه و ساقه‌چه آویشن دنایی

Figure 1. The effect of TDE4 isolate on seedling and vigor of *Thymus daenensis*

از آنجایی‌که TDE4 (*Achromobacter spiritinus* KJ150709) تنها جدایه‌ای بود که بیشترین افزایش شاخص بنیه را نشان داد و همچنین سرعت جوانه‌زنی آویشن دنایی را به‌طور معنی‌داری افزایش داد به‌عنوان جدایهٔ برتر انتخاب شد.

اتیلن و اکسین ازجمله هورمون‌هایی‌اند که با تلقیح PGPR ها بیشترین تغییر در مقادیرشان ایجاد می‌شود (Patten & Glick, 1996; Xie *et al*., 1996). ساخت متعادل IAA توسط PGPRها می‌تواند به‌طور مستقیم رشد و تقسیم یاخته‌ای ریشهٔ گیاهان میزبان را آسانگری کند (Jacobson *et al*., 1994; Patten & Glick, 1996). از سوی دیگر، مشخص شده است که گروهی از باکتری‌های ریشه‌گاهی که مقادیر بیش‌ازحدی از IAA را تولید می‌کنند، بازدارندهٔ رشد ریشه هستند (Barazani & Friedman, 1999; Xie *et al*., 1996). دلیل تأثیر بازدارندهٔ بیش تولید باکتریایی IAA بر رشد ریشه می‌تواند به دلیل ترشح IAA اضافی توسط باکتری ریشه‌گاهی و جذب توسط گیاه و درنهایت واکنش با آنزیم ACC دی آمیناز باشد. نتیجهٔ این واکنش تحریک ساخت بیشتر ACC و تبدیل آن به اتیلن باشد (Kende, 1993). در حقیقت، تأثیر بازدارندگی مقادیر بالای IAA خارجی روی طویل شدن ریشه در موارد زیادی به اثبات رسیده و به‌طور عموم به تحریک ساخت اتیلن توسط IAA نسبت داده می‌شود (Devlin, 1969).

نتایج به‌دست‌آمده در این بررسی با یافته‌های بالا همخوانی داشت. بین جدایه‌ها ازنظر تولید IAA تفاوت وجود داشت به‌گونه‌ای‌که پنج جدایه مقادیر بالای IAA، دوازده جدایه مقادیر پائین و چهار جدایهٔ باقیمانده میزان متعادل آن را تولید کردند (جدول ۲). نتایج آزمون قوهٔ نامیهٔ بذر (جدول ۳) نشان داد که جدایه‌های TDE2، TDE3، TDE8، TDE14 و TDE17 با ویژگی تولید زیاد IAA، کمترین شاخص بنیه را در مقایسه با شاهد و دیگر جدایه‌ها به خود اختصاص دادند. در مقابل، همهٔ جدایه‌هایی که ویژگی تولید متعادل IAA دارند، در مقایسه با دیگر تیمارها بیشترین شاخص بنیه را داشتند. دلیل این یافته‌ها می‌تواند مربوط به تأثیر بازدارندگی مقادیر بالای IAA روی رشد گیاهچه و طویل شدن ریشه باشد که در مطالب بالا به آن اشاره شد. همچنین، ارزیابی کمی توان تولید IAA جدایهٔ TDE4، میزان ۳۰/۵۲ میلی‌گرم بر لیتر را نشان داد. مرور بررسی‌های پیشین در زمینهٔ ارزیابی کمی تولید IAA توسط PGPRها (Khalid *et al*., 2004; Kochar *et al*., 2011; Patten

& Glick, 2002) مشخص کرد که این جدایه جزو PGPRها با توان بالای تولید IAA هستند، هرچند در مقایسه با دیگر جدایه‌ها، این میزان در حد متعادل ارزیابی شد. بااین‌حال یافته‌های این آزمایش با نتایج تعدادی از آزمایش‌های پیشین در تضاد بود (Ashrafuzzaman *et al*., 2009; Khalid *et al*., 2004) چون در این آزمایش‌ها گزارش شده است که سویه‌های باکتری با قابلیت تولید بالای IAA، مشخصه‌های جوانه‌زنی را در مقایسه با سویه‌های دیگر بهبود می‌بخشند. درواقع باید این موضوع توجه شود که گونه‌های مختلف گیاهان پاسخ‌های متفاوتی به IAA تولیدی توسط ریزموجودها می‌دهند. به‌عبارت‌دیگر، توان تولید IAA به‌وسیله PGPRها بسته به نوع گونهٔ گیاه و سویهٔ باکتری متغیر است و نیز تحت تأثیر شرایط کشت گیاه، مرحلهٔ رشدی آن و وجود بستره (سوبسترا) قرار می‌گیرد (Mirza *et al*., 2001).

از آنجایی‌که همهٔ جدایه‌ها توانایی تولید IAA را حتی در مقادیر اندک داشتند، درنتیجه، سرعت جوانه‌زنی در همهٔ تیمارهای تلقیح‌شده در مقایسه با شاهد افزایش نشان داد (جدول ۳). جدایهٔ TDE4 به همراه جدایهٔ TDE1 بیشترین تأثیر روی سرعت جوانه‌زنی داشتند. به نظر می‌رسد که تأثیر بازدارندگی مقادیر بالای IAA، در مراحل اولیهٔ جوانه‌زنی هنگامی‌که سرعت جوانه‌زنی محاسبه می‌شود، وجود نداشته و در مراحل بعدی بروز می‌یابد.

نبود تأثیر معنی‌دار تلقیح جدایه‌ها بر درصد جوانه‌زنی ممکن است به این دلیل باشد که احتمال دارد جوانه‌زنی آویشن دنایی به عامل‌هایی غیر از میزان IAA موجود در محیط کشت ازجمله نفوذپذیری پوستهٔ بذر، رسیدگی و زنده‌بودن جنین و مانند آن بستگی داشته باشد. هرچند بررسی‌های قابل استنادی در این زمینه یافت نشد و درستی این نظریه باید تحقیق شود.

نتیجه‌گیری کلی

بنابر نتایج تحقیق، سه جدایهٔ TDE3، TDE16 و TDE20 باقابلیت‌های حل‌کنندگی فسفات نامحلول و تولید ترکیبات آهن‌بر و جدایهٔ TDE4 تولیدکنندهٔ میزان متعادلی IAA، قابلیت PGPR در کشت آویشن دنایی داشتند. همچنین از سویهٔ TDE4 (*Achromobacter spiritinus* KJ150709) می‌توان برای بهبود جوانه‌زنی بذر در تولید نشاء آویشن دنایی استفاده کرد. برای اطمینان از تأثیر مثبت این جدایه‌های PGPR بر مراحل بعدی رشد و عملکرد اسانس آویشن دنایی، به تحقیقات بیشتری نیاز است.

REFERECNES

1. Abdul Baki, A.A. & Anderson, J.D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science*, 13, 630-633.
2. Alexander, D. B. & Zuberrer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagent to evaluate siderophore production by rhizobacteria. *Biology and Fertility of Soil*, 12(1), 39-45.
3. Ashrafuzzaman, M., Hossen, F.A., Razi Ismail, M., Anamul Hoque, M.D. & Zahurul Islam, M. *et al*. (2009). Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8(7), 1247-1252.
4. Barazani, O. & Friedman, J. (1999). Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth mediating bacteria? *Journal of Chemical Ecology*, 25(10), 2397-2406.
5. Baset Mia, M.A., Shamsuddin, Z.H. & Mahmood, M. (2012). Effects of rhizobia and plant growth promoting bacteria inoculation on germination and seedling vigor of lowland rice. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3758-3765.
6. Bric, J.M., Bustock, R.M. & Silversone, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacterial immobilization on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 535-538.
7. Claus, D. & Berkely, R. (1986). Genus Bacillus. *In Bergey's manual of systematic bacteriology*, ed. by Williams, S.T., Sharp, M.E., and Holt, J.C., Williams and Wilkins, Baltimor MD 21202, pp. 1105-1139.
8. De Bellis, P. & Ercolani, G.L. (2001). Growth Interactions during bacterial colonization of seedling rootlets. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1945-1948.

9. Desai, S., Narayanaiah, C.h., Kranti Kumari, C.h., Reddy, M.S., Gnanamanickam, S.S. *et al*. (2007). Seed inoculation with *Bacillus* sp. improves seedling vigour in oil-seed plant *Jatropha curcas* L. *Biology and Fertility of Soils*, 44, 229-234.
10. Devlin, R.M. (1969). *Plant physiology*: Second edition. Reinhold Publishing Corporation, New York.
11. Elo, S., Maunuksela, L., Salkinoja-Salonen, M., Smolander, A. & Haahtela, K. (2000). Humus bacteria of Norway spruce stands: plant growth promoting properties and birch, red fescue and alder colonizing capacity. *FEMS Microbiology and Ecology*, 31, 143-152.
12. Glickmann, E. & Dessaux, Y. (1995). A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 793-796.
13. Guerinot, M.L. (1994). Microbial iron transport. *Annual Review of Microbiology*, 48, 743-772.
14. Höfte, M. (1993). Classes of microbial siderophores. *In Iron chelation in plants and soil microorganisms*, ed. by Barton, L.L., and Hemming, B.C. Academic Press, San Diego, California, pp. 3-26.
15. International Seed Testing Association. (1985). International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 13, Supplement, pp. 307.
16. Jacobson, C.B., Pasternak, J.J. & Glick, B.R. (1994). Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*, 40, 1019-1025.
17. Kende, H. (1993). Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 33, 172-296.
18. Khalid, A., Arshad, M. & Zahir, Z.A. (2004). Screening plant growth promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 473-480.
19. Kochar, M., Upadhyay, A. & Srivastava, S. (2011). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* Psd and plant growth regulation by hormone overexpression. *Research in Microbiology*, 162, 426-435.
20. Kucey, R.M.N., Janzen, H.H. & Leggett, M.E. (1989). Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *In Advances in Agronomy*, ed. by Brady N.C. Academic Press INC, San Diego, California, 42, pp. 199-223.
21. Maguire, J.D. (1962). Speed of germination- aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 2, 176-177.
22. Mirza, M.S., Ahmad, W., Latif, F., Haurat, J. & Bally, R. *et al*. (2001). Isolation, partial characterization, and the effect of plant growth-promoting bacteria (PGPB) on micro-propagated sugarcane *in vitro*. *Plant Soil*, 237, 47-54.
23. Moeinzadeh, A., Sharif-Zadeh, F., Ahmadzadeh, M. & Heidari Tajabadi, F. (2010). Biopriming of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed with *Pseudomonas fluorescens* for improvement of seed invigoration and seedling growth. *Australian Journal of Crop Sciences*, 4(7), 564-570.
24. Nikavar, B., Mojab, F. & Dolat Abadi, R. (2005). Analysis of the essential oils of two Thymus species from Iran. *Food Chemistry*, 90, 609-611.
25. Patten, C.L. & Glick, B.R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3795-3801.
26. Patten, C.L. & Glick, B.R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-2-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*, 31, 196-119.
27. Pikovaskya, R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya, 17, 362-370.
28. Rana, A., Saharan, B., Joshi, M., Prasanna, R., Kumar, K. *et al*. (2011). Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiol*, 61(4), 893-900.
29. Rechinger, K.H. (1982). *Flora Iranica* (Vol. 152). Graz: Akademische Druck- und Verlagsanstalt, University of Chicago.
30. Sajjadi, S.E. & Khatamsaz, M. (2003). Composition of the essential oil of *Thymus daenensis* Celak. ssp lancifolius (Celak.) Jalas. *Journal of Essential Oil Reserch*, 15, 34-35.
31. SAS. (2006). Version 9.0. SAS/STAT. *Guide to Personal Computers*. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina.
32. Schwyn, B. & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160, 47-56.
33. Stahl-Biskup, E. & Saez, F. (2003). *Thyme*, second ed., Taylor & Francis, London.
34. Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N. *et al*. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89(1), 136-150.
35. Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil*, 255, 571-586.
36. Vincent, J.M. (1970). *A manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK.

37. Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C. & Wong, M.H. (2005). Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125, 155-166.
38. Xie, H., Pasternak, J.J. & Glick, B.R. (1996). Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology*, 21, 56-60.

Iranian Journal of Filed Crop Science, Vol. 47, No. 1, Spring 2016

Isolation and characterization of growth-promoting bacteria from rhizosphere of *Thymus danenensis* and study of their potential for enhancement of seed germination

Amir Hossein Agha Ahmadi[1*], Hossein Moghadam[2], Farzad Najafi[3], Daryoush Mazaheri[4] and Ahmad Ali Pourbabaee[5]

1, 2, 4. Former Ph. D. Student, Assistant Professor and Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

3. Assistant Professor, Medicinal Plants & Drug Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

5. Assistant Professor, Soil Science Department, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Aug. 20, 2014 - Accepted: Nov. 10, 2015)

ABSTRACT

The Iranian *Thymus daenensis* subsp. *daenensis* is rich in monoterpene phenols (especially thymol and carvacrol). This research was conducted to isolate and characterize the plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) from rhizosphere of *T. daenensis*. PGPRs were screened based on some physiological traits including IAA production, phosphate solubilization, and siderophore compounds production abilities, and also seed germination and vigor tests. Twenty one rhizobacteria were isolated from the rhizosphere samples of *T. daenensis* which grow widely in Iran, and their effect on seed germination properties was studied in a completely randomized block design with three replications. We could characterize four isolates for PGPRs activity based on physiological and germination assays. TDE3, TDE16 and TDE20 isolates had the phosphate solubilization and siderophores production abilities. TDE4 (*Achromobacter spiritinus*) was the only isolated bacteria which significantly improved the SGR and VI of *T. daenensis* seeds. These four isolates have the potential to be used as PGPRs in cultivation of *T. daenensis*.

Keywords: IAA production, PGPRs, seed germination, seedling vigor, *Thymus daenensis*.

* Corresponding author E-mail: amir_ahmadi@ut.ac.ir Tel: +98 912 5705104