بررسی توان کلنیزاسیون و تأثیر باکتری‌های حل‌کننده فسفات جداسازی شده از دیم زارها بر شاخص‌های رشد گندم در تنش‌های کم‌آبی و شوری

ابراهیم شیرمحمدی[۱]، حسینعلی علیخانی[۲*]، احمدعلی پوربابائی[۳] و حسن اعتصامی[۴]

۱- دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۲- استاد، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳-دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۴- استادیار، گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۳۰

پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۱۱/۰۶

کلمات کلیدی:

کشت درون شیشه‌ای،

محلول غذایی،

فسفر،

کود زیستی

* عهده دار مکاتبات

Email: halikhan@ut.ac.ir

چکیده

استفاده از کشت درون شیشه‌ای هیدروپونیک یکی از روش‌های مفید و کاربردی برای انتخاب برترین جدایه‌های باکتری‌های محرک رشد گیاهان با توان بالای کلنیزاسیون در سطح ریشه می‌باشد. در این راستا، پژوهش حاضر با هدف انتخاب برترین جدایه‌ها از بین ۱۶ جدایه باکتری حل‌کننده فسفات که طی مراحل قبلی این پژوهش از دیم زارهای گندم استان‌های قزوین و زنجان جداسازی شده بودند، طراحی و در مدت ٤٥ روز در اتاقک رشد اجرا گردید. قالب طرح کاملاً تصادفی و شامل تلقیح بذور گندم با ۱۶ جدایه باکتری و کشت بذور جوانه‌دار در محلول غذایی هوگلند (با قابلیت هدایت الکتریکی ۸ دسی‌زیمنس بر متر و پتانسیل اسمزی ۰/٥٤- مگاپاسکال) حاوی تری کلسیم فسفات (منبع فسفر نامحلول) بود. در تیمارهای شاهد نیز بذور جوانه‌دار بدون تلقیح با باکتری در محلول غذایی هوگلند حاوی مونو پتاسیم فسفات (شاهد با منبع فسفر محلول) و تری کلسیم فسفات (شاهد با منبع فسفر نامحلول) با سه تکرار کشت شدند. نتایج نشان داد که جوانه‌های گندم تلقیح شده با جدایه B18 خشک شدند. به استثنای جدایه‌های B (14, 17, 32)؛ بقیه جدایه‌ها جمعیت بالای ٦×۱۰^٦ CFU بر گرم وزن تر ریشه، داشتند. تمامی جدایه‌های باکتری نسبت به شاهد با منبع فسفر نامحلول، فسفر قابل دسترس محلول غذایی را افزایش و pH آن را کاهش دادند. در کل جدایه‌های B3، B4، B6، B5، B1 و B2 برترین جدایه‌ها از نظر توان کلنیزاسیون، افزایش محتوی آب نسبی برگ و شاخص‌های رشد گیاه گندم بودند؛ و برای آزمایش‌های تکمیلی در گلخانه و مزرعه با بسترهای خاکی (در راستای تولید کود زیستی مناسب دیم‌زارهای گندم) استفاده از این جدایه‌ها توصیه می‌شوند.

مقدمه

نیاز بیشتر به غذا در نتیجه افزایش روزافزون جمعیت و کاهش سطح خاک‌های کشاورزی مطلوب، باعث شده تا بشر به راهکار افزایش عملکرد در واحد سطح روی آورد. از طرفی گندم در بین گیاهان زراعی مهمترین منبع غذایی برای مصرف انسانی می‌باشد. با توجه به قرارگیری ایران در اقلیم گرم و خشک یکی از راه‌های دستیابی به تولید بیشتر گندم، افزایش توان تحمل آن به تنش‌های کم‌آبی، شوری و کمبود عناصر ضروری به‌ویژه فسفر است؛ که استفاده از پتانسیل ریزوباکترهای محرک رشد گیاهان (PGPR)[1] در این راستا می‌تواند راه‌گشا باشد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که PGPR با مکانیسم‌های متعدد باعث کاهش اثرات تنش‌های کم-آبی، شوری و نیز افزایش مقاومت گیاهان در مقابل این تنش‌ها می‌شوند که در نهایت باعث افزایش رشد و نمو گیاهان می‌گردند (۶، ۱۸، ۲۰، ۳۱). علاوه بر اثرات PGPR بر افزایش مقاومت و تحمل گیاهان در برابر تنش‌های محیطی گزارش‌های متعددی نیز مبنی بر نقش محرک رشدی و تغذیه‌ای این ریزجانداران (به‌ویژه فسفر) برای گیاهان وجود دارد (۱۳، ۱۵، ۲۳). گروهی از PGPR که توان انحلال فسفات‌های نامحلول را دارند به باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB)[2] نیز معروف هستند. ارزیابی این باکتری‌ها در آزمایشگاه بر روی محیط‌های کشت مختلف انجام می‌گیرد؛ ولی مهمترین و متداول‌ترین منبع برای جداسازی این باکتری‌ها در محیط کشت‌ها، تری‌کلسیم فسفات می‌باشد (۱۱، ۴) استفاده از این منبع فسفر معمولاً تعداد زیادی باکتری را در هر مطالعه از نظر توان حل‌کنندگی فسفات مثبت ارزیابی می‌کند؛ اما وقتی که این جدایه‌ها بر روی گیاه تلقیح می‌شوند، فقط درصد کمی از این باکتری‌ها قادر به فراهم کردن فسفر برای گیاه می‌باشند. بنابراین در مراحل بعدی غربال‌گری، PSB منتخب باید در حضور گیاه در گلخانه و مزرعه ارزیابی شوند. پس از مشاهده پاسخ مثبت، این باکتری‌ها می‌توانند در قالب کود زیستی ارائه شوند (۷). البته بررسی همزمان تعداد زیادی از جدایه‌ها با تیمارهای مختلف، در کشت‌های خاکی کاری حجیم و دشوار است؛ ولی تعداد جدایه‌های منتخب با احتمال کارآیی بالا در شرایط گلخانه و سپس مزرعه را می‌توان با بهره‌گیری از سیستم کشت درون شیشه[3] هیدروپونیک کاهش داد. زیرا این سیستم نسبت به سیستم‌های کشت خاکی قابل کنترل‌تر بوده و دشواری‌های کشت خاکی را ندارند؛ و به‌طور همزمان می‌توان آزمایش‌های غربال-گری کارکردی را بر روی تعداد زیادی جدایه‌های تلقیح شده با گیاهان انجام داد؛ اما بهره‌گیری از این سیستم کشت در این راستا کمتر مورد توجه پژوهشگران بوده است. این پژوهش با هدف ارزیابی اولیه ۱۶ جدایه باکتری برتر و منتخب (که در مراحل قبلی پژوهش از دیم‌زارهای استان‌های قزوین و زنجان جداسازی و خالص‌سازی شده و از نظر ویژگی‌های محرک رشدی در شرایط آزمایشگاهی مطالعه شده بودند)، از نظر توان سازگاری با گیاه گندم (بررسی توان کلنیزاسیون جدایه‌ها در سطح ریشه و اثرات تلقیح این باکتری‌ها بر شاخص‌های رشد و نمو گیاه) و حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول در شرایط تنش شوری و کم‌آبی در سیستم کشت درون شیشه هیدروپونیک طراحی و اجرا شد؛ تا بدین‌وسیله کاراترین جدایه‌ها برای ادامه آزمایش در بسترهای خاکی گلخانه و مزرعه (در راستای هدف نهایی که تولید کود بیولوژیک مناسب دیم‌زارهای گندم است)، انتخاب گردد.

مواد و روش

آماده سازی محلول غذایی و لوله‌های کشت

در این آزمایش شاهد با منبع فسفر محلول ($B0P_{Ava}$) شامل کشت گیاهان تلقیح نشده با

1- Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)
2- Phosphate Solubilizing Bacteria (PSB)
3- Invitro

باکتری در محلول غذایی هوگلند کامل (۱۹) حاوی مونو پتاسیم فسفات، با ترکیب:

1 mM KH_2PO_4, 5 mM KNO_3, 2 mM $MgSO_4.7H_2O$, 5 mM $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, Fe-EDTA solution (100 µM $FeCl_3.6H_2O$ and 95.2 µM EDTA), 14.2 µM H_3BO_3, 14.6 µM $MnCl_2.4H_2O$, 1.8 µM $ZnSO_4.7H_2O$, 1 µM $CuSO_4.5H_2O$, 0.032 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ and 1 µM $Ni(NO_3)_2.6H_2O$

در شاهد با منبع فسفر نامحلول (B0PT) که شامل کشت گیاهان تلقیح نشده بود، همچنین در شاهد دوگانه که فاقد کشت گیاه و بدون باکتری بود (برای حذف سایر اثرات غیر از باکتری و گیاه بر حلالیت فسفات نامحلول)، و نیز در تیمارهای باکتری که شامل کشت گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های (B1PT, B2PT, ...) بود، از محلول غذایی هوگلند حاوی تری کلسیم فسفات با ترکیب زیر استفاده شد.

0.5 mM $Ca_3(PO_4)_2$, 6 mM KNO3, 2 mM $MgSO_4.7H_2O$, 3.5 mM $Ca(NO_3)_2.4H_2O$, 1 mM NH4NO3, Fe-EDTA solution (100 µM $FeCl_3.6H_2O$ and 95.2 µM EDTA), 14.2 µM H_3BO_3, 14.6 µM $MnCl_2.4H_2O$, 1.8 µM $ZnSO_4.7H_2O$, 1 µM $CuSO_4.5H_2O$, 0.032 µM $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ and 1 µM $Ni(NO_3)_2.6H_2O$.

پس از ساخت محلول‌های غذایی برای ایجاد تنش شوری قابلیت هدایت الکتریکی آنها با نمک سدیم کلراید در ۸ دسی‌زیمنس بر متر (۳) و برای ایجاد تنش کم‌آبی نیز پتانسیل اسمزی محلول غذایی با استفاده از PEG6000[1] -۰/۵۴ مگاپاسکال تنظیم شد (۲۰). سپس ۷۰ میلی‌لیتر از محلول‌های غذایی به هر یک از لوله‌های شیشه‌ای ۱۲۰ میلی‌لیتری اضافه و در اتوکلاو استریل شدند.

آماده سازی بذور

بذر گندم (*Triticum aestivum* L.) رقم آذر ۲ از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. بذرهای سالم و هم‌اندازه جداسازی و به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور گردید و با سرم فیزیولوژیک (۰/۸۵ درصد نمک سدیم کلراید) استریل شستشو شدند. سپس به مدت ۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد غوطه‌ور گردید و با سرم فیزیولوژیک استریل ۸ بار شستشو شدند (۲۴).

آماده‌سازی زادمایه[2] و تلقیح بذور

تعداد ۱۶ جدایه (جداسازی شده از دیم‌زارهای استان‌های قزوین و زنجان در مراحل قبلی پژوهش)، که از نظر ویژگی‌های محرک رشد گیاه (PGP)[3] برتر بودند و همچنین قابلیت بالایی در حل‌کننده‌گی فسفات‌های نامحلول و تحمل زیاد به تنش‌های کم‌آبی و شوری در آزمون‌های آزمایشگاهی داشتند، در این پژوهش استفاده شد. هر یک از این جدایه‌ها در محیط کشت نوترینت براث (NB)[4] تکثیر و با استفاده از روش مک فارلند جمعیت باکتری در تمامی سوسپانسیون‌ها تخمین زده شد. سپس سوسپانسیون جدایه‌های باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با ۵۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و محلول رویی دور ریخته شد و جمعیت باکتری‌ها با مقداری مناسب (با در نظر گرفتن جمعیت اولیه سوسپانسیون باکتری) سرم فیزیولوژیک حاوی ۰/۵ درصد کربوکسی متیل سلولز (CMC)[5] استریل در حد ۵×۱۰^۸ CFU[6] بر میلی‌لیتر تنظیم گردید. به ازای هر ۱۰ بذر ضد عفونی سطحی شده ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون نهایی جدایه‌های باکتری طبق طرح آزمایشی به صورت جداگانه اضافه گردید و به مدت ۴۵ دقیقه بذرها در زادمایه جدایه‌های باکتری غوطه‌ور شدند (۲۴). سپس بذرها به ظروف پتری حاوی آب-آگار

1- Polyethylene Glycol 6000

2- Inoculant
3- Plant Growth-Promoting (PGP)
4- Nutrient Broth (NB)
5- Carboxymethylcellulose (CMC)
6 Colony Forming Unit (CFU)

یک درصد منتقل و در ژرمیناتور (با دمای ۲±۲۰ درجه سلسیوس) گرماگذاری شدند.

کاشت گیاه و اعمال تیمارها

پس از اینکه طول ریشه‌های بذور جوانه‌زده به حدود دو سانتی‌متر رسید، گیاه‌چه‌ها در داخل لوله‌های اپندورف دو میلی لیتری پلاستیکی استریل (که ارتفاع آن درون لوله‌های کشت (واحدهای آزمایشی) به وسیله سیم‌های مسی تا سطح محلول غذایی انعطاف‌پذیر و قابل تنظیم بود) به واحدهای آزمایشی انتقال یافتند؛ و تمام ریشه از طریق سوراخ تعبیه شده در ته لوله در داخل محلول غذایی قرار گرفت. برای تأمین شرایط رشد گیاه، درجه حرارت روز و شب به ترتیب در ۲±۲۵ و ۲±۲۰ درجه سلسیوس، طول دوره روشنایی ۱۶ ساعت و متوسط شدت نور ۱۹۶ میکرومول فوتون بر متر مربع در ثانیه در اتاقک رشد به مدت ۴۵ روز برقرار گردید و با اضافه کردن آب مقطر استریل نیز حجم محلول غذایی در حد ۷۰ میلی‌لیتر حفظ شد.

طرح آزمایشی

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل: تلقیح بذور گندم با ۱۶ جدایه باکتری (B1, B2, ...) و کشت بذور جوانه‌دار در محلول غذایی هوگلند حاوی تری کلسیم فسفات (PT)، و همچنین کشت بذور ضدعفونی سطحی و جوانه‌دار شده (شاهد: B0) در محلول غذایی هوگلند حاوی مونو پتاسیم فسفات (P_{Ava}) (فسفر محلول) و تری کلسیم فسفات (P_T) (فسفر نامحلول)، با سه تکرار جمعاً در ۵۴ واحد کشت درون شیشه انجام شد.

برداشت محصول و اندازه‌گیری صفات

چهل و پنج روز پس از کشت جوانه‌های گندم درون لوله‌های کشت (واحدهای آزمایشی)، اندام هوایی و ریشه گیاهان به صورت جداگانه برداشت گردید؛ و طول و وزن تر هر بخش اندازه‌گیری شد. جمعیت PSB کلنیزه شده در سطح ریشه با روش رقیق‌سازی ۱۰ برابری و کشت بر روی محیط کشت اسپربر-آگار[1] (۲۸) اندازه‌گیری گردید. سپس pH و فسفر قابل دسترس در محلول غذایی (۱۷) (میانگین میزان فسفر محلول در شاهد دوگانه از میزان فسفر محلول در هر یک از واحدهای آزمایشی که دارای تری کلسیم فسفات بود کم شد)، و وزن خشک ریشه و اندام هوایی با ترازوی ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شد و محتوی آب نسبی برگ (RWC)[2] محاسبه گردید (۳۳). همچنین غلظت فسفر گیاه پس از هضم تر کل ماده خشک (ریشه و اندام هوایی گیاهان)، با روش رنگ سنجی (فسفو وانادو مولیبدات-روش زرد) تعیین شد (۳۴) و میزان جذب فسفر[3] از حاصلضرب غلظت فسفر در ماده خشک برای کل گیاه محاسبه گردید.

آنالیز آماری

به علت خشک شدن گیاهان تلقیح شده با جدایه B18، تجزیه آماری داده‌ها با نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها نیز به روش آزمون توکی (HSD) در $P < 0.05$ فقط برای داده‌های ۵۱ واحد آزمایشی انجام شد.

نتایج و بحث

گیاهان تلقیح شده با جدایه B18 در هر سه تکرار فاقد رشد بودند و چند روز پس از انتقال به واحدهای آزمایشی خشک شدند؛ به این علت داده‌ای برای گیاهان تیمار شده با این جدایه اندازه‌گیری نشد. به نظر می‌رسد این جدایه بیماریزای شدید گیاهی بوده یا متابولیت‌های تولید شده بوسیله جدایه B18 به شدت برای جوانه گندم بازدارنده بوده که در مدت کوتاهی باعث مرگ گیاهچه شد.

با توجه به جدول ۱، اثرات اصلی تیمار جدایه‌های باکتری بر جمعیت جدایه‌های PSB در سطح ریشه، غلظت فسفر قابل دسترس در محلول غذایی، pH محلول غذایی، طول ریشه، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، وزن

1- Sperber-Agar
2- Relative Water Content (RWC)
3- P-Uptake

تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی و RWC در سطح احتمال یک درصد و بر ارتفاع اندام هوایی در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار شد.

جمعیت PSB کلنیزه شده در سطح ریشه

بیشترین و کمترین جمعیت در سطح ریشه به ترتیب مربوط به جدایه‌های B29 (که اختلاف معنی‌داری با B11 نداشت) و B14 است. همچنین به استثنای جدایه‌های B14، B17 و B32 که جمعیت‌شان کمتر از ۶×۱۰^{۴} CFU بر گرم وزن تر ریشه بود؛ بقیه جدایه‌ها جمعیت بالای ۶×۱۰^{۶} CFU بر گرم وزن تر ریشه داشتند (شکل ۱). کلنیزاسیون PGPR در سطح ریشه گیاهان از مهمترین اصول در روابط گیاه-PGPR است تا این ریزجانداران بتوانند اثرات مثبت خود را بر رشد و نمو گیاهان نشان دهند (۸، ۳۵). پژوهش‌ها نیز نشان می‌دهد که اغلب از باکتری‌هایی بعنوان محرک‌های رشد گیاهان و عوامل کنترل بیولوژیکی بیماری‌ها استفاده می‌شود که توان کلنیزاسیون بالایی در سطح ریشه دارند (۲۱، ۳۶). با توجه به شکل ۱، به نظر می‌رسد جدایه‌های B (1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 15, 19, 20, 26, 29)، سازگاری بالایی با ریشه گندم دارند؛ زیرا به راحتی می‌توانند در سطح ریشه گندم کلنیزه شوند.

غلظت فسفر قابل استفاده در محلول غذایی

تمامی جدایه‌های باکتری نسبت به $B0P_T$ باعث افزایش معنی‌دار غلظت فسفر محلول غذایی شدند. همچنین تیمارهای B (4, 5, 11, 15, 19, 20, 26, 32)، نسبت به $B0P_{Ava}$ اختلاف معنی‌داری از نظر این صفت نداشتند؛ که در کل نشان دهنده قابلیت بالای این جدایه‌ها در انحلال و آزادسازی فسفر از منبع نامحلول آن (تری کلسیم فسفات) است (شکل ۱). کائور و ردی[1] (۱۴) نیز بیان کردند که تلقیح گندم با PSB موجب افزایش فراهمی فسفر در خاک گردید. همچنین در پژوهشی دیگر اظهار شد که PGPR بطور قابل ملاحظه‌ای آزادسازی فسفر را از منابع مختلف آن افزایش داد (۱). در کل انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه موضوعی اثبات شده می‌باشد که با فرایندهای کلات کردن (۲۲)، ترشح ترکیبات کمپلکس کننده یا حل‌کننده مانند اسیدهای غیر آلی (۲۹) و اسید-های آلی (۲۶) انجام می‌شود.

pH محلول غذایی

تمامی جدایه‌های باکتری نسبت به $B0P_{Ava}$ و $B0P_T$، باعث کاهش معنی‌دار pH محلول غذایی شدند. بیشترین و کمترین این صفت به ترتیب مربوط به $B0P_{Ava}$ و جدایه B15 (که اختلاف معنی‌داری با جدایه‌های B (3, 4, 5, 6, 11, 15, 17, 19, 20, 26, 29, 32) نیز نداشت) بود (شکل ۱). انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی توسط PSB، با مکانیسم‌های متعدد از جمله تولید اسیدهای غیر آلی (۲۹) و به ویژه اسیدهای آلی که مکانیسم اصلی انحلال فسفات های معدنی توسط این ریزجانداران می‌باشد (۲۶)، اثبات شده است. بنابراین کاهش pH محلول غذایی در تیمارهایی که از باکتری حل‌کننده فسفات استفاده شده منطقی به نظر می‌رسد.

طول، وزن تر و خشک ریشه

بیشترین و کمترین طول، وزن تر و خشک ریشه به ترتیب مربوط به گیاهان گندم تلقیح شده با جدایه‌های B3 و B15 است. طول ریشه گندم در $B0P_T$ بعد از تیمار جدایه B3 و $B0P_{Ava}$، در جایگاه سوم قرار داشت. تیمارهای B (1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 14, 17, 19, 32) و B (1, 3, 4, 5, 6, 32) به ترتیب نسبت به B0PT، به‌طور معنی‌داری وزن تر و خشک ریشه را افزایش دادند؛ البته کارایی بعضی از این تیمارها مانند B (1, 3, 4, 5, 6, 32) و B (3, 4, 6) به ترتیب از نظر افزایش وزن تر و خشک ریشه به اندازه‌ای بود که باعث برتری آنها نسبت به $B0P_{Ava}$ (دارای فسفر قابل دسترس کافی است) نیز شد (جدول ۲). وزن کم ریشه در $B0P_T$ نسبت به اغلب تیمار جدایه‌های باکتری نشان می‌دهد که ریشه توسعه و گسترش کافی نداشته است؛ با توجه به شکل ۱، به نظر

1- Kaur and Reddy

جدول(۱) تجزیه واریانس اثر جدایه‌های باکتری بر صفات اندازه‌گیری شده در محلول غذایی و گیاه

Table (1) ANOVA of bacterial isolates effect on measured traits in nutrient solution and plant

منابع Source	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات Mean Square									
		PSB	PCS	pHS	RLe	RFW	RDW	SHe	SFW	SDW	RWC
جدایه‌های باکتری Bacterial isolates	16	20.47**	43.27**	0.10**	22.90**	0.03**	0.00**	62.33*	0.10**	0.00**	119.48**
خطا Error	34	0.00	0.80	0.00	0.03	0.00	0.00	2.16	0.00	0.00	1.27
ضریب تغییرات (CV)		0.41	4.43	0.52	2.14	5.69	17.73	5.57	2.15	2.31	1.55

PSB: جمعیت جدایه‌های حل‌کننده فسفات در سطح ریشه؛ PCS: غلظت فسفر قابل دسترس در محلول غذایی؛ pHS: pH محلول غذایی؛ RLe: طول ریشه؛ RFW: وزن تر ریشه؛ RDW: وزن خشک ریشه؛ SHe: ارتفاع اندام هوایی؛ SFW: وزن تر اندام هوایی؛ SDW: وزن خشک اندام هوایی؛ RWC: محتوی آب نسبی برگ؛ * و ** به ترتیب معنی‌داری در $P<0.05$ و $P<0.01$ است.

PSB: Population of phosphate solubilizing bacteria on root surface; PCS: Concentration of available phosphorus in nutrient solution; pH: pH of nutrient solution; RLe: Root length; RFW: Root fresh weight; RDW: Root dry weight; SHe: Shoot height; SFW: Shoot fresh weight; SDW: Shoot dry weight; RWC: Relative water content; * and ** significant at $P<0.05$ and $P<0.01$ respectively

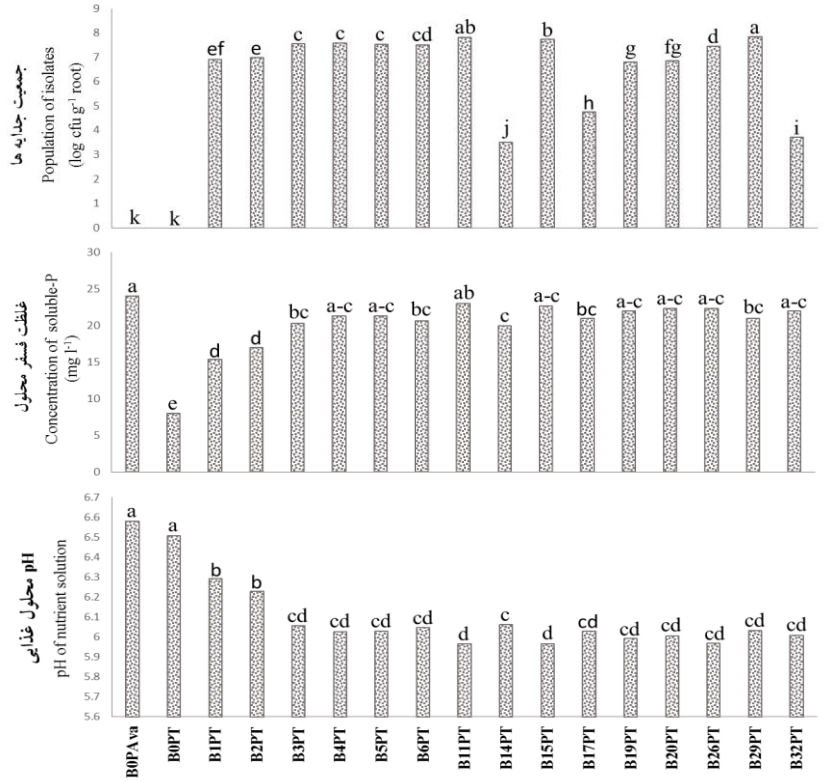
می‌رسد که افزایش رشد طولی ریشه در $B0P_T$ نیز می‌تواند به دلیل کمبود فسفر قابل دسترس در محلول غذایی باشد که سبب تحریک رشد طولی آن به سمت رسوبات تری کلسیم فسفات در ته لوله شده است. در مورد تأثیر PGPR بر وزن ریشه نیز می‌توان گفت که در اغلب موارد تلقیح گیاهان با این ریزجانداران به علت ویژگی‌های محرک رشدی این باکتری‌ها در شرایط تنش و غیر تنش، رشد ریشه گیاهان افزایش می‌یابد. برای مثال: پژوهش بانو و همکاران[1] (۵) نشان داد که تلقیح گیاه ذرت با *Azospirillum lipoferum* در شرایط غیر تنشی و تنش کم‌آبی، وزن خشک ریشه گیاه را افزایش داد. در پژوهشی دیگر سوآرز و همکاران[2] (۳۰) بیان کردند که تلقیح گیاه جو با باکتری *Hartmannibacter diazotrophicus* در شرایط تنش شوری باعث افزایش این شاخص در گیاه شد. ساپره و همکاران[3] (۲۵) نیز در پژوهشی اثر تنش شوری و تلقیح یولاف با باکتری *klebsiella* را در کشت هیدروپونیک بررسی کردند؛ نتایج نشان داد که در سطح بدون تنش و شوری ۱۰۰ میلی مولار وزن ریشه گیاه تلقیح شده با این باکتری به طور معنی‌داری افزایش یافت.

ارتفاع، وزن تر و خشک اندام هوایی

بیشترین و کمترین ارتفاع، وزن تر و خشک اندام هوایی به ترتیب مربوط به گیاهان گندم تلقیح شده با جدایه‌های B3 و B15 بود. تیمارهای B (1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 17, 32) نسبت به $B0P_T$ به‌طور معنی‌داری این صفت‌ها را افزایش دادند. حتی تیمارهای B3 و B4 نسبت به $B0P_{Ava}$ نیز وزن تر و خشک اندام هوایی را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند (جدول ۲). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که تلقیح گیاهان با PGPR در شرایط تنش خشکی و شوری باعث افزایش عملکرد اندام هوایی گیاهان می‌شود. زیرا این ریزجانداران با مکانیسم‌هایی رشد گیاهان را بهبود می‌بخشند و در مقابل تنش‌ها مقاوم می‌کنند در نتیجه تولید محصول افزایش می‌یابد (۱۰، ۱۳). البته این افزایش در عملکرد و شاخص‌های رشد به پتانسیل باکتری‌های محرک رشد گیاه بستگی دارد؛

1- Bano *et al.*
2- Suarez *et al.*
3- Sapre *et al.*

و از یک جدایه باکتری به جدایه دیگر و در شرایط مختلف، متفاوت می‌باشد (۵، ۲۷، ۳۰). همچنین گاهی اثرات غیرمعنی‌دار یا حتی کاهش رشد گیاهان در اثر تلقیح با انواعی از PGPR، مشاهده می‌شود.



شکل (۱) جمعیت جدایه‌های PSB کلنیزه شده در سطح ریشه و تأثیر آنها بر غلظت فسفر و pH محلول غذایی

Figure (1) Population of colonized PSB isolates on root surface and their effects on phosphorus concentration and pH of nutrient solution

(B1، B2، B3 و ...: به ترتیب تیمار جدایه‌های باکتری، B0: بدون تلقیح با باکتری، P_{Ava} و P_T: به ترتیب محلول غذایی هوگلند حاوی مونو پتاسیم فسفات و تری کلسیم فسفات می‌باشد. حروف مشترک در بالای ستون ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در $P<0.05$ می‌باشند.

B1, B2, B3 and …: treatments of bacterial isolates respectively; B0: non-inoculated with bacterium; P_{Ava} and P_T: Hoagland solution contains mono potassium phosphate and tricalcium phosphate respectively; same letters at the top of columns show no significant difference at $P<0.05$

در این راستا دلفیم و همکاران[1] (۹) نیز بیان کردند که تلقیح گندم با *Bacillus thuringiensis* در خاک‌های مختلف اثرات متفاوتی (مثبت یا منفی) بر رشد گیاه و خاک داشت.

محتوی آب نسبی برگ

بیشترین RWC در تیمار جدایه‌های B3 و B4، و کمترین این صفت در تیمار جدایه B15 مشاهده شد. همچنین تیمار جدایه‌های B (1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 17, 32) نسبت به $B0P_{Ava}$ و $B0P_T$، به‌طور معنی‌داری این صفت را افزایش دادند (جدول ۲). پژوهش‌ها نشان می‌دهد که PSB علاوه بر انحلال فسفات‌های نامحلول و اثرات PGP، در اغلب موارد با افزایش RWC به عنوان عامل افزایش دهنده تحمل و مقاومت گیاهان به تنش‌های کم‌آبی نیز مطرح هستند (۲، ۳۲).

غلظت و جذب فسفر گیاه

تیمارهای B4 و B11 با ۰/۷۹ درصد و $B0P_T$ با ۰/۴۱ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین غلظت فسفر گیاه را به خود اختصاص دادند. همچنین در تمامی تیمارها غلظت فسفر گیاه بالاتر از $B0P_T$ بود (جدول ۲).

تیمار B3 و $B0P_T$ به ترتیب با ۲/۰۷ و ۰/۳۷ میلی‌گرم، به ترتیب بیشترین و کمترین جذب فسفر گیاه را به خود اختصاص دادند. همچنین جذب فسفر گیاه در تمامی تیمارها بالاتر از $B0P_T$ قرار داشت؛ حتی تیمارهای B (3, 4, 5, 6, 14, 17, 32)، از این نظر بالاتر از $B0P_{Ava}$ قرار گرفتند (جدول ۲). یکی از مکانیسم‌های اثبات شده PSB در افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های کم‌آبی و شوری، افزایش قابلیت جذب و محتوی فسفر گیاهان است (۱۰).

همبستگی بین صفت‌ها

با توجه به جدول ۳، میان جذب فسفر، RWC، طول ریشه، ارتفاع اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه گندم، همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت. همچنین pH محلول غذایی با طول ریشه همبستگی مثبت، ولی با غلظت فسفر محلول غذایی و غلظت فسفر گیاه همبستگی منفی و معنی‌دار داشت. این نتایج نشان دهنده اثرات منفی کاهش pH محلول غذایی بر طول ریشه است؛ ولی کاهش pH باعث افزایش غلظت فسفر محلول غذایی و متعاقباً غلظت فسفر گیاه می‌شود. جمعیت PSB کلنیزه شده در سطح ریشه با pH محلول غذایی و طول ریشه گیاه همبستگی منفی، ولی با غلظت فسفر محلول غذایی همبستگی مثبت و معنی‌دار داشت. این نتایج نیز نشان می‌دهد که افزایش جمعیت PSB کلنیزه شده در سطح ریشه سبب کاهش pH محلول غذایی می‌شود که این عامل باعث افزایش غلظت فسفر محلول غذایی و کاهش طول ریشه گیاه می‌گردد. البته جمعیت PSB کلنیزه شده در سطح ریشه با RWC، غلظت و جذب فسفر گیاه، ارتفاع اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه گندم، همبستگی معنی‌داری نداشت. این نتایج نشان می‌دهد که تنها فاکتور جمعیت PSB کلنیزه شده در سطح ریشه بر این صفات نمی‌تواند تأثیر گذار باشد؛ ولی با توجه به شکل ۱ و جدول ۲، چنین به نظر می‌رسد که نوع جدایه PSB همراه با فاکتور جمعیت کلنیزه شده آن در سطح ریشه می‌تواند عامل تأثیر گذار بر این صفات باشند. برای مثال جمعیت جدایه باکتری B15 کلنیزه شده در سطح ریشه نسبت به جدایه B3، ۱/۵ برابر بود؛ ولی تیمار جدایه B3 نسبت به جدایه B15، RWC، جذب فسفر گیاه، طول ریشه، ارتفاع اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه گندم را تا چندین برابر افزایش داد. البته RWC، طول ریشه، ارتفاع اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه گندم، با فسفر قابل دسترس محلول غذایی نیز همبستگی معنی‌داری نداشت. با توجه به شکل ۱، غلظت فسفر قابل دسترس در تمامی تیمارها به استثنای $B0P_T$ بالاتر از حد بحرانی فسفر برای گندم است (۱۶). علاوه بر این رشد و نمو گیاهان به فاکتورهای خیلی زیادی بستگی دارد که یکی از آنها تأمین عناصر غذایی ضروری است؛ بنابراین گاهی علی‌رغم افزایش فسفر قابل دسترس، رشد و نمو گیاه افزایش نمی‌یابد (۱۲). البته PSB علاوه بر تأمین فسفر برای گیاه، از طریق مکانیسم‌های دیگر همچون تولید آنزیم ACC-d[2]، تجمع اسمولیت‌ها و کمک به تعادل یونی در گیاه، القاء تولید

1- Delfim *et al.*

2- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase

آنزیم‌های آنتی اکسیدان و القاء مقاومت سیستمیک در گیاه، و تولید مواد پلیمری برون سلولی، گیاهان را می‌توانند در مقابل تنش‌ها مقاوم کنند؛ در نتیجه رشد و نمو گیاهان بهبود می‌یابد (۱۰، ۱۳). بنابراین به نظر می‌رسد آنچه باعث ایجاد تفاوت در شاخص‌های رشد گیاه گندم در تیمارهای مختلف جدایه‌ها شده، تنها به فراهمی فسفر برای گیاه مربوط نیست؛ بلکه برآیند مجموعه از اثرات PGP این باکتری‌ها و نیز احتمالاً ترشح متابولیت‌های مضر برای گیاه گندم بوسیله بعضی از این میکروارگانیسم‌ها است.

جدول (۲) اثر جدایه‌های باکتری بر شاخص‌های رشد، محتوی آب نسبی برگ، غلظت و جذب فسفر گیاه گندم

Table (2) The effect of bacterial isolates on growth indices, relative water content, phosphorus concentration and uptake of wheat plant

تیمارها treatments	طول ریشه Root length (mm plant^{-1})	وزن تر ریشه Root fresh weight (mg plant^{-1})	وزن خشک ریشه Root dry weight (mg plant^{-1})	طول اندام هوایی Shoot height (mm plant^{-1})	وزن تر اندام هوایی Shoot fresh weight (mg plant^{-1})	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (mg plant^{-1})	محتوی آب نسبی برگ Relative water content (%)	غلظت فسفر گیاه P-concentration of plant (%)	جذب فسفر گیاه P-uptake of plant (mg plants^{-1})
B0PAva	124 b	48 e	5 d-f	304 a-c	630 b	63 b	69.26 d	0.52	1.06
B0PT	117 c	30 h	3 fg	206 fg	260 f	27 f	65.78 ef	0.41	0.37
B1PT	65 i	77 d	8 bd	279 cd	593 cd	56 de	76.41 bc	0.43	0.83
B2PT	68 hi	40 e-g	4 e-g	294 a-c	630 b	60 bc	78.00 b	0.5	0.96
B3PT	134 a	150 a	17 a	334 a	710 a	71 a	83.00 a	0.78	2.07
B4PT	78 ef	90 c	10 bc	328 ab	680 a	68 a	82.69 a	0.79	1.86
B5PT	85 d	70 d	7 c-e	292 a-c	621 bc	59 cd	76.47 bc	0.74	1.46
B6PT	116 c	100 b	11 b	288 b-c	595 cd	57 cd	77.47 b	0.73	1.48
B11PT	112 c	44 ef	5 d-f	210 fg	265 f	27 f	67.26 d-f	0.79	0.76
B14PT	74 fg	42 ef	5 d-f	296 a-c	585 d	59 cd	75.88 bc	0.67	1.29
B15PT	31 k	7 i	1 g	168 g	220 g	23 g	64.00 f	0.78	0.56
B17PT	71 gh	43 ef	5 d-f	263c-e	530 e	53 e	73.69 c	0.7	1.22
B19PT	80 de	45 e	5 d-f	234 ef	268 f	26 fg	68.92 de	0.77	0.72
B20PT	68 hi	35 f-h	4 e-g	233 ef	269 f	26 fg	65.78 ef	0.75	0.68
B26PT	55 j	32 gh	3 fg	233 ef	270 f	26 fg	65.48 f	0.77	0.68
B29PT	68 hi	30 h	3 fg	241 d-f	260 f	25 fg	65.33 f	0.49	0.41
B32PT	73 fh	87 c	8 bd	281 cd	580 d	53 e	75.75 bc	0.77	1.4

(B1، B2، B3 و ...: به ترتیب تیمار جدایه‌های باکتری، B0: بدون تلقیح با باکتری، P_{Ava} و P_T: به ترتیب محلول غذایی هوگلند حاوی مونو پتاسیم فسفات و تری کلسیم فسفات می‌باشد. حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در $P<0.05$ می‌باشند.

B1, B2, B3 and …: treatments of bacteria isolates respectively; B0: non-inoculated with bacterium; P_{Ava} and P_T: Hoagland solution contains mono potassium phosphate and tricalcium phosphate respectively; same letters in each column show no significant difference at $P<0.05$

جدول (۳) همبستگی (پیرسون) بین صفات اندازه‌گیری شده

Table (3) Correlation (Pearson) among measured traits

	PSB	RLe	RFW	RDW	SHe	SFW	SDW	PCS	pHS	PCP	PUP
RLe	-0.36**										
RFW	0.18^{ns}	0.54**									
RDW	0.20^{ns}	0.55**	0.96**								
SHe	-0.04^{ns}	0.37**	0.72**	0.69**							
SFW	0.09^{ns}	0.33*	0.72**	0.68**	0.90**						
SDW	-0.12^{ns}	0.36*	0.71**	0.70**	0.90**	0.99**					
PCS	0.38**	-0.17^{ns}	0.03^{ns}	0.05^{ns}	0.10^{ns}	0.02^{ns}	0.02^{ns}				
pHS	-0.76**	0.43**	-0.07^{ns}	-0.10^{ns}	0.14^{ns}	0.20^{ns}	0.22^{ns}	-0.56*			
PCP	0.06^{ns}	0.11^{ns}	0.21^{ns}	0.27^{ns}	-0.08^{ns}	0.02^{ns}	-0.03^{ns}	0.69**	-0.80**		
PUP	0.12^{ns}	0.42**	0.83**	0.86**	0.77**	0.83**	0.86**	0.25^{ns}	-0.18^{ns}	0.43^{ns}	
RWC	0.15^{ns}	0.27^{ns}	0.80**	0.78**	0.83**	0.91**	0.90**	-0.05^{ns}	-0.04^{ns}	0.12^{ns}	0.87**

PSB: جمعیت جدایه‌های حل‌کننده فسفات در سطح ریشه؛ RLe: طول ریشه؛ RFW: وزن تر ریشه؛ RDW: وزن خشک ریشه؛ SHe: ارتفاع اندام هوایی؛ SFW: وزن تر اندام هوایی؛ SDW: وزن خشک اندام هوایی؛ PCS: غلظت فسفر قابل دسترس در محلول غذایی؛ pHS: pH محلول غذایی؛ PCP: غلظت فسفر گیاه؛ PUP: جذب فسفر گیاه؛ RWC: محتوی آب نسبی برگ؛ ^{ns}، * و **: غیر معنی‌دار، به ترتیب معنی‌داری در $P<0.05$ و $P<0.01$ است.

PSB: Population of phosphate solubilizing bacteria on root surface; RLe: Root length; RFW: Root fresh weight; RDW: Root dry weight; SHe: Shoot height; SFW: Shoot fresh weight; SDW: Shoot dry weight; PCS: Concentration of available phosphorus in nutrient solution; pH: pH of nutrient solution; PCP: Phosphorus concentration of plant; PUP: Phosphorus uptake of plant; RWC: Relative water content; ^{ns}, * and ** : non-significant, significant at $P<0.05$ and $P<0.01$ respectively

نتیجه‌گیری

الزاماً تمامی جدایه‌های حل‌کننده فسفر منتخب در شرایط آزمایشگاهی، در تلقیح با گیاه اثرات PGP ندارند؛ حتی ممکن است برخی از این جدایه‌ها (مانند B15و B18) اثرات منفی بر شاخص‌های رشد گیاه گندم داشته باشند. ریشه گندم دیم رقم آذر ۲، قابلیت انحلال و جذب فسفر (هرچند در مقادیر کم) را از منبع تری‌کلسیم فسفات دارد؛ البته تلقیح گندم با جدایه‌های PSB این توانایی را به میزان قابل توجهی افزایش داد. قابلیت انحلال تری‌کلسیم فسفات به وسیله جدایه‌ها و افزایش فراهمی فسفر به تنهایی نمی‌تواند باعث افزایش شاخص‌های رشد گیاه گندم شود؛ بلکه برآیند مجموعه از اثرات محرک رشدی این باکتری‌ها و ترشح متابولیت‌های آن‌ها در حضور ریشه گیاه در این‌خصوص تعیین کننده می‌باشد. از میان ۱۶ جدایه مورد آزمایش، برترین‌ها به ترتیب شامل جدایه‌های B3، B4، B6، B5، B1 و B2 می‌باشند. زیرا این جدایه‌ها علاوه بر توان بالای کلنیزاسیون در سطح ریشه، باعث افزایش شاخص‌های رشد گیاه گندم نیز شدند (که نشان دهنده سازگاری بالای این جدایه‌ها و گیاه گندم می‌باشد) و برای آزمایش‌های تکمیلی در بسترهای خاکی گلخانه و مزرعه استفاده از این جدایه‌ها توصیه می‌شوند.

منابع

1. Adnan, M., Shah, Z., Fahad, S., Arif, M., Alam, M., Khan, I.A., Mian, I.A., Basir, A., Ullah, H., and Arshad, M. 2017. Phosphate-solubilizing bacteria nullify the antagonistic effect of soil calcification on bioavailability of phosphorus in alkaline soils. Scientific Reports, 7: 1-13.

2. Ahmad, M., Adil, Z., Hussain, A. Mumtaz, M.Z., Nafees, M., Ahmad, I., and Moazzam, J. 2019. Potential of phosphate solubilizing *bacillus* strains for improving

growth and nutrient uptake in mungbean and maize crops. Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 56(2): 283-289.

3. Akhtar, S.S., Andersen M.N., and Liua, F. 2015. Residual effects of biochar on improving growth, physiology and yield of wheat under salt stress. Agricultural Water Management, 158: 61–68.

4. Awais, M., Tariqa, M., Ali, A., Ali, Q., Khan, A., Tabassum, B., Nasir, I.A., and T. Husnain. 2017. Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 11: 312–321.

5. Bano, Q., Ilyas, N., Bano, A., Zafar, N., Akram A., and Ul-Hassan, F. 2013. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. Pakistan Journal of Botany, 45: 13–20.

6. Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S.S., Pandey, A., Chanotiya, C.S., and Kalra, A. 2017. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. Physiologia Plantarum, 161: 502-514.

7. Bashan, Y., Kamnev, A.A., and Bashan, L.E. 2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biology and Fertility of Soils, 49: 465–479.

8. Compant, S., Clement, C., and Sessitsch, A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. Soil Biology and Biochemistry, 42: 669–678.

9. Delfim, J., Schoebitz, M., Paulino, L., Hirzel J., and Zagal, E. 2018. Phosphorus availability in wheat, in volcanic soils inoculated with phosphate-solubilizing *Bacillus thuringiensis*. Sustainability, 10: 1-15.

10. Etesami, H., and Maheshwari, D.K. 2018. Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. Ecotoxicology and Environmental Safety, 156: 225–246.

11. Joe, M.M., Deivaraj, S., Benson, A., Henry, A.J., and Narendrakumar, G. 2018. Soil extract calcium phosphate media for screening of phosphate-solubilizing bacteria. Agriculture and Natural Resources, 52: 305-308.

12. Jeshni, M.G., Mousavinik, M., Khammari I., and Rahimi. M. 2017. The changes of yield and essential oil components of German Chamomile (*Matricaria recutita* L.) under application of phosphorus and zinc fertilizers and drought stress conditions. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 16: 60–65.

13. Kadmiri, I.M., Chaouqui, L., Azaroual, S.E., Sijilmassi, B., Yaakoubi K., and Wahby, I. 2018. Phosphate-solubilizing and auxin-producing rhizobacteria promote plant

growth under saline conditions. Arabian Journal for Science and Engineering, 43: 3403–3415.

14. Kaur, G., and Reddy, M.S. 2014. Influence of P-solubilizing bacteria on crop yield and soil fertility at multi locational sites. European Journal of Soil Biology. 1-6.

15. Kaur, G., and Reddy, M.S. 2015. Effects of Phosphate-solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize-wheat cropping cycle and economics. Pedosphere, 25: 428–437.

16. Malekutey, M. J. and M. N. Gheybi. 1997. Determination of the critical level of the nutritional elements in strategic products and the correct recommendation of fertilizer in the country. Agriculture Education Publication, Karaj. (in Persian)

17. Murphy, J., and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphorus in natural waters. Analytica Chimica Acta, 12: 31-36.

18. Nadeem, S.M., Zaheer, Z.A., Naveed, M., and Nawaz, S. 2013. Mitigation of salinityinduced negative impact on the growth and yield of wheat by plant growth-promoting rhizobacteria in naturally saline conditions. Annals of Microbiology, 63: 225–232.

19. Page, V., and Feller, U. 2013. Selection and hydroponic growth of bread wheat cultivars for bioregenerative life support systems. Advances in Space Research, 52: 536–546.

20. Pereyra, M.A., Garcia, P., Colabelli, M.N., Barassi C.A., and Creus, C.M. 2012. A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. Applied Soil Ecology, 53: 94-97.

21. Probanza, A., Mateos, J.L., Garcia, J.A.L., Ramos, B., Felipe M.R., and Manero, F.J.G. 2001. Effects of inoculation with PGPR Bacillus and *Pisolithus tinctorius* on *Pinus pinea* L. growth, bacterial rhizosphere colonization, and mycorrhizal infection. Microbial Ecology, 41: 140–148.

22. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S., and Latif, F. 2004. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biological Sciences, 7: 187–196.

23. Saleemi, M., Kiani, M.Z., Sultan, T., Khalid, A., and Mahmood, S. 2017. Integrated effect of plant growth-promoting rhizobacteria and phosphate-solubilizing microorganisms on growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under rainfed condition. Agriculture and Food Security, 6:1-8.

24. Salem, G., Stromberger, M.E., Byrne, P.F., Manter, D.K., El-Fekid W., and Weir, T.L. 2018. Genotype-specific response of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) to irrigation and inoculation with ACC deaminase bacteria. Rhizosphere, 8: 1–7.

25. Sapre, S., Gontia-Mishra, I., and Tiwari, S. 2018. *Klebsiella* sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). Microbiological Research, 206: 25–3.

26. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi M.H., and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus, 2: 587.

27. Shukla, P.S., Agarwal, P.K., and Jha, B. 2012. Improved salinity tolerance of *Arachishypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. Journal of Plant Growth Regulation, 31: 195–206.

28. Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research, 9: 778.

29. Stamford, N.P., Santos, P.R., Moura, A.M.M.F., and Freitas, A.D.S. 2003. Biofertilizers with natural phosphate, sulphur and Acidithiobacillus in a soil with low available-P. Scientia Agricola, 60: 767–773.

30. Suarez, C., Cardinale, M., Ratering, S., Steffens, D., Jung, S., Montoya, A.M.Z., Schnella, R., and Geissler-Plauma, S. 2015. Plant growth-promoting effects of *Hartmannibacter diazotrophic* on summer barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. Applied Soil Ecology, 95: 23–30.

31. Upadhyay, S.K., Singh, J.S., and Singh, D.P. 2011. Exopolysaccharide-Producing plant growth-promoting rhizobacteria under salinity condition. Pedosphere, 21: 214–222.

32. Vidya, P., Shintu, V.P., and Jayaram, M.K. 2016. Impact of phopshate solubilizing bacteria (*Bacillus polymixa*) on drought tolerance of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. Annals of Plant Sciences, 5(4): 1318-1323.

33. Weatherley, P.E. 1950. Studies in water relations of cotton plants I, the field measurement of water deficit in leaves. New Phytologist, 49: 81-87.

34. Westerman, L.R. 1990. Soil Testing and Plant Analysis. Soil Science Society of America, INC. Madison, Wisconsin, USA.

35. Yuan, J., Zhang, N., Huang, Q., Raza, W., Li, R., Vivanco, J.M., and Shen, Q. 2015. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain Bacillus amyloliquefaciens NJN-6. Scientific Reports, 5: 1-8.

36. Zhang, N., Wu, K., He, X., Li, S., Zhang, Z., Shen, B., Yang, X., Zhang, R., Huang, Q., and Shen, Q. 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with Bacillus subtilis N11. Plant and Soil, 344: 87–97.