Nova Biologica Reperta 6(4): 402-414 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.6.4.402

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۴۰۲ الی ۴۱۴ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

غربال و شناسایی باکتری‌های بومی ایران با قابلیت محلول کنندگی فسفات و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از نشانگر RAPD

مهرنوش دانشور[۱]، محمود ملکی[۲]، شهریار شاکری[۲] و امین باقی‌زاده[۲]

[۱]دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، کرمان، ایران؛ [۲]گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

مسئول مکاتبات: محمود ملکی، m.maleki@kgut.ac.ir

چکیده. فسفر، یکی از ضروری‌ترین عناصر غذایی گیاهی، در خاک به سرعت به فرم غیرقابل دسترس برای گیاهان تبدیل می‌شود. باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول می‌توانند نقش مهمی در فراهم کردن این عنصر غذایی برای گیاهان ایفا کنند. به همین دلیل در این مطالعه این باکتری‌ها از محیط رایزوسفری گیاهان مختلف با استفاده از محیط کشت اختصاصی جامد پیکووسکی غربال شدند. سپس میزان رشد و میزان حل کنندگی فسفات نامحلول ۹ سویه برتر در دما، شوری و اسیدیته مختلف اندازه‌گیری شدند. بهترین سویه حل کننده فسفات نامحلول با تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rDNA شناسایی شدند. در پایان تنوع ژنتیکی بین تمامی سویه‌های حل‌کننده فسفات نیز با نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد از بین ۵۷ سویه جداسازی شده، ۲۵ سویه قابلیت حل-کنندگی فسفات نامحلول را داشتند. از بین ۹ سویه برتر، سویه Cke1 با این‌که میزان رشد متوسطی در تمامی شرایط تنشی اعمال شده داشت، بیش‌ترین شاخص محلول‌سازی را به خود اختصاص داد و به عنوان بهترین سویه حل‌کننده در همه شرایط مورد آزمایش شناخته شد. تجزیه و تحلیل ژنتیکی ژن 16S rDNA نیز نشان داد که این سویه متعلق به جنس *Enterobacter* است. نتایج تنوع ژنتیکی نیز نشان داد که تمامی سویه‌ها در ۶ گروه مختلف قرار می‌گیرند و ۳ سویه که کم‌ترین میزان تشابه را با سایر سویه‌ها داشتند در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند. با توجه به این‌که سویه Cke1 قابلیت خوبی برای محلول‌سازی فسفات نامحلول در شرایط مختلف تنشی نشان داده است، می‌تواند پتانسیل خوبی برای فراهم کردن عنصر فسفر در دماهای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد، شوری ۱/۲ و ۱/۸ درصد و اسیدیته ۶ و ۸ برای گیاهان زراعی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی. رایزوباکتری، رایزوسفر گیاهان، اینتروباکتر، نشانگر مولکولی، تنش شوری

Screening and identification of Iranian native phosphate solubilizing bacteria and investigation of their genetic diversity using RAPD markers

Mehrnoush Daneshvar[1], Mahmood Maleki[2], Shahryar Shakeri[2] & Amin Baghizadeh[2]

[1]Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran; [2]Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
Correspondent author: Mahmood Maleki, m.maleki@kgut.ac.ir

Abstract. Phosphorus, the most essential nutrient for plants, becomes quickly unavailable for the plants in the soil. Phosphate solubilizing bacteria (PSB) can play an important role in providing Phosphorus for plants. In this study, the PSBs were screened from plant rhizosphere by Pikovskaya method. Then, the growth rate and phosphate solubilizing ability of 9 superior strains were measured at different temperatures and levels of salinity and pH. The best strain was identified by 16S rDNA gene sequence analysis. Finally, the genetic diversity of phosphate solubilizing strains were examined by RAPD markers. Results showed that 25 strains were capable of solubilizing insoluble phosphates among the 57 isolates studied. Of the nine superior strains, Cke1 had the highest solubilizing index with the average growth rate under all conditions and was introduced as the best PSB strain identified in the present study. 16S rDNA gene sequence analysis showed that this strain belonged to the *Enterobacter* genus. The results of genetic variation showed that all stains

Received 17.03.2017/ Revised 13.11.2018/ Accepted 16.02.2019/ Published 10.01.2020
دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۲۷/ اصلاح: ۱۳۹۷/۰۸/۲۲/ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷/ انتشار: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

were divided into six groups and three strains that had the lowest similarity with other strains were placed in three separate groups. Given that Cke1 strain has the ability of solubilizing the insoluble phosphate in different stresses, it can be a good candidate for providing phosphorus at temperatures of 30 and 35 °C, 1.2% and 1.8% salinity levels and pH levels of 6 and 8 for the crops.

Keywords. rhizobacteria, plant rhizosphere, *Enterobacter*, molecular marker, salt stress

مقدمه

بعد از نیتروژن فسفر ضروری‌ترین عنصر غذایی برای گیاهان به شمار می‌رود که کمبود آن می‌تواند رشد و عملکرد گیاهان زراعی را به شدت کاهش دهد (Perez *et al*., 2007). فسفر با جذب شدن به سطح ذرات خاک و از طریق واکنش با کاتیون‌های خاک به ویژه آهن، آلومینیوم و کلسیم از دسترس خارج می‌شود (Harris *et al*., 2006). خاک‌های کشاورزی در ایران به طور غالب آهکی، دارای pH بالا و مقادیر پایین فسفر قابل دسترس برای گیاه هستند (Alikhani *et al*., 2007). کمبود فسفر هم می‌تواند به شدت رشد و عملکرد گیاه را محدود کند (Robson *et al*., 1981). به همین دلیل مقادیر زیادی از کودهای فسفره به منظور افزایش رشد گیاه به خاک اضافه می‌شوند که اثر نامطلوبی بر محیط زیست و نیز اقتصاد می‌گذارد (Syers *et al*., 2008) و منبع اصلی آلودگی فلزات سنگین در خاک‌های کشاورزی است (McLaughlin *et al*., 1996; Bolan *et al*., 2003). فسفات نامحلول توسط اسیدهای آلی و آنزیم‌های فسفاتاز تولید شده توسط گیاهان و میکروارگانیزم‌های خاک‌زی ساکن در محیط اطراف ریشه می‌تواند به فرم محلول تبدیل شود (Sahu & Jana, 2000).

محلول سازی فسفات معدنی یکی از قابلیت‌های بسیاری از Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) است که به میکروارگانیزم‌های حل کننده فسفات معروف هستند (Perez *et al*., 2007). بسیاری از PGPRها از طریق رهاسازی اسیدهای آلی کلاته کننده قادر به محلول سازی فسفات‌های نامحلول به روشی بی خطر برای محیط زیست هستند (Vessey *et al*., 2004).

عملکرد گیاهان زراعی تحت تاثیر تنش‌هایی مثل شوری، خشکی و تغییرات دمایی به دلیل نامناسب بودن مواد غذایی به طور قابل توجهی کم می‌شود (Munns 2002; Benlloch-Gonzalez *et al*., 2005). از طرفی رایزوباکتری‌ها گروهی از میکروارگانیزم‌ها هستند که با این شرایط سازگاری پیدا کرده‌اند (Tripathi *et al*., 1998; Yildirim *et al*., 2008) و می‌توانند از گیاهان در برابر شرایط نامساعد محیطی از طریق فراهم کردن مواد غذایی (مثل باکتری‌های حل کننده فسفات و تولید کننده سیدروفور) و یا از طریق تولید آنزیم ACC دآمیناز به جهت کاهش اثرات هورمون اتیلن حمایت کنند (Upadhyay *et al*., 2009).

تاکنون در مطالعات مختلف PGPRهای محلول کننده فسفات در شرایط طبیعی (Nautiyal *et al*., 2000; Aarab *et al*., 2015) و نیز شرایط تنش شوری (Malboobi *et al*., 2009; Nautiyal *et al*., 2000; Johri *et al*., 1999; Xiang *et al*., 2011)، دمایی (Nautiyal *et al*., 2000; Johri *et al*., 1999; Yadav *et al*., 2015) و نیز در pHهای مختلف (Nautiyal *et al*., 2000; Johri *et al*., 1999) از بین کل باکتری‌های موجود در رایزوسفر گیاهان جداسازی شده‌اند. این مطالعات نشان داده‌اند که برخی از رایزوباکتری‌ها قادر به محلول‌سازی فسفات نامحلول در شرایط مختلف هستند. همچنین مطالعات مختلفی هم تاثیر رایزوباکتری‌های حل کننده فسفات را بر روی عملکرد گیاهان زراعی در شرایط مختلف نرمال و تنشی نشان داده‌اند (Afzal *et al*., 2005; Young *et al*., 2003).

به دلیل این‌که در ایران تنش‌هایی مثل شوری، دماهای بالا و نیز اسیدیته خاک به شدت عملکرد گیاهان زراعی را تحت تاثیر قرار داده است، و از طرفی به دلیل زمان‌بر و پر هزینه و نیز مشکل بودن تولید گیاهان متحمل به تنش‌های فوق‌الذکر، یکی از بهترین شیوه‌ها جهت کمک به گیاهان زراعی برای تحمل بهتر شرایط تنشی، استفاده از رایزوباکتری‌ها با قابلیت‌های مختلف است. در این مطالعه باکتری‌های PGPR محلول کننده فسفات بومی ایران در شرایط تنشی مختلف جداسازی و بهترین آن‌ها شناسایی شدند و نیز تنوع ژنتیکی بین آن‌ها نیز با استفاده از نشانگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و غربال عمومی باکتری‌های PGPR از محیط ریزوسفری گیاه

به منظور جداسازی و غربال رایزوباکتری‌های محلول کننده فسفات نامحلول، نمونه‌های خاک از عمق ۵ الی ۱۰ سانتی‌متری و از محیط رایزوسفری ریشه گیاهان مختلف واقع در استان‌های مختلف تهیه شد (جدول ۲). نمونه خاک مورد نظر در شرایط استریل به وسیله هاون چینی به طور کامل خرد گردیده و یک گرم آن برای تهیه رقت‌های 10^{-6} -10^{-1} و با استفاده از سرم

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

فیزیولوژی به کار رفت. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت 10^{-6} بر روی محیط کشت آگار مغذی تلقیح و گسترده شد. محیط کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. پس از ظهور کلونی‌ها، باکتری‌های مختلف به صورت تک کلونی برداشت و کشت دوباره شدند و برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Galledari *et al*., 2015; Ouzhand *et al*., 2016).

جداسازی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شرایط نرمال و با استفاده از محیط کشت اختصاصی پیکووسکی

برای جداسازی سویه‌های محلول کننده فسفات از محیط کشت اختصاصی پیکووسکی استفاده گردید (Pikovskaya, 1948). مواد تشکیل دهنده این محیط کشت شامل گلوکز (۱۰ گرم بر لیتر)، آگار (۱۵ گرم بر لیتر)، $CaHPO_4$ (۵ گرم بر لیتر)، کلرید آمونیم (۱ گرم بر لیتر)، سولفات منیزیم (۱ گرم بر لیتر)، عصاره مخمر (۱ گرم بر لیتر)، کلرید سدیم (۰/۵ گرم بر لیتر) و سولفات آهن (۰/۰۰۲ گرم بر لیتر) است. پس از اتوکلاو شدن، محلول پیکووسکی زیر هود درون پلیت ریخته و پس از بستن محیط کشت اختصاصی، ۵ میکرولیتر از سویه‌های جدا شده زیر هود و در شرایط کاملا استریل برداشته و به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت اختصاصی فسفات کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند. سپس کلنی‌ها از نظر تشکیل هاله شفاف مورد بررسی قرار گرفتند (Nguyen *et al*., 1992; Nautiyal, 1999). شاخص محلول سازی از طریق فرمول زیر به دست آمد (Nguyen *et al*., 1992; Nautiyal, 1999).

قطر کلونی/(قطر کلونی + قطر هاله) = شاخص محلول سازی فسفات (PSI)

در مرحله بعد و بر اساس شاخص محلول‌سازی و با استفاده از نرم افزارهای Excel و SAS 9.4 سویه‌های باکتریایی با هم مقایسه شدند. در این مرحله سویه‌های با قابلیت حلالیت بالاتر انتخاب شدند و برای سنجش میزان رشد و نیز قابلیت محلول سازی فسفات در شرایط مختلف تنشی مورد بررسی قرار گرفتند.

بررسی رشد سویه‌های باکتریایی برتر در شرایط تنش شوری، دما و pH

برای بررسی رشد ۹ سویه برتر از محیط کشت مایع پیکووسکی استفاده شد. سپس محیط تلقیح شده با باکتری به میکروپلیت اضافه و هر میکروپلیت به طور جداگانه در دماهای ۵، ۱۵و ۳۵ درجه سانتی‌گراد، شوری‌های مختلف برحسب میلی‌مولار (۰، ۱۷، ۵۸، ۱۰۲، ۱۳۶، ۲۰۵، ۳۰۸، ۵۱۳، ۸۲۱، ۱۰۲۶) و pHهای ۶ و ۸ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس میزان جذب نوری آن‌ها توسط دستگاه Automated Microplate Reader/ELx808 خوانده شد. داده‌ها یادداشت شده و توسط نرم افزار اکسل و SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

بررسی قابلیت محلول سازی فسفات نامحلول توسط سویه‌های باکتریایی برتر در شرایط تنش شوری، دما و pH

برای تعیین شاخص محلول‌سازی فسفات در حضور دماهای ذکر شده در مرحله قبل، شوری‌های مختلف و pHهای مختلف، محیط جامد پیکوسکی توسط سویه‌های منتخب تلقیح شدند و سپس شاخص محلول سازی آن‌ها در شرایط ذکر شده به دست آمد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از توالی یابی ژن 16S rDNA

DNA ژنومی بر طبق روش پیشین استخراج گردید (Ausubel *et al*., 2002; Galledari *et al*., 2015). ژن 16S rDNA بهترین سویه محلول کننده فسفات نامحلول با استفاده از پرایمرهای 8F (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) و 1541R (5′-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3′) تکثیر یافتند (Galledari *et al*., 2015; Ozhand *et al*., 2016). سپس محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای توالی یابی از پایانه Forward ارسال گردید. پس از بدست آمدن توالی، الگوریتم بلاست (BLAST) (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) و نرم افزار MEGA 4.1 برای تجزیه و تحلیل توالی و هم‌ترازی چندگانه (Multiple alignment) آن به کار رفتند. با انجام عمل BLAST، توالی‌های باکتری که بیش‌ترین شباهت را به توالی مورد نظر داشتند استخراج گردیدند و سپس با استفاده از نرم افزار Mega4.1 درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbors Joining رسم گردید (Galledari *et al*., 2015; Ozhand *et al*., 2016).

تجزیه و تحلیل RAPD

در این مطالعه شش پرایمر RAPD (جدول ۱) بر طبق روش ویلیامز و همکاران (Williams *et al*., 1990) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ سویه باکتری حل کننده فسفات به کار گرفته شدند. ۵۰ ng/µl از DNA ژنومی بهترین سویه حل کننده فسفات نامحلول به عنوان الگو به کار رفت. واکنش PCR شامل ۲ µl از DNA الگو، ۲ µl از بافر PCR، کلرید منیزیم ۲ میلی مولار، ۰/۰۲ dNTP میلی مولار، پرایمر ۱ µl و ۱ U از آنزیم Taq DNA polymerase بود. حجم هر واکنش ۲۰ میکرولیتر بود. برنامه PCR به این صورت بود دمای دناتوره کننده اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه بود که با ۳۵ چرخه دیگر

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

ادامه یافت. در این ۳۵ چرخه دمای واسرشتی ۹۴ درجه سانتی-گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۳۲ درجه سانتی‌گراد به مدت به مدت ۱ دقیقه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود. سپس محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری و با استفاده از اتیدیوم برماید رنگ آمیزی گردید (Galledari *et al*., 2015; Naghavi *et al*., 2010).

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگر RAPD

پس از مشخص شدن باندهای چندشکل، به حضور باند نمره یک و عدم حضور باند نمره صفر داده شد و ماتریس صفر و یک ایجاد گردید. لازم به ذکر است که تنها باندهای با وضوح مناسب نمره‌دهی شدند. ماتریس صفر و یک بدست آمده با استفاده از ضریب تشابه جاکارد برای تخمین تشابه ژنتیکی بین جفت رایزوباکتری‌ها به کار رفت. در نهایت دندروگرام با استفاده از الگوریتم UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) و نرم افزار NTSYSPC 2.02 ترسیم گردید (Galledari *et al*., 2015; Rohlf 1997).

نتایج

جداسازی عمومی

در این مرحله تعداد چهل و هشت سویه از خاک‌های اطراف ریشه گندم از مراتع استان‌های تبریز، همدان و لرستان و همچنین از خاک‌های اطراف ریشه گیاهان نعناع، یونجه، شبدر، ذرت، انگور، انار، خاک برگ، خاک باغچه، گوجه‌فرنگی، گلخانه و کنجد از استان‌های کرمان و هرمزگان جداسازی و نام‌گذاری شدند.

غربالگری سویه‌ها از لحاظ حل‌کنندگی فسفات

با کشت ۴۱ سویه جداسازی شده روی محیط کشت اختصاصی فسفات، ۲۵ سویه‌ای که توانایی حل کردن فسفات را داشتند و اطراف خود هاله‌های شفاف ایجاد کردند، انتخاب شدند (جدول ۲). از بین این ۲۵ سویه، ۹ سویه دارای بیش‌ترین قطر هاله و شاخص محلول‌سازی بودند. سویه Cke1 از نظر شاخص محلول سازی بهترین سویه دارای توانایی محلول کنندگی فسفات شناخته شد (جدول ۳).

بررسی رشد و شاخص محلول‌سازی فسفات در ۹ سویه باکتری منتخب در دماهای مختلف

در این مرحله رشد ۹ سویه برتر در سه دمای ۴، ۱۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفت (شکل ۱). نتایج نشان داد که رشد تمامی سویه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به شدت کاهش یافت. در این دما سویه Wkh بیش‌ترین رشد را از خود نشان داد. در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد سویه‌ها رشد بهتری نسبت به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد داشتند. در این دما سویه War بیش‌ترین رشد و سویه Wah2 کم‌ترین رشد را به خود اختصاص داد. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد سویه War و Wah2 به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین رشد را به خود اختصاص داده بودند.

نتایج حاصل از شاخص محلول سازی فسفات در دماهای مختلف نشان داد که در دمای ۴ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد هیچکدام از سویه‌ها قابلیت حل کنندگی فسفات را نداشتند. اما در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد تمامی سویه‌ها قابلیت حل کنندگی فسفات را داشتند. نتیجه مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن (Duncan's multiple range test) نشان داد که در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد سویه Cke1 بالاترین شاخص محلول‌سازی را به خود اختصاص داده است (شکل ۲). در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد سه سویه (Wah2، Wha و Ake4) قابلیت حل کنندگی فسفات نامحلول را نداشتند و سویه‌های Wkh، Cke1 و Ake3 بهترین سویه‌های محلول کننده فسفات نامحلول در این دما بودند (شکل ۲).

بررسی رشد و شاخص محلول سازی فسفات در ۹ سویه باکتری منتخب در غلظت‌های مختلف نمک NaCl

در این مرحله میزان رشد ۹ سویه برتر در غلظت‌های مختلف شوری سنجیده شد. نتایج نشان داد که میزان رشد سویه‌های Hke6 و Wkh در غلظت صفر درصد نسبت به غلظت‌های ۱/۲ و ۱/۸ درصد افزایش داشته است اما سویه Cke1 و Ake3 به ترتیب در غلظت‌های ۱/۸ و ۱/۲ درصد نسبت به غلظت صفر درصد بیش-ترین میزان رشد را داشته‌اند (شکل ۳). بقیه سویه‌ها در هر سه سطح شوری تفاوت معناداری را نشان ندادند (شکل ۳).

آزمایشات نشان داد که تنها ۵ سویه از ۹ سویه برتر در غلظت‌های ۱/۲ و ۱/۸ درصد قابلیت حل کنندگی فسفات را داشتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین به روش آزمون چند دامنه دانکن نشان داد که بهترین سویه محلول کننده فسفات نامحلول در هر دو غلظت ۱/۲ و ۱/۸ درصد، سویه Cke1 است (شکل ۴).

بررسی رشد و شاخص محلول سازی فسفات در ۹ سویه باکتری منتخب در pHهای مختلف

در pHهای مختلف میزان رشد ۹ سویه برتر مورد مطالعه قرار گرفت. در pH ۴، ۶ و ۸ سویه‌های War، Hke4 و Wke بیش‌ترین و سویه Ake4 کم‌ترین میزان رشد را از خود نشان دادند (شکل ۵). آزمایشات این مرحله نشان داد که هیچ کدام از سویه‌ها در pH ۴ قابلیت محلول کنندگی فسفات نامحلول را نداشتند. در pH ۶، هشت سویه و در pH ۸، چهار سویه قابلیت محلول‌کنندگی فسفات نامحلول را داشتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها هم نشان داد که در هر دو pH ۶ و ۸ سویه‌های Cke1 و نیز Ake3

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

جدول ۱- نام و توالی پرایمرهای RAPD.

Table 1. The name and sequence of RAPD primers.

اسم پرایمر	توالی پرایمر	دمای ذوب (Tm) (˚c)
OP C-08	5'-TGGACCGGTG-3'	34
OP C-15	5'-GACGGATCAG-3'	32
OP C-19	5'-GTTGCCAGCC-3'	34
OP A-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	34
OP A-13	5'-CAGCACCCAC-3'	34
S-24	5'-AATCGGCTG-3'	32

جدول ۲- مشخصات سویه‌های حل کننده فسفات نامحلول.

Table 2. Characteristics of insoluble phosphate solubilizing bacteria.

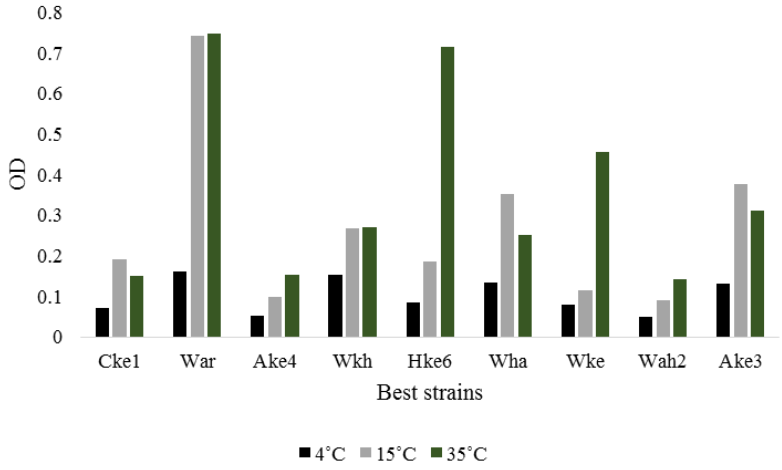
ردیف	کد کلنی	محل جمع آوری-رایزوسفر	رنگ کلنی‌ها	مشخصات ظاهری کلنی‌ها
1	Cke1	کرمان- شبدر	کرم رنگ	گرد- لعابی
2	Wkh	خرم آباد- گندم وحشی	کرم رنگ	مضرس-لعابی
3	Cke2	کرمان- شبدر	سفید	مضرس- شفاف
4	Wke	کرمان- گندم زراعی	شیری رنگ	گرد- لعابی
5	Ake3	کرمان- یونجه	شیری مایل به زرد	گرد- لعابی
6	Hke2	کرمان- خاکبرگ	کرم رنگ	گرد- لعابی
7	Hke5	کرمان- خاکبرگ	سفید	گرد- لعابی
8	Wta2	تبریز- گندم وحشی	سفید	گرد- لعابی
9	Hke1	کرمان- خاکبرگ	سفید	مضرس- لعابی
10	Wah1	اهر- گندم وحشی	زرد	گرد- لعابی
11	War	اردبیل- گندم وحشی	کرم مایل به زرد	گرد- لعابی
12	Wha	همدان- گندم وحشی	زرد	گرد- لعابی
13	Wta1	تبریز- گندم وحشی	شیری رنگ	گرد- لعابی
14	Ake2	کرمان- یونجه	کرم مایل به زرد	گرد- لعابی
15	Wah5	اهر- گندم وحشی	سفید	گرد- لعابی
16	Hke4	کرمان- خاکبرگ	شیری	گرد- شفاف
17	Hke6	کرمان- خاکبرگ	سفید	گرد- شفاف
18	Mho	هرمزگان- ذرت	کرم	مضرس- لعابی
19	Wah3	اهر- گندم وحشی	سفید	گرد- لعابی
20	Hke3	کرمان- خاکبرگ	شیری مایل به زرد	مضرس- لعابی
21	Ake4	کرمان- یونجه	شیری مایل به زرد	گرد- لعابی
22	Wah4	اهر- گندم وحشی	سفید	گرد- لعابی
23	Ake1	کرمان- یونجه	سفید	مضرس- لعابی
24	Tke	کرمان- گوجه فرنگی	سفید مایل به کرم	گرد- لعابی
25	Wah2	اهر- گندم وحشی	سفید	مضرس- لعابی

جدول ۳- شاخص محلول‌سازی ۹ سویه برتر در شرایط نرمال.

Table 3. Solubilizing indices of nine superior strains under normal conditions.

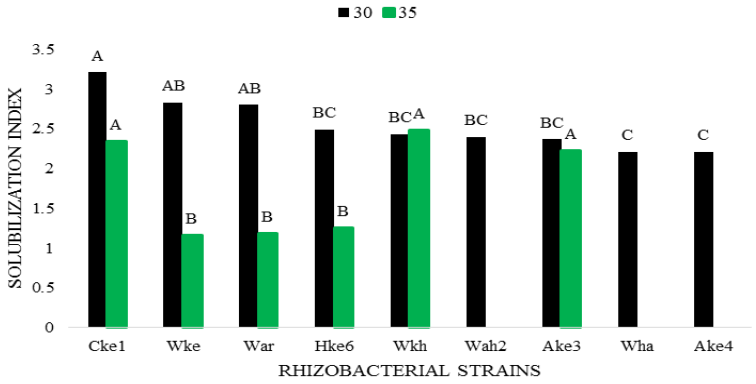
Strains	قطر کلنی (mm)	قطر هاله (mm)	شاخص محلول‌سازی(PSI)
Cke1	3	7	3.33
Wke	1.5	4	3
War	2.5	5	3
Ake3	3	7	2.83
Hke6	3	5	2.66
Wkh	3	5	2.66
Ake4	3	5.5	2.33
Wha	3	4	2.33
Wah2	3	4	2.3

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]



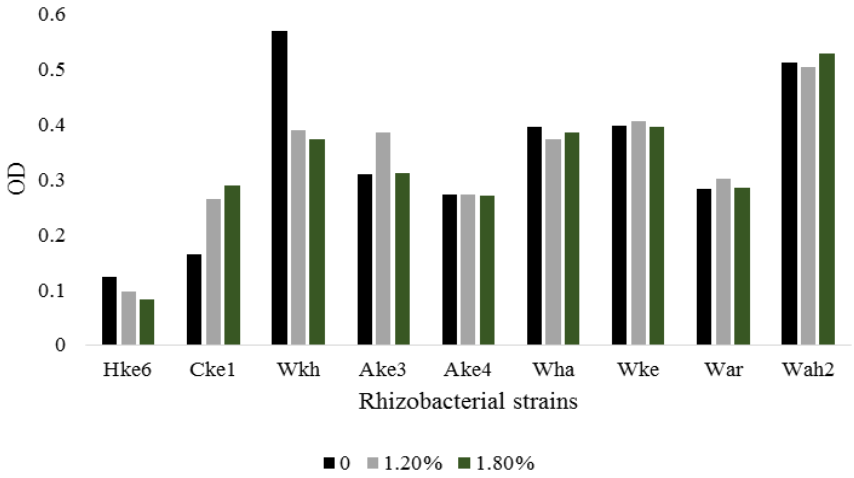
شکل ۱- میزان رشد ۹ سویه انتخابی در دماهای ۴، ۱۵ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد.

Fig. 1. The growth rate of nine selected strains at 4°C, 15°C and 35°C.



شکل ۲- مقایسه میانگین شاخص محلول سازی سویه‌های رشد یافته تحت دماهای مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

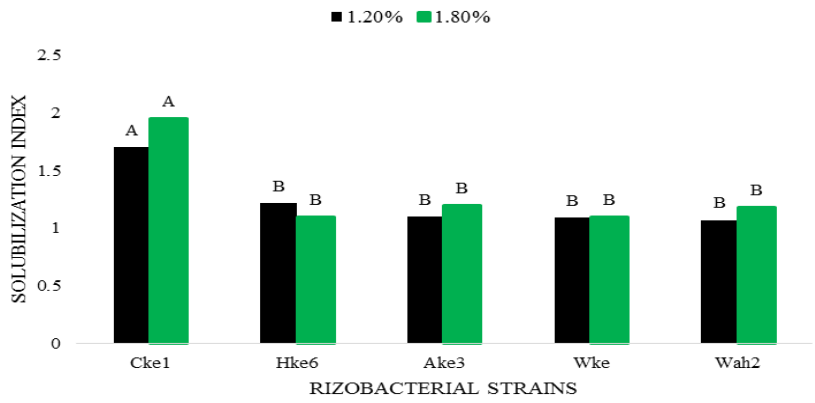
Fig. **2.** Mean comparison of the solubilizing indices of strains grown under different temperatures using Duncan's multiple range test.



شکل ۳- میزان رشد ۹ سویه انتخابی در شوری‌های مختلف.

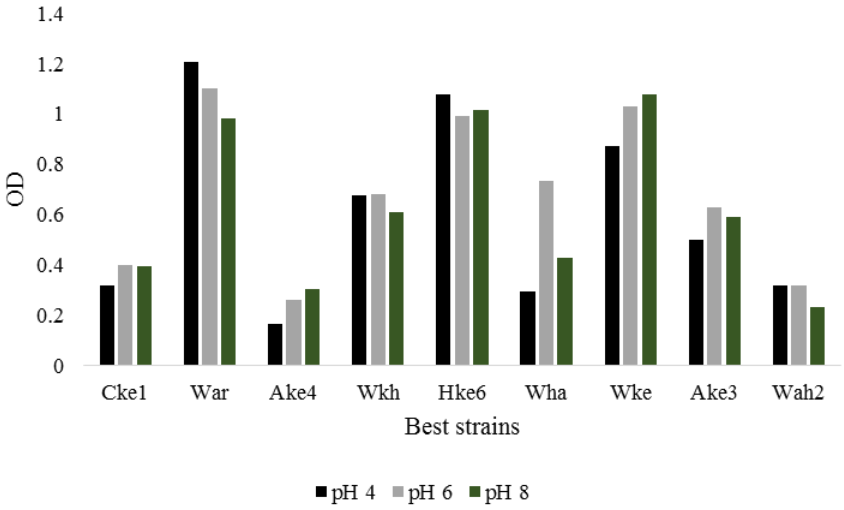
Fig. **3.** The growth rate of nine selected strains under different salinity levels.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]



شکل ۴- مقایسه میانگین شاخص محلول سازی سویه‌های رشد یافته تحت شوری‌های مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

Fig. **4.** Mean comparison of the solubilizing indices of strains grown under different salinity levels using Duncan's multiple range test.



شکل ۵- میزان رشد ۹ سویه انتخابی در pHهای مختلف.

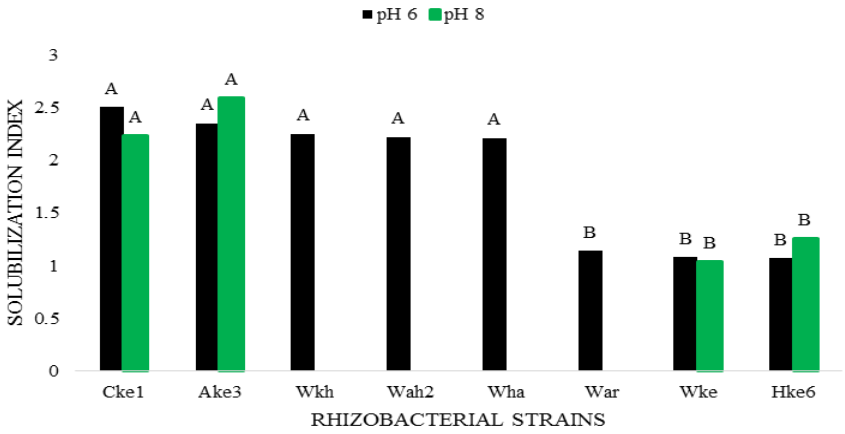
Fig. **5.** The growth rate of nine selected strains at different pH levels.

بالاترین میزان شاخص محلول سازی را به خود اختصاص داده‌اند (شکل ۶). کم‌ترین شاخص محلول سازی نیز در pH ۶ متعلق به سویه‌های Hke6، Wke و War و در pH ۸ متعلق به سویه Wke و Hke6 بود. این نتایج نشان داد که که در pHهای مختلف سویه‌هایی که بیش‌ترین میزان رشد را داشتند، کم‌ترین میزان قابلیت محلول کنندگی فسفات را دارا بودند و بر عکس سویه‌هایی که رشد قابل ملاحظه ای نداشتند در عوض توانایی حل کنندگی فسفات بیشتری از خود نشان دادند. درواقع میزان رشد با میزان حل کنندگی فسفات همبستگی مثبتی نشان ندادند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

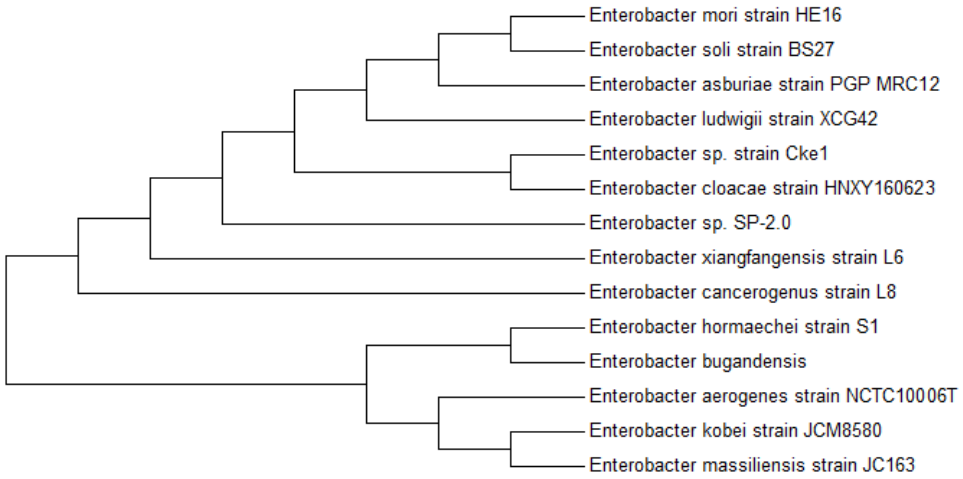
پس از به دست آوردن بخشی از توالی 16S rDNA (۵۶۵ جفت باز) بهترین سویه محلول کننده فسفات در شرایط مختلف، جستجو در BLAST انجام گرفت. نتیجه نشان داد که جنس *Enterobacter* بیش‌ترین شباهت را با سویه CKe1 دارا است. به منظور پیدا کردن توالی‌های 16S rDNA با شباهت بالا، در داخل BLAST یک جستجو صورت گرفت. توالی‌های 16S rDNA گونه‌های نزدیک خویشاوند از داخل پایگاه اطلاعاتی NCBI استخراج شد، تا دندروگرام فیلوژنتیکی ترسیم و جایگاه تاکسونومی این سویه مشخص شود. رابطه فیلوژنتیکی سویه *Enterobacter* sp. strain Cke1 با سایر گونه‌های خویشاوند با استفاده از تجزیه و تحلیل neighbor joining توالی 16S rDNA در شکل ۷ مشخص شده است. توالی 16S rDNA گزارش شده در این مقاله با شماره دسترسی KX505074 در بانک ژن ثبت شده است.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]



شکل ۶- مقایسه میانگین شاخص محلول سازی سویه‌های رشد یافته تحت pHهای مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

Fig. **6.** Mean comparison of the solubilizing index of strains grown under different pH levels using Duncan's multiple range test.



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی بر پایه توالی‌های ژن 16S rDNA و تجزیه و تحلیل Neighbor-Joining برای نشان دادن رابطه *Enterobacter* sp. Strain Cke1 با سایر گونه‌ها از جنس *Enterobacter*.

Fig. **7**. Neighbor-Joining tree based on 16S rDNA gene sequences, showing the relationship of *Enterobacter* sp. strain Cke1 with closely related members of the *Enterobacter* genus.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگر مولکولی RAPD

برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ سویه باکتری حل‌کننده فسفات، از ۵ آغازگر تصادفی نشانگر RAPD استفاده شد. تعداد کل باندهای مشاهده شده ۱۱۹ و تعداد کل باندهای چندشکل ۸۰ عدد بودند. کم‌ترین و بیش‌ترین تعداد باند تشکیل شده به ترتیب مربوط به آغازگر OPA-08 با ۱۶ باند و آغازگر OPC-02 با تعداد ۳۳ باند بود (جدول ۴).

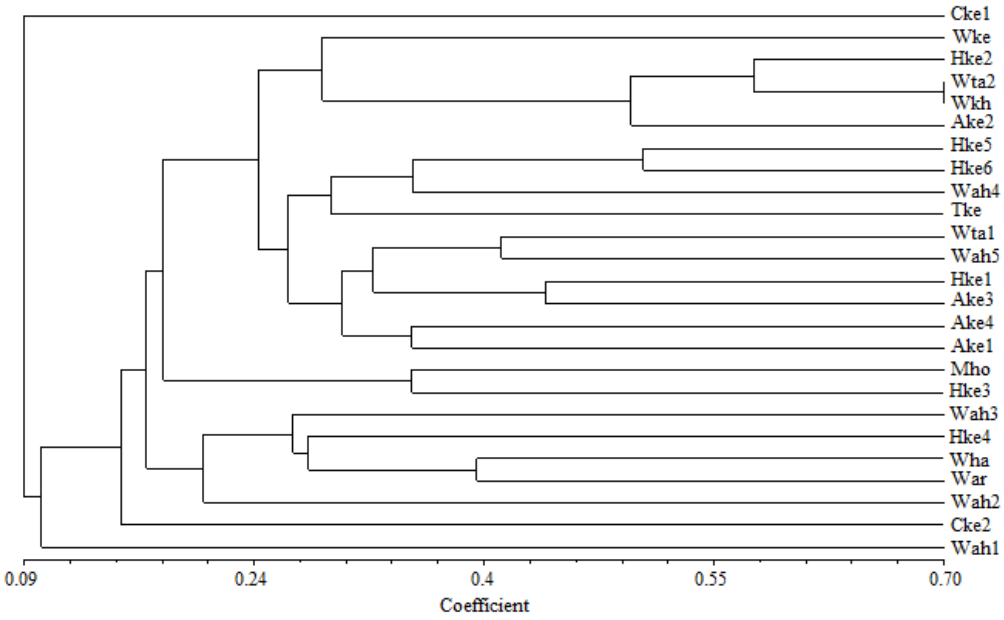
نتایج نشان داد که دامنه تشابه ژنتیکی بین سویه‌های حل کننده فسفات بین ۰ تا ۰/۶۹ بود. بین چندین سویه کم‌ترین تشابه ژنتیکی وجود داشت به عنوان مثال بین Cke1 و سویه‌های Wah3، Ake2، Wah2، Wkh و Hke6 کم‌ترین میزان تشابه ژنتیکی مشاهده شد. بیش‌ترین تشابه ژنتیکی هم بین دو سویه Wta2 و Wkh وجود داشت. لازم به ذکر است که سویه CKe1، بیش‌ترین تشابه ژنتیکی را با سویه WKe داشت. تجزیه کلاستر نیز تمامی سویه‌های حل کننده فسفات را در ۶ گروه قرار داد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

جدول۴- تعداد باندهای تکثیر شده توسط هر آغازگر تصادفی.

Table 4. The number of amplified bands using RAPD primers.

ردیف	پرایمرهای تصادفی	توالی پرایمرها	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چند شکل	تعداد باندهای یک شکل
1	OP C-08	5´-TGGACCGGTG-3´	16	11	5
2	OP C-15	5´-GACGGATCAG-3´	23	16	7
3	OP C-19	5´-GTTGCCAGCC-3´	26	17	9
4	OP C-02	5´-ACTTCGCCAC-3´	33	18	15
5	OP A-13	5´-CAGCACCCAC-3´	21	18	3
	Total		119	80	39



شکل ۸- دندروگرام نشان دهنده روابط بین ۲۵ سویه محلول کننده فسفات که توسط ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA حاصل شده است.

Fig. 8. Dendrogram showing the relationships among 25 phosphate solubilizing bacteria, obtained by Jaccard index and UPGMA algorithm.

سویه‌های Cke1 (کرمان-رایزوسفر شبدر)، Cke2 (کرمان-رایزوسفر شبدر) و Wah1 (اهر-رایزوسفر گندم وحشی) هر کدام به صورت مجزا در ۳ گروه قرار گرفتند. ۵ سویه Wah3 (اهر-رایزوسفر گندم وحشی)، Hke4 (کرمان-خاکبرگ)، Wha (همدان-رایزوسفر گندم وحشی)، War (اردبیل-رایزوسفر گندم وحشی) و Wah2 (اهر-رایزوسفر گندم وحشی) در گروه چهارم قرار گرفتند و مابقی سویه‌ها نیز در گروه پنجم جای گرفتند (شکل ۸).

بحث

در خاک فسفر با جذب شدن به سطح ذرات خاک و از طریق واکنش با کاتیون‌های خاک به ویژه آهن، آلومینیوم و کلسیم از دسترس خارج می‌شود (Harris *et al.*, 2006). محلول‌سازی فسفات معدنی یکی از قابلیت‌های بسیاری از PGPRها است که به میکروارگانیزم‌های حل کننده فسفات معروف هستند (Perez *et al.*, 2007). بسیاری از PGPRها از طریق رهاسازی اسیدهای آلی کلاته کننده و آنزیم‌ها قادر به محلول‌سازی فسفات‌های نامحلول هستند (Vessey *et al.*, 2004).

باکتری‌های PGPRs ازجمله باکتری‌های حل کننده فسفات می‌توانند نقش مهمی در کشاورزی پایدار ایفا کنند (Malboobi *et al.*, 2009). در حال حاضر زمین‌های کشاورزی در سراسر دنیا در معرض انواع تنش‌های محیطی مثل دماهای بالا، شوری و نیز pH خاک هستند. به همین دلیل معرفی سویه‌هایی که در

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

حضور تنش‌های مختلف توانایی حفظ قابلیت محلول‌کنندگی فسفات نامحلول را دارا هستند، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل در این مطالعه بهترین سویه‌های محلول کننده فسفات در شرایط مختلف غربال شدند. در شرایط طبیعی یعنی دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و محیط کشت پایه، سویه با توانایی بالای محلول کنندگی فسفات (Phosphate Solubilizing (PS))، Cke1 بود. در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد رشد همه سویه‌ها پایین بود و هیچ کدام توانایی PS را نداشتند. در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد میزان رشد برخی سویه‌ها مثل سویه War بالا بود اما باز هم هیچکدام توانایی PS را نداشتند. اما در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد با این‌که سویه‌های War و Hke6 بیش-ترین میزان رشد را داشتند، اما سویه‌های Cke1، Wkh و Ake3 که میزان رشد نسبتا کم‌تری را داشتند، بیش‌ترین میزان PS را به خود اختصاص دادند. همچنین در شوری‌های ۰، ۱/۲ و ۱/۸ درصد، با این‌که سویه Cke1 نسبت به غالب سویه‌ها رشد کم‌تری را نشان داد با این حال میزان PS آن بالاتر از مابقی سویه‌ها بود. در pH ۴ با این‌که برخی سویه‌ها رشد مناسبی داشتند اما هیچ کدام قابلیت PS را نداشتند. اما در pH ۶، با این‌که سویه‌های War، Hke6 و نیز Wke رشد خوبی داشتند، اما سویه Cke1 بالاترین مقدار PS را بخود اختصاص داد. در pH ۸ نیز با این‌که میزان رشد سویه‌های Cke1 و Ake3 نسبت به غالب سویه‌ها کم‌تر بود اما باز هم بیش‌ترین مقدار PS را به خود اختصاص دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که ممکن است رابطه مثبتی بین میزان رشد و قابلیت PS وجود نداشته باشد. در حالی که نشان داده شده (Malboobi *et al*., 2009) که با افزایش رشد میزان قابلیت PSI نیز افزایش می‌یابد. بر اساس مطالعه ما سویه *Enterobacter* sp. strain Cke1 به عنوان بهترین سویه حل کننده فسفات در شرایط مختلف محیطی معرفی شد. سویه-های محلول کننده فسفات نامحلول غربال شده است (Malboobi *et al*., 2009). آن‌ها رشد و نیز قابلیت محلول سازی فسفات نامحلول سه سویه برتر محلول کننده فسفات را در دماها ۲۵، ۳۵ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که رشد و قابلیت محلول سازی فسفات نامحلول در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بالاترین بود. همچنین به طور کلی رشد و نیز قابلیت محلول‌سازی در دماهای بالاتر کاهش پیدا کرد. نتایج آن‌ها نشان داد که رابطه نزدیکی بین میزان رشد و نیز قابلیت محلول‌سازی فسفات وجود دارد. اثر دما، شوری و pH را بر روی دو سویه محلول کننده فسفات جداسازی شده از رایزوسفر گوجه فرنگی بررسی شده است (Banerjee *et al*., 2010). از بین سه دمای ۳۷، ۴۵ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد، یکی از سویه‌ها در دمای ۳۷ و دیگری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین قابلیت PS را داشتند. هر دو سویه برتر در شوری با غلظت ۲/۵ درصد توانایی بیش‌تری را در میزان PS داشتند. همچنین از بین pHهای ۸، ۹، ۱۰، ۱۱ یکی از سویه‌ها در pH ۹ و دیگری در pH ۱۰ بیش‌ترین قابلیت PS را از خود نشان دادند. از کارایی محلول سازی برای غربال سویه‌های محلول کننده فسفات نامحلول استفاده شده است (Hu *et al*., 2010). بهترین سویه دارای کارایی محلول سازی به میزان ۳/۴۲۲۷ بعد از ۴۸ ساعت رشد در محیط پیکووسکی بود. آن‌ها میزان رشد سویه *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6 در دماهای مختلف بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که در دماها ۲۵ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیش‌ترین میزان رشد را دارا هستند. در این مطالعه میزان رشد سویه مذکور در شوری‌های متفاوت نیز بررسی شد و نتایج نشان داد که بیش‌ترین رشد در شوری ۵ و ۱۰ درصد رخ داده است. همچنین سویه مذکور بیش‌ترین رشد را در pHهای ۷ و ۸ از خود نشان داد. با استفاده از شاخص محلول سازی اقدام به غربال سویه‌های حل کننده فسفات شده است (Muleta *et al*., 2013) که میزان شاخص محلول‌سازی بهترین سویه آن‌ها ۵/۸۲ بود. قابلیت محلول کنندگی فسفات نامحلول ۴۷ سویه باکتریایی بررسی شده است. نتایج نشان داد که ۳۰ سویه از کل سویه‌ها قابلیت حل کنندگی فسفات را دارند (Laslo *et al*., 2012).

نتایج تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rDNA نشان داد که بهترین سویه حل کننده فسفات در این مطالعه متعلق به جنس *Enterobacter* بود. تا به حال محققین زیادی باکتری‌های جنس *Enterobacter* را به عنوان باکتری‌های حل‌کننده فسفات شناسایی کرده‌اند و اثر آن‌ها را بر روی رشد گیاهان بررسی کردند. از ۱۰۰ نمونه خاک رایزوسفری در ونزوئلا، دو باکتری به نام‌های *Enterobacter cloacae* و *Xanthomonas maltophilia* را به عنوان باکتری‌های حل کننده فسفات غربال کردند و مشاهده کردند که تاثیر معنی‌داری را بر روی رشد گیاه چغندرقند نسبت به شاهد می‌گذارند (Martinez & Martinez, 2007). چند صد کلونی باکتریایی بر روی محیط کشت اختصاصی مایع پیکووسکی از نظر قابلیت محلول سازی فسفات نامحلول بررسی و ۱۳ باکتری با بالاترین قابلیت محلول سازی جداسازی شده است. بهترین سویه‌های جداسازی شده متعلق به جنس‌های *Enterobacter*، *Pantoea* و *Klebsiella* بودند (Chung *et al*., 2005). باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول از رایزوسفر گیاه *Areca catechu* جداسازی شده و بهترین سویه‌های حل‌کننده که شامل *Enterobacter cloacae*،

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

Escherichia coli و *Acinetobacter pittii* بودند، شناسایی شدند (Liu *et al*., 2014). ۴۱ باکتری حل کننده فسفات نامحلول از محیط رایزوسفری عدس جداسازی شدند. تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rDNA نشان داد که برخی از بهترین سویه‌ها، متعلق به جنس *Enterobacter* بودند (Midekssa *et al*., 2015).

نتایج این تحقیق نشان داد که میزان تشابه ژنتیکی حاصل از نشانگر RAPD بین برخی سویه‌ها صفر بود. این امر ممکن است به این دلیل باشد که آن سویه‌ها به احتمال زیاد از جنس‌های مختلفی بوده باشند. تنوع ژنتیکی بین سویه‌های تولید کننده هورمون IAA بررسی و نشان داده شد که بین برخی سویه‌ها هیچ تشابه ژنتیکی وجود نداشت (Galledari *et al*., 2015). در این مطالعه نشانگر RAPD قادر به جداسازی سویه‌ها بر اساس قابلیت آن‌ها در محلول سازی فسفات نامحلول نبودند، به طوری که ۹ سویه برتر در این مطالعه در بین گروه‌های مختلف تقسیم شده‌اند. تنوع ژنتیکی باکتری‌های تولید کننده سیدروفورها با استفاده از روش Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) بررسی شده است (Tian *et al*., 2009). در این مطالعه با استفاده از روش ARDRA تا حدودی توانستند ۵ جنس مختلف را از هم تفکیک کنند و در گروههای مجزا قرار دهند ولی با این حال این روش قادر به جداسازی رایزوباکتری‌های فاقد توانایی تولید سیدروفور در یک گروه مجزا نشدند. تنوع ژنتیکی باکتری‌های تولید کننده و تخریب کننده N-acyl homoserine lactones با استفاده از روش Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA) بررسی شده است (Picard *et al*., 2000). در این مطالعه با استفاده از روش ARDRA جنس‌های مختلف از هم تفکیک نشدند و در گروه‌های مجزا قرار نگرفتند. یکی از دلایلی که محققین مختلف نتایج متفاوتی گرفته‌اند، شاید به این دلیل است که هر کدام، از پرایمرهای مختلفی برای تعیین تنوع ژنتیکی استفاده کرده‌اند.

در مطالعه ما نشان داده شد که افزایش رشد به صورت قطعی به معنی افزایش قابلیت PSI نیست. با این‌که سویه‌ها در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۴ رشد خوبی داشتند اما هیچ‌کدام از سویه‌ها قابلیت PSI را نداشتند. همچنین نتایج نشان داد که سویه *Enterobacter* sp. strain Cke1 با این‌که میزان رشد کم‌تری در محیط پیکووسکی و تحت شرایط مختلف دمایی، شوری و pH نسبت به غالب سویه‌ها داشت اما به طور جالبی توانایی PS بالاتری نسبت به سایر سویه‌ها در تمامی شرایط محیطی مورد مطالعه از خود نشان داد. این سویه می‌تواند پتانسیل خوبی برای فراهم کردن فسفات نامحلول برای گیاهان زراعی در شرایط تنشی داشته باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان برای حمایت مالی از این پژوهش قدردانی می‌کنند.

REFERENCES

Aarab, S., Ollero, F.J., Megías, M., Laglaoui, A., Bakkali, M. and Arakrak, A. 2015. Isolation and screening of bacteria from rhizospheric soils of rice fields in Northwestern Morocco for different plant growth promotion (PGP) activities: An in vitro study. IJCMAS 4: 260-269.

Afzal, A., M. Ashraf, A. Saeed, Asad and Farooq, M. 2005. Effect of phosphate solubilizing microorganisms on phosphorus uptake, yield and yield traits of wheat (*Triticum aestivum* L.) in rainfed area. IJAB 7: 1560-8530.

Alikhani, H.A., Saleh-Rastin, N. and Antoun, H. 2007. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. In First international Meeting on microbial phosphate solubilization. – Springer Netherlands, pp: 35-41.

Ausubel, F.M. ed. 2002. Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology. Wiley, 1512 pp.

Banerjee, S., Palit, R., Sengupta, C. and Standing, D. 2010. Stress induced phosphate solubilization by Arthrobacter sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. AJCS 4: 378-383.

Benlloch-González, M., Fournier, J.M., Ramos, J. and Benlloch, M. 2005. Strategies underlying salt tolerance in halophytes are present in *Cynara cardunculus*. Plant Sci. 168: 653-659.

Bolan, N.S., Adriano, D.C. and Naidu, R. 2003. Role of phosphorus in (im) mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil-plant system. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 177: 1- 44.

Chung, H., Park, M., Madhaiyan, M., Seshadri, S., Song, J., Cho, H. and Sa, T. 2005. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil. Biol. Biochem. 37: 1970-1974.

Galledari, N., Maleki, M., Shakeri, S. and Baghizadeh, A. 2015. Investigation of genetic diversity and molecular identification of IAA producing bacteria using RAPD marker and 16S rDNA sequence analysis. G3M 13: 4054-4061.

Harris, J.N., New, P.B. and Martin, P.M. 2006. Laboratory tests can predict beneficial effects of phosphate-solubilising bacteria on plants. Soil. Biol. Biochem. 38: 1521-1526.

Hu, X.J., Li, Z.J., Cao, Y.C., Zhang, J., Gong, Y.X. and Yang, Y.F. 2010. Isolation and identification of a phosphate-solubilizing bacterium *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* g6, and effects of temperature, salinity, and pH on its growth under indoor culture conditions. Aquac. Int. 18: 1079-1091.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

Johri, J.K., Surange, S. and Nautiyal, C.S. 1999. Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. Curr. Microbiol. 39: 89-93.

Laslo, É., György, É., Mara, G., Tamás, É., Ábrahám, B. and Lányi, S. 2012. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. Crop Prot. 40: 43-48.

Liu, F.P., Liu, H.Q., Zhou, H.L., Dong, Z.G., Bai, X.H., Bai, P. and Qiao, J.J. 2014. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils. Biol. Fertil. Soils 50: 927-937.

Malboobi, M.A., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S., Yakhchali, B., Deljou, A. and Heravi, K.M. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World J. Microbiol. Biotechnol. 25: 1471-1477.

Martinez, M. and Martinez, A. 2007. Effects of phosphate-solubilizing bacteria during the rooting period of sugar cane (*Saccharum officinarum*), Venezuela 51–71 variety, on the grower's oasis substrate. In *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*. Springer, Netherlands, pp: 317-323.

McLaughlin, M.J., Tiller, K.G., Naidu, R. and Stevens, D.P. 1996. Review: the behaviour and environmental impact of contaminants in fertilizers. Soil Res. 34: 1-54.

Midekssa, M.J., Loscher, C.R., Schmitz, R.A. and Assefa, F. 2015. Characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria isolated from lentil growing areas of Ethiopia. Afr. J. Microbiol. Res. 9: 1637-1648.

Muleta, D., Assefa, F., Börjesson, E. and Granhall, U. 2013. Phosphate-solubilising rhizobacteria associated with *Coffea arabica* L. in natural coffee forests of southwestern Ethiopia. J. Saudi Society Agric. Sci. 12: 73-84.

Munns, R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environ. 25: 239-250.

Naghavi, M.R., Malaki, M., Alizadeh, H., Pirseiedi, M. and Mardi, M. 2010. An assessment of genetic diversity in wild diploid wheat *Triticum boeoticum* from west of Iran using RAPD, AFLP and SSR markers. JAST 11: 585-598.

Nautiyal, C.S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. Fems. Microbiol. Lett. 170: 265-270.

Nautiyal, C.S., Bhadauria, S., Kumar, P., Lal, H., Mondal, R. and Verma, D. 2000. Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. Fems Microbiol Lett. 182: 291-296.

Nguyen, C., Yan, W., Tacon, F. and Lapeyrie, F. 1992. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) PD Orton. Plant Soil 143: 193-199.

Perez, E., Sulbaran, M., Ball, M.M. and Yarzábal, L.A. 2007. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region. Soil Biol. Biochem. 39: 2905-2914.

Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. and Guckert, A. 2000. Frequency and biodiversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Appl. Environ. Microbiol. 66: 948-955.

Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya 17: 362- 370.

Ouzhand, B., Maleki, M., Soltani, M. and Shakeri, S. 2016. Molecular identification of the Iranian native ACC deaminase producing rhizobacteria using 16S rDNA sequence analysis. G3M 14: 4242-4249.

Robson, A.D., O'hara, G.W. and Abbott, L.K. 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). Funct. Plant Biol. 8: 427-436.

Rohlf, F.J. 1997. NTSYSpc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.00. Exeter Software, Setauket, New York, 31 pp.

Sahu, S.N. and Jana, B.B. 2000. Enhancement of the fertilizer value of rock phosphate engineered through phosphate-solubilizing bacteria. Ecol. Eng. 15: 27-39.

Syers, J.K., Johnston, A.E. and Curtin, D. 2008. Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin, 18.

Tian, F., Ding, Y., Zhu, H., Yao, L. and Du, B. 2009. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. Braz. J. Microbiol. 40: 276-284.

Tripathi, A.K., Mishra, B.M. and Tripathi, P. 1998. Salinity stress responses in the plant growth promoting rhizobacteria, *Azospirillum* spp. J. Bioscience. 23: 463-471.

Vessey, J.K., K. Pawlowski and Bergman, B. 2004. Root-based N2- fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp., and cycads. Plant Soil 266: 205-230.

Upadhyay, S.K., Singh, D.P. and Saikia, R. 2009. Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from rhizospheric soil of wheat under saline condition. Curr. Microbiol. 59: 489-496.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

Xiang, W.L., Liang, H.Z., Liu, S., Luo, F., Tang, J., Li, M.Y. and Che, Z.M. 2011. Isolation and performance evaluation of halotolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China. World J. Microb. Biot. 27: 2629-2637.

Yadav, H., Gothwal, R.K., Solanki, P.S., Nehra, S., Sinha-Roy, S. and Ghosh, P. 2015. Isolation and characterization of thermo-tolerant phosphate-solubilizing bacteria from a phosphate mine and their Rock Phosphate Solubilizing Abilities. Geomicrobiol. J. 32: 475-481.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]

Yildirim, E.R.T.A.N., Turan, M.E.T.I.N. and Donmez, M.F. 2008. Mitigation of salt stress in radish (*Raphanus sativus* L.) by plant growth promoting rhizobacteria. Roumanian Biotechnol. Lett. 13: 3933-3943.

Young, C.C., F.T. Shen, W.A. Lai, M.H. Hung, W.S. Huang, A.B. Arun and Lu, H.L. 2003. Biochemical and molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria from Taiwan soil. Proceeding of 2nd International Symposium on Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum. Perth, Australia, pp: 44-45.

*****

How to cite this article:

Daneshvar, M., Maleki, M., Shakeri, Sh. and Baghizadeh, A. 2020. Screening and identifying of Iranian native phosphate solubilizing bacteria and investigation of their genetic diversity using RAPD markers. – Nova Biol. Reperta 6: 402-414. (In Persian)

دانشور، م.، ملکی، م.، شاکری، ش. و باقی‌زاده، ا. ۱۳۹۸. غربال و شناسایی باکتری‌های محلول کننده فسفات بومی ایران و بررسی تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از نشانگر RAPD. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۴۱۴-۴۰۲.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.2.3]

[DOI: 10.29252/nbr.6.4.402]