علوم و تحقیقات بذر ایران
سال یازدهم/ شماره چهارم/ ۱۴۰۳ (۶۶ - ۵۳)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2024.8798

اثر پرایمینگ زیستی بذر دو گونه گون *Astragalus cicer* و *Astragalus cyclophyllon* توسط سودوموناس‌های تثبیت کننده نیتروژن مستقر در گره‌های ریزوبیومی و ریزوسفر

بیتا علیزاده[۱]، مسعود احمدزاده[۲]، کبری مسلم‌خانی[۳*]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۷

چکیده

با وجود اهمیت برخی گونه‌های گون در تامین علوفه دام در مراتع به دلیل جوانه زنی سخت و بنیه ضعیف گیاهچه‌ها، توسعه کشت تجاری این گیاهان مورد توجه واقع نشده است. تحقیقات متعددی به پتانسیل باکتری‌های پروبیوتیک به ویژه برخی جدایه‌های سودوموناس در افزایش جوانه‌زنی و بهبود قدرت رویشی گیاهان اشاره کرده‌اند. تحقیق حاضر ضمن جداسازی جدایه-های سودوموناس با قابلیت تثبیت نیتروژن، از ریزوسفر و گره‌های ریزوبیومی گیاهان گون نخودی و گون علوفه‌ای مستقر در مزارع آزمایشی در استان البرز، به بررسی اثر تیمار سودوموناس‌های منتخب محرک رشد بر بهبود شاخص‌های رشدی و قدرت رویشی دو گونه مورد اشاره پرداخته است. بر اساس بررسی‌های اولیه بیوشیمیایی و تعیین توالی، سه گونه سودوموناس با ویژگی‌های محرک رشدی از گره ریزوبیومی و ریزوسفر گون نخودی جداسازی و شناسایی شد. جدایه Rh13 با برتری نسبت به دو جدایه دیگر بر اساس توالی 16S rDNA بیش‌ترین شباهت (۹۹/۸۳ درصد) را به گونه *Pseudomonas putida* نشان داد و در تمام ویژگی‌های محرک رشدی نظیر قابلیت تثبیت نیتروژن، حلالیت فسفات، تولید ایندول استیک اسید (IAA)، تولید آنزیم آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلات دآمیناز (ACC deaminase) و تولید فیتاز، مثبت ارزیابی شد. این جدایه در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری باعث بهبود شاخص‌های رویشی در هر دو گونه گون شد. تیمار بذور با دو جدایه Me41 و Rh3 نیز به ترتیب سبب افزایش ۱۰ و ۱۳ درصدی میزان جوانه زنی در گون نخودی و علوفه‌ای شد. نتایج تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی نشان داد بیش‌ترین عامل تمایز جدایه‌ها در ویژگی‌های محرک رشدی، توانایی تثبیت نیتروژن به عنوان یک عنصر پرمصرف حیاتی و مؤثر در بهبود رشد گیاهچه‌ها بوده است. تیمار بذر با جدایه‌های مفید سودوموناس می‌تواند ضمن بهبود استقرار سریع‌تر گون‌ها در رقابت با سایر علف‌های هرز مراتع، باعث بازیابی جمعیت میکروبی مفید و افزایش غنای خاک از طریق تامین نیتروژن و فسفر قابل استفاده برای گیاهان شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری، بیوپرایمینگ، سودوموناس، گون علوفه‌ای، گون نخودی، محرک رشد

۱- دانش اموخته کارشناسی ارشد گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. bita.alizade@ut.ac.ir
۲- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران. ahmadz@ut.ac.ir
۳- دانشیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. Moslemkhany@yahoo.com
*نویسنده مسئول: Moslemkhany@yahoo.com

مقدمه

گون (*Astragalus* L.) گیاهی با ارزش مرتعی و علوفه ای بالا است که در حفاظت خاک نیز نقش بزرگی ایفا می نماید (Xiaoxia *et al*., 2014). گون‌ها در تولید علوفه مراتع (Zare Kia *et al*., 2013)، تثبیت کربن و نیتروژن (Davis, 1982)، افزایش مواد آلی، حفاظت خاک از فرسایش، جلوگیری از روان آب و تغذیه سفره‌های آب زیرزمینی نقش دارند (Zare Kia *et al*., 2013). گون‌ها سرشار از پروتئین خام و فیبر کم می‌باشند که برای نشخوارکنندگان قابلیت هضم بالایی دارد و از نفخ جلوگیری می‌کند (Acharya *et al*., 2006). گون علوفه‌ای (*Astragalus cyclophyllon*)و گون نخودی (*Astragalus cicer*) یکی از مهم‌ترین لگوم‌های علوفه‌ای چندساله مراتع سردسیری است که به طور وسیعی در رویشگاه‌های نیمه استپی کشور مورد چرای دام قرار می-گیرند .این گونه‌ها سازگاری بالایی با شرایط اقلیمی مناطق نیمه استپی داشته و می‌تواند کمک مؤثری به اصلاح و احیاء مراتع نماید (Ardestani *et al*., 2015).

با وجود مزیت‌های فراوان گونه‌های گون، به دلایل زیادی از جمله خواب بذر، تأخیر در جوانه‌زنی، رشد نسبتا آهسته، بنیه و استقرار ضعیف گیاهچه‌ها، این گیاهان به طور وسیع مورد استفاده قرار نگرفته‌اند (Tavili *et al*.,2012; Acharya *et al*., 2006). با توجه به اهمیت توسعه کشت گون‌ها به عنوان علوفه در مراتع (Salehi Eskandari *et al*., 2017)، بررسی و شناخت عوامل موثر بر افزایش جوانه‌زنی و بهبود استقرار این گیاهان ضرورت دارد. یکی از مشکلات استقرار بذرهای گون وجود پوسته سخت بذر می‌باشد که بررسی‌ها نشان داده پیش تیمار بذور با اسیدسولفوریک باعث نفوذپذیری پوسته سخت بذرهای گیاه گون می‌شود و از طریق کاهش مقاومت مکانیکی پوسته، شرایط برای بهبود جوانه‌زنی بذر فراهم می‌شود (Salehi Eskandari *et al*., 2017). علاوه بر تیمارهای مکانیکی و شیمیایی برای شکست خواب بذر و بهبود جوانه‌زنی، گزارش‌های متعددی از اثر بیوپرایمینگ بر ویژگی‌های کیفی بذر وجود دارد. در این روش قبل از کاشت، تیمار میکروارگانیسم‌های مفید بر روی بذر یا ریشه اعمال می‌شود به صورتی که این عوامل بیولوژیک مستقر شده، بتوانند جمعیت خود را حفظ کنند و به دنبال آن موجب تقویت رشد گیاه و حفظ آن در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده شوند (Bennett *et al*., 2009; Murunde and Wainwright, 2018).

مطالعات در مورد باکتری‌های همزیست ریشه نشان داده که این باکتری‌ها می‌توانند با مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم سبب افزایش سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن ریشه‌چه ، افزایش تعداد ریشه‌های جانبی شوند (Dobbelaere *et al*., 2003; Vurukonda *et al*., 2016). این باکتری‌ها به وسیله مکانسیم‌های مختلف از قبیل تثبیت نیتروژن و تولید آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلات دآمیناز (ACC deaminase) رشد گیاه را تقویت می‌کنند (Saleem *et al*., 2007; Bhattacharyya and Jha 2012; Beneduzi *et al*., 2012). نیتروژن جزء ضروری تمام آمینواسیدها است و یک عنصر پرمصرف مهم برای رشد و عملکرد گیاه به شمار می‌رود (White and Brown, 2010). دسترسی گیاه به فرم فعال بیولوژیکی نیتروژن در خاک محدود است و کاربرد گسترده کودهای شیمیایی ازته ناشی از همین محدودیت است (Oldroyd *et al*., 2011). میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده نیتروژن نقش بسیار مهمی در رشد گیاهان و غنای خاک ایفا می‌کنند (Li *et al*., 2017). این میکرواگانیسم‌ها با استفاده از ژن *nifH* تولید دی نیتروژناز می‌کنند. نیتروژناز باعث تبدیل (N_2) اتمسفر به آمونیاک (NH_3) می‌شود (Halbleib and Ludden, 2000). تحقیقات نشان داده که ۶۰ درصد از کل تثبیت زیستی نیتروژن ناشی از همزیستی گیاه-باکتری به ویژه ریزوبیوم‌ها حاصل می‌شود (Zou *et al*., 2016; Zhiyong, *et al*., 2024).

علاوه بر ریزوبیوم‌ها که عامل اصلی ایجاد گره در ریشه هستند، برخی گونه‌های *Pseudomonas* نیز به صورت همزیست در گره‌های ریزوبیومی ریشه مستقر هستند و نقش مثبت آنها در تحریک رشد گیاه گزارش شده است (Sakshi *et al*., 2011; Noreen *et al*., 2019). بهبود بیوماس ریشه و گیاهچه از طریق افزایش دسترسی گیاه به مواد مغذی مانند انحلال فسفات و تثبیت نیتروژن به وسیله برخی گونه‌های سودوموناس از جمله *Pseudomonas putida* قبلاً گزارش شده ست (Israr *et al*., 2016). همچنین کاربرد سویه‌های *P. putida* و *P. fluorescence* باعث افزایش طول ریشه و اندام هوایی و بهبود شاخص‌های رشدی در کلزا، گوجه‌فرنگی، برنج، جعفری، مرزنجوش و گندم شده است (Mencherini

et al., 2007; Banchio *et al*., 2008; del Rosario Cappellari *et al*., 2013). پورهادی (۱۳۹۰) نشان داد که کودهای بیولوژیک حاوی مجموعه‌ای از باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و حل کننده فسفات از جنس سودوموناس، در بهبود شاخص‌های کمی و کیفی گیاه تیمار شده مؤثر عمل کردند.

با توجه به چشم انداز بیوپرایمینگ بذر در بهبود ویژگی‌های رویشی گیاهان، تحقیق حاضر به بررسی اثر تیمار بذر به وسیله استرین‌های *Pseudomonas* همزیست در گره‌های ریزوبیومی و ریزوسفر ریشه گون که توانایی تثبیت نیتروژن دارند بر قدرت استقرار و ویژگی‌های کیفی گیاهچه‌های دو گونه گون نخودی و علوفه‌ای پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری از ریزوسفر و گره گون نخودی

بذر گون نخودی از مؤسسه تحقیقات جنگل و مراتع کشور دریافت و پس از ایجاد نشاء در اردیبهشت ماه سال‌های ۱۴۰۲ در استان البرز واقع در مزارع آزمایشی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کشت گردید، در اوایل تیر ماه همان سال، بوته‌های رشد یافته از خاک خارج و نمونه‌هایی از گره‌های جوان ریشه گیاه برداشت و به آزمایشگاه منتقل گردید. گره‌های جدا شده پس از شست‌وشو با آب جاری به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰٪ و یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد ضدعفونی و سپس چندین مرتبه با آب مقطر استریل شست و شو داده شدند. هر گره در یکی میلی لیتر آب مقطر استریل عصاره گیری و کشت شد (De Meyer *et al*., 2011). برای اطمینان از ضدعفونی صحیح گره‌ها، آب مرحله آخر شست‌وشو گره‌ها در محیط، کشت و از نظر عدم وجود آلودگی بررسی شد. همچنین، از خاک اطراف ریشه گون نخودی نمونه برداری انجام شد. از هر نمونه خاک رقت‌های سریالی (یک به ده) تهیه شد. برای تهیه سری رقت‌ها، ۱۰ گرم از نمونه خاک به ۹۰ میلی لیتر محلول نرمال‌سالین (۸/۵ گرم NaCl در لیتر) اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از همزن، همگن شدند؛ سپس از سوسپانسیون حاصله تا رقت 10^{-7} تهیه و در محیط کشت عمومی نوترینت آگار (NA) و King's B از طریق پخش با پخش‌کن شیشه‌ای کشت شدند. محیط‌های کشت شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت پنج روز نگه‌داری شدند. پس از طی این مدت کلنی‌های گرم منفی (بر اساس نتایج آزمون KOH سه درصد) به ویژه کلنی‌هایی با رنگ‌دانه فلورسنت در محیط King's B خالص سازی و برای ادامه بررسی‌ها در آب مقطر استریل در یخچال نگه‌داری شدند.

انتخاب جدایه‌های تثبیت کننده نیتروژن

برای انتخاب باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن، جدایه ها در محیط کشت NFB (شامل ۵ گرم مالیک اسید، ۴ گرم KOH، ۰/۰۵ گرم $FeSo_4.7H_2O$، ۰/۵ گرم K_2HPO_4، ۰/۰۱ گرم $MnSO_4.H_2O$، ۰/۱ گرم $MgSO_4.2H2O$، ۰/۰۲ گرم NaCl، ۰/۰۱ گرم $CaCl_2.2H2O$، ۰/۰۰۲ گرم $Na_2MoO_4.2H_2O$، ۲ میلی‌لیتر بروم‌تیمون‌بلو ۰/۵ درصد رقیق شده در الکل، ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب با اسیدیته۶/۸) کشت داده شدند. تغییر رنگ محیط از سبز به آبی نشان دهنده تثبیت نیتروژن است (Miladiarsi and Widyastuti, 2017).

شناسایی مولکولی بر اساس توالی‌یابی

استخراج DNA جدایه‌های منتخب با استفاده از کیت تجاری (FavorPrep™) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. قطعه عمومی 16S rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و پرایمرهای 27F (5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3) و 1492R (5- GGTTACCTTGTTACGACTT-3) تکثیر شد . واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از Taq 2x Master Mix Red (آمپلیکون، دانمارک) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. PCR تحت شرایط دمایی ۱۲ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ سیکل شامل واسرشت شدن به مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، اتصال پرایمر به مدت ۱ دقیقه در دمای۵۵ درجه سلسیوس، توسعه به مدت ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و در پایان توسعه نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد (Yang and Yen, 2012). محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید تا از تکثیر و کیفیت قطعه مورد نظر اطمینان حاصل شود. در نهایت قطعه تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت بیومجیک ژن ارسال و شباهت توالی‌های دریافت شده با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی NCBI و EzTaxon-e بررسی شد. سپس توالی‌ها در بانک اطلاعاتی ژنومی NCBI ثبت شدند.

برای ارزیابی دقیق‌تر توالی‌های نوکلئوتیدی حاصله، درخت فیلوژنتیکی به روش Likelihood با برنامه MEGA7 ترسیم و تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

بررسی برخی ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های منتخب

آزمون توانایی تولید اکسین (IAA): توانایی تولید هورمون ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها به روش رنگ سنجی سالکوفسکی سنجیده شد. جدایه‌ها درون محیط کشت نوترینت براث (NB) حاوی ۰/۲گرم در لیتر ال-تریپتوفان کشت داده شدند. به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکرانکوباتور با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴درجه سلسیوس با سرعت rpm ۱۳۰۰۰ سانتریوفیوژ شدند. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی لیتر معرف سالکوفسکی (۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل، ۱۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک، ۷/۵ میلی لیتر $FeCl_3$ ۰/۵ مولار) مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. تغییر رنگ محیط به رنگ قرمز متمایل به صورتی نشان دهنده تولید اکسین می باشد، در نهایت غلظت نوری آن‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر ارزیابی شد (Bent *et al*., 2001).

آزمون توانایی حلالیت فسفات

جدایه‌های مختلف باکتری از نظر توان حل فسفات ارزیابی شدند. جدایه‌های باکتری روی محیط کشت حاوی ۵ گرم $MgCl_2.6H_2O$، ۰/۲۵ گرم$MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲ گرم KCl، ۰/۲ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۵ گرم $Ca_3(PO4)_2$، ۱۰ گرم گلوگز و ۱۵ گرم آگار به صورت نقطه‌ای کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. مشاهده هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان دهنده توانایی در حلالیت فسفات و مثبت بودن آزمون برای جدایه مورد نظر می‌باشد (Castagno *et al*., 2011).

آزمون تولید آنزیم فیتاز

برای غربالگری باکتری‌ها از نظر تولید آنزیم فیتاز از محیط کشت PSM (Phytase Screening Medium) استفاده شد. محیط اختصاصی PSM شامل ۱۵ گرم گلوکز، ۵ گرم Na-phytate، ۵ گرم $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۵ گرم KCl، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۱ گرم NaCl، ۰/۱ گرم$CaCl_2$ ، ۰/۰۱ گرم $FeSo_4.7H_2O$، ۰/۰۱ گرم $MnSo_4.H_2O$، و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب با اسیدیته ۶/۵-۷ می‌باشد (Sasirekha *et al*., 2012). برای این بررسی پس از کشت نقطه‌ای جدایه‌ها، محیط کشت در دمای دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند؛ پس از طی این مدت ظهور هاله شفاف اطراف کلنی باکتری نشان دهنده تولید آنزیم فیتاز و تجزیه فیتات محیط می‌باشد.

بررسی توانایی تولید آنزیم ACC deaminase

باکتری‌ها از نظر توانایی مصرف آمینو سیکلو پروپان کربوکسیلات (ACC) با استفاده از روش پنروز و گلیک بررسی شدند (Penrose and Glick, 2001). ابتدا جدایه های در محیط کشت مایع TSB (Tryptone Soya Broth) به مدت ۲۴ ساعت تکثیر شدند، سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جوان هر جدایه در سه محیط کشت DF حاوی ۱۰۰میکرولیتر در لیتر محلول ۰/۳ مولار ACC، DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم (به عنوان شاهد مثبت) و DF پایه بدون منبع نیتروژن (به عنوان شاهد منفی) به صورت قطره گذاری کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. ضمن ارزیابی روزانه، پس از طی هفت روز اندازه کلنی‌ها در پلیت‌های کشت سنجیده و ارزیابی شدند.

محیط DF حاوی ۴ گرم KH_2PO_4، ۶ گرم Na_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۲گرم Glucose، ۲ گرم Gluconic asid، ۲ گرم Citric acid و عناصر میکرو شامل ۱میلی‌گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۱۰ میکروگرم H_3BO_3، ۱۱/۱۹ میکروگرم $MnSO_4.7H_2O$، ۱۲۴/۶ میکروگرم $ZnSO_4.7H_2O$، ۷۸/۲۲ میکروگرم $CuSO_4.5H_2O$ و ۱۰میکروگرم MoO3 با اسیدیته ۷/۲ گرم در یک لیتر آب می‌باشد.

پیش تیمار بذر با جدایه‌های باکتری

اثر تیمار بذر با جدایه‌های *Pseudomonas* بر شاخص جوانه‌زنی و ویژگی‌های رویشی بذرهای گون نخودی و گون علوفه‌ای در قالب طرح کاملا" تصادفی در سه تکرار به صورت جداگانه آزمایش شد. برای این منظور ابتدا بذرها در تیمار اسید سولفوریک ۹۸ درصد به مدت ده دقیقه غوطه ور شدند، سپس بذرها به مدت پنج دقیقه در هیپوکلریت سدیم پنج درصد و یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد ضد عفونی سطحی شدند و سپس به مدت یک ساعت در سوسپانسون جدایه‌های منتخب (OD:0.1) و کربوکسی متیل سلولز یک

درصد غوطه‌ور شدند. بذرهای تیمار شده در ترکیب پیت ماس و پرلیت در شرایط کنترل شده با دمای ۲۷-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بذرهای غوطه ور شده در محلول کربوکسی متیل سلولز یک درصد بدون باکتری نیز به عنوان کنترل منفی کشت شدند.

درصد جوانه‌زنی

بذرهای تیمار شده با باکتری‌های سودوموناس در سه تکرار در قالب طرح کاملا" تصادفی در بستر کاغذ جوانه زنی، کشت شدند. ظرف‌های کشت شده به مدت دو هفته در دمای ثابت ۲۵ درجه سلسیوس و روشنایی ۱۲۵۰ لوکس قرار داده شدند. به طور روزانه ظرف‌های کشت شده مورد بازدید قرار گرفت و تعداد بذرهای جوانه‌زده یادداشت شد. معیار بذرهای جوانه زده خروج ریشه‌چه به اندازه دو میلی‌متر بود. در پایان دوره، درصد جوانه‌زنی(Germination Percentage) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (Ranai and De Santanan, 2006; Dastapoor *et al*., 2013).

$$GP = (\frac{GN}{SN}) \times 100 \qquad \text{رابطه (۱)}$$

که در این رابطه GP: درصد جوانه‌زنی، GN: تعداد بذرهای جوانه زده و SN: تعداد کل بذرهای مورد آزمایش می‌باشد.

در پایان آزمایش صفات طول گیاهچه، ساقه‌چه و ریشه‌چه و نیز وزن خشک گیاهچه به‌وسیله ترازوی دیجیتالی مدلNM ABJ220-4 با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند. جهت اندازه‌گیری وزن خشک، گیاهچه ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و شاخص بنیه گیاهچه به صورت روابط ذیل محاسبه شدند (Abdul-baki, and Anderson, 1973).

رابطه (۲) وزن گیاهچه خشک × درصد جوانه‌زنی = شاخص بنیه وزنی

رابطه (۳) طول گیاهچه × درصد جوانه‌زنی = شاخص بنیه طولی

رابطه (۴) (طول گیاهچه + وزن گیاهچه) × درصد جوانه‌زنی = شاخص بنیه گیاهچه

داده‌های به دست آمده از این آزمایش با استفاده از نرم-افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس آزمون دانکن و در سطح احتمال ۱٪ بررسی شد و رسم شکل‌ها استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد.

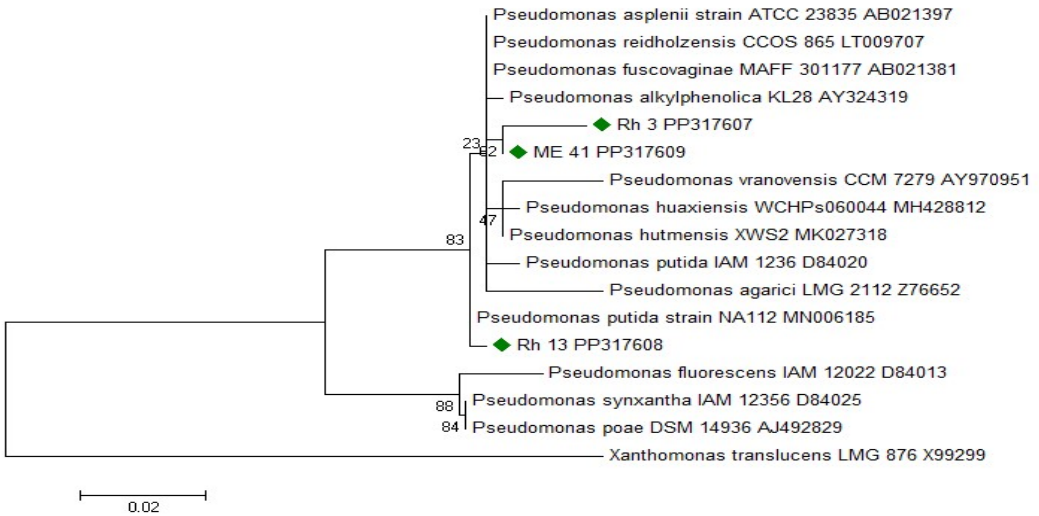
نتایج و بحث

در این تحقیق ۱۰۴ جدایه باکتری از خاک ناحیه ریزوسفر و گره‌های ریشه گون‌های نخودی و علوفه‌ای جداسازی شد. سویه‌های جداسازی شده تحت غربالگری اولیه قرار گرفتند و بر اساس آزمون‌های بیو شیمیایی اولیه از بین ۱۰۴ جدایه رشد یافته، نه جدایه به عنوان جنس سودوموناس انتخاب شدند که تنها سه جدایه قادر به تثبیت بیولوژیکی نیتروژن بودند که بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rDNA نیز، تعلق جدایه‌ها به جنس سودوموناس تایید شد (جدول۱). بر اساس نتایج BLAST و هم ترازی توالی‌ها، مشابهت جدایه‌های تحقیق حاضر با جدایه‌های رفرنس سودوموناس دریافت شده از پایگاه داده EzTaxon مشخص گردید (شکل ۱).

تحقیقات نشان داده علاوه بر باکتری‌های ریزوبیوم، سایر جنس‌ها یا گونه‌های باکتریایی نظیر *Pseudomonas* نیز می‌توانند جایگاه اکولوژیکی مشترکی را با ریزوبیوم‌ها در گره‌های ریزوبیومی ریشه بقولات اشغال کنند (Khalifa, and Almalki, 2015; Pastor-Bueis *et al*., 2021). تاکنون جدایه‌های مختلف باکتری از جمله جنس‌های *Stenotrophomonas*، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Chrysobacterium*، *Arthrobacter* از گره‌های ریزوبیومی جدا شده‌اند که بدون آسیب به میزبان به صورت اندوفیت در بافت گره ریشه مستقر می‌شوند. تعدد گزارشات در این زمینه حاکی از متداول بودن این موضوع است (Sánchez *et al*., 2014). همچنین مشخص شده همراهی برخی باکتری های سودوموناس فلور سنت نظیر *Pseudomonas putida* در گره‌ها می‌تواند به طور معنی‌داری فعالیت گره‌زایی و آنزیمی جدایه های ریزوبیوم را افزایش دهد (Tilak *et al*., 2006).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر باکتری‌های سودوموناس منتخب بر ویژگی‌های کیفی بذر و گیاهچه‌های گون نخودی و علوفه‌ای تفاوت معنی‌داری با شاهد در سطح یک درصد داشت. همچنین جدول ۳ و ۴ نتایج مقایسه میانگین و اختلاف آماری اثر باکتری‌های منتخب بر ویژگی های کیفی بذر و گیاهچه های گون نخودی و علوفه‌ای را در مقایسه با گیاهان شاهد نشان می‌دهند.

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کمترین وزن خشک گیاهچه‌ها در شاهد (بدون باکتری) مشاهده شد و کاربرد سویه‌های سودوموناس منجر به افزایش معنی‌دار وزن خشک گردید. سویه Rh3 در گون علوفه‌ای تاثیر



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های سودوموناس مربوط به تحقیق حاضر با جدایه‌های رفرنس سودوموناس دریافت شده از پایگاه داده EzTaxon بر اساس توالی 16S rDNA. از *Xanthomonas tranlucens* به عنوان جدایه برون گروهی استفاده شد.

جدایه نشان‌دار شده، جدایه‌های مورد بررسی در تحقیق حاضر است. ترسیم و تجزیه و تحلیل اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

Figure 1. Phylogenetic tree of Pseudomonas isolates related to the present research with reference Pseudomonas isolates downloaded from EzTaxon database based on 16S rDNA sequence. *Xanthomonas tranlucens* was used as an outgroup isolate.

The labeled isolates are the isolates investigated in the present study. Plotting and validation analysis were performed with 1000 replications.

معنی‌داری بر افزایش این صفت نسبت به تیمار شاهد نداشت اما در تیمار دو سویه Me41 و Rh13 تفاوت معنی‌داری دیده شد (جدول ۳). همچنین، در گیاهچه‌های گون نخودی کاربرد دو سویه Rh3 و R13 منجر به افزایش معنی‌دار این صفت گردید (جدول ۴). تحقیقات نشان داده کارامد بودن تلقیح سویه‌های مختلف باکتریایی بر ارتقای رشد گیاه به برهمکنش گیاه و باکتری بستگی دارد (Ansari and Ahmad, 2019).

به طور کلی هر سه جدایه Rh 3، Rh 13 و Me 41 با اثرات محرک رشدی به طور معنی‌داری با عث بهبود جوانه‌زنی، افزایش ر شد گیاهچه و به ویژه افزایش شاخص بنیه گیاهچه در هر دو گروه بذر گون نخودی و گون علوفه‌ای شدند. بهبود شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های گون در اثر تیمار بذر با هر سه باکتری نشان داد هر سه جدایه در بیوپرایمینگ بذر پتانسیل مناسبی برای تحریک رشد گیاه داشتند. باکتری‌های محرک رشد از طریق تولید مواد مختلف اثرات مثبت در رشد و توسعه گیاهان دارند که عمدتا" از طریق فعالیت‌هایی نظیر حلالیت فسفات و تثبیت نیتروژن، در تامین مواد غذایی گیاه، اثر گذار هستند (Wdowiak-Wróbel and Małek, 2016; Ahemad and Kibret 2014).

طول ریشه‌چه به طور معنی‌داری توسط دو جدایه Rh3 و Rh13 که از ریزوسفر جداسازی شده است، افزایش یافت. تلقیح گیاهان با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و تولید کننده ACC دآمیناز از طریق تأمین نیتروژن و کاهش سطح اتیلن، باعث افزایش طول ریشه‌ها نیز می‌شوند (Saleem *et al*., 2007; Bhattacharyya and Jha, 2012; Beneduzi *et al*., 2012). همچنین بسیاری از باکتری‌هایی محرک رشد با تولید هورمون ایندول استیک اسید (IAA)، باعث افزایش طول ریشه و تعداد ریشه‌های مویین می‌شوند (Zaidi *et al*., 2010; Zhao, 2010). نتایج تحقیقی نشان داده است تلقیح بذرهای گونه‌ی گون علوفه‌ای با باکتری محرک رشد سودوموناس (*Pseudomonas* sp.) و باسیلوس (*Bacillus* sp.) باعث افزایش طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و شاخص بنیه بذر می‌شود (حاج هاشمی و همکاران،۱۳۹۷).

بیشترین افزایش طول گیاهچه به طور معنی‌داری توسط جدایه Rh13 که بر اساس نتایج توالی یابی بیشترین شباهت را به گونه *P. putida* (99.83%) داشت، تشخیص داده شد (شکل ۲). تحقیقات متعددی جدایه‌های مختلف گونه *P. putida* را به عنوان یک باکتری موفق در تحریک رشد گیاه و ویژگی‌های رویشی آن معرفی نموده‌اند

(Costa-Gutierrez *et al*., 2022). همچنین مطالعات نشان داده است که *P. putida* در ریزوسفر از ترشحات ریشه تغذیه کرده و با تولید پیش‌سازهای هورمون گیاهی به رشد گیاه کمک کرده، همچنین با تولید انواعی از آنتی بیوتیک‌ها از رشد پاتوژن‌ها جلوگیری می‌کند (Molina *et al*., 2020).

جدول ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گون علوفه‌ای در تیمارهای بذر به وسیله باکتری‌های *Pseudomonas* sp جدا شده از گره‌های ریزوبیومی و ریزوسفر

Table 1. Mean comparison of seed germination indices of *Astragalus cyclophyllon* under treatments with *Pseudomonas* sp that isolated from root nodules and rhizosphere

تیمار Treatment	محل جداسازی	درصد جوانه‌زنی Germination percentage (%)	وزن خشک گیاهچه (گرم) Seedling dry weight (gr)	طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) Radicle length (cm)	طول ساقه‌چه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	طول گیاهچه (سانتی‌متر) Seedling length (cm)	شاخص بنیه گیاهچه Seedling vigor index
Control	--	45.5^{c}	0.048^{b}	4.86^{c}	5.93^{c}	10.79^{c}	493.13^{d}
Rh3	Rhizosphere	54.3^{b}	0.048^{b}	5.46^{b}	6.16^{b}	11.63^{b}	630.96^{b}
Rh 13	Rhizosphere	46^{c}	0.054^{a}	5.9^{a}	7.26^{a}	13.16^{a}	605.36^{c}
Me41	Nodule	55.3^{a}	0.05^{ab}	4.83^{c}	6.93^{ab}	11.8^{ab}	650.32^{a}

میانگین‌های دارای حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشند.

Means followed by similar letter are not significantly different at 1% probability levels using Duncan test.

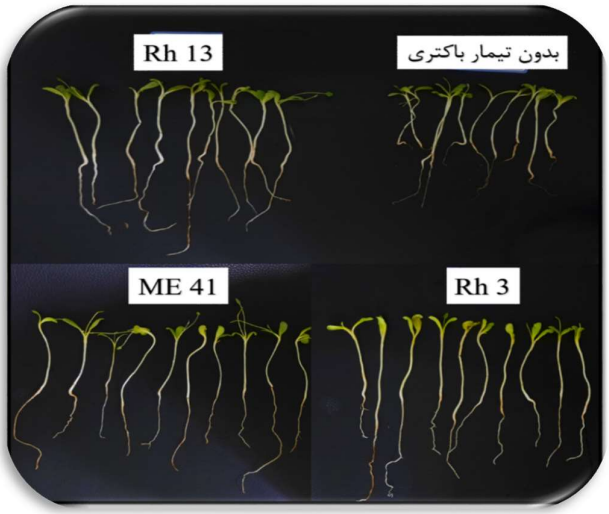
جدول۲- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گون نخودی در تیمارهای بذر به وسیله باکتری‌های *Pseudomonas* sp. جدا شده از گره‌های ریزوبیومی و ریزوسفر

Table 2. Mean comparison of seed germination indices of *Astragalus cicer* under treatments with *Pseudomonas* sp that isolated from root nodules and rhizosphere

تیمار Treatment	درصد جوانه زنی Germination percentage (%)	وزن خشک گیاهچه (گرم) Seedling dry weight (gr)	طول ریشه‌چه (سانتی‌متر) Radicle length (cm)	طول ساقه‌چه (سانتی‌متر) Shoot length (cm)	طول گیاهچه (سانتی‌متر) Seedling length (cm)	شاخص بنیه گیاهچه Seedling vigor index
Control	35.7^{b}	0.021^{b}	3.4^{b}	3.1^{b}	6.5 ^{b}	232.8^{c}
Rh3	48.3^{ab}	0.027^{a}	4.4^{a}	2.9^{c}	7.4^{a}	358.7^{b}
Rh 13	50^{a}	0.028^{a}	4.3^{a}	3.4^{a}	7.7^{a}	386.4^{a}
Me41	49^{a}	0.027^{a}	4.2^{a}	3.1^{a}	7.3^{a}	359.02^{b}

میانگین‌های دارای حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشند.

Means followed by similar letter are not significantly different at 1% probability levels using Duncan test.



شکل ۲- تاثیر تیمار باکتری‌های جدا شده از ریشه و گره گون نخودی بر رشد گیاهچه‌های گون علوفه‌ای

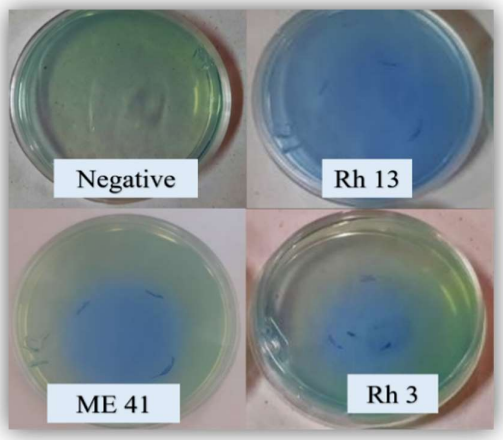
Figure 2. Effects of *Pseudomonas* sp that isolated from rhizosphere and root nodules of *Astragalus cicer* on growth of *Astragalus cyclophyllon* plantlets

توانایی جدایه‌های باکتری در تثبیت نیتروژن و سایر توانایی‌های محرک رشد

بررسی برخی ویژگی‌های محرک رشدی باکتری‌های منتخب نشان داد که هر سه جدایه سودوموناس قادر به تثبیت نیتروژن بودند (جدول ۳ و شکل ۳). باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن به وسیله آنزیم نیتروژناز، نیتروژن اتمسفر را دریافت و به صورت قابل دسترس طی فرایند تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در اختیار گیاه قرار می‌دهند و میزان دسترسی گیاه را به این ماده مغذی ضروری هموار می‌نماید. (Bhattacharjee *et al*., 2008). نیتروژن، علاوه بر این که به عنوان یک ماده مغذی اساسی در کیفیت رشد گیاهچه‌ها ایفای نقش می‌نماید، به عنوان یک مولکول سیگنال، جوانه زنی بذر را نیز تقویت می‌کند (Osuna *et al*., 2015). جدایه Me41 نیز که به صورت اندوفیت در گره‌های ریزوبیومی ریشه گیاه میزبان می‌تواند به همراه باکتری‌های ریزوبیوم در تأمین نیاز نیتروژن گیاه و افزایش جذب نیتروژن از خاک در همزیستی گیاه و ریزوبیوم ایفای نقش نماید (Noreen *et al*., 2019). مطالعات مختلف نشان داده جوانه زنی بذر به صورت قابل توجهی تحت تاثیر نیتروژن قابل دسترس برای گیاه است (Kolodziejek *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2020).

در بین جدایه‌ها، تنها جدایه Rh13 قادر به تولید آنزیم ۱-آمینو سیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید دآمیناز (ACC) بود. این جدایه قابلیت تجزیه ACC را به عنوان پیش ماده تولید اتیلن دارد و از آن به عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کند. مشخص شده ACC دآمیناز در افزایش گره‌زایی باکتری‌های ریزوبیوم از طریق کاهش اتیلن ایفای نقش می‌نماید (Glick 2014; Nascimento *et al*. 2012). با توجه به این که اتیلن مانع استقرار موفق و گره-زایی باکتری‌های رایزوبیوم می‌شود، تولید این آنزیم توسط سایر باکتری‌های همزیست می‌تواند در کاهش سطح اتیلن و افزایش همزیستی باکتری‌های ریزوبیوم با گیاه اهمیت داشته باشد (Wdowiak-Wróbel and Małek, 2016; Glick 2014). تحقیقات وانگ و همکاران نشان داده اثربخشی برخی از سودوموناس‌های عامل کنترل زیستی به طور قابل توجهی پس از دریافت ژن *acdS* افزایش یافته است (Wang *et al*., 2000). آنزیم ACC دآمیناز با کاهش سطح اتیلن باعث کاهش فاکتورهای سرکوب کننده سنتز اکسین می شود و به طور غیر مستقیم با افزایش تولید اکسین نیز باعث افزایش رشد گیاه می‌شود (Glick *et al*., 2007).

جدایه Rh13 برخلاف دو جدایه دیگر توانایی تولید هورمون ایندول استیک اسید را نشان داد. تولید این هورمون توسط باکتری‌ها از مسیرهای مختلف بیوسنتزی گزارش شده است. IAA تولید شده توسط باکتری‌ها در تعامل با گیاهان می‌تواند عملکردهای متفاوتی از بیماریزایی تا تحریک رشد گیاه را از خود نشان دهند اما آنچه که در رابطه با این هورمون مشخص است نقش مؤثر آن در تعامل باکتری و گیاه و به ویژه عملکرد آن در راهکار کلنیزاسیون باکتری از طریق دور زدن سیستم دفاعی گیاه و همچنین



شکل ۳- توانایی متفاوت جدایه های Rh13، Rh3 و Me41 در تثبیت نیتروژن در محیط NFB یک روز پس از کشت

Figure 3. The different ability of Rh13, Rh3 and Me41 isolates in nitrogen fixation on NFB medium one day after culture

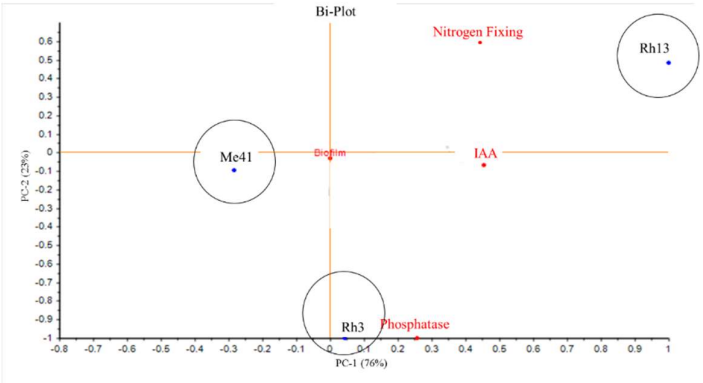
جدول ۳- برخی ویژگی‌های محرک رشدی جدایه‌های *Pseudomonas* مورد بررسی در تحقیق حاضر

Table 3. Some of plant growth-promoting traits of *Pseudomonas* isolates that investigated in this study

نام جدایه	محل جداسازی	شماره دسترسی در NCBI	شباهت به گونه	ACC دآمیناز	تثبیت نیتروژن	تولید اکسین	تولید فیتاز	حلالیت فسفات
Rh13	ریزوسفر	PP317608	*Pseudomonas. putida* (99.83%)	+	+	+	+	+
ME41	گره	PP317609	*Pseudomonas* sp	-	+	–	+	+
Rh3	ریزوسفر	PP317607	*Pseudomonas* sp	-	+	–	+	+

توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه است (Spaepen *et al*., 2007). هر سه جدایه مورد بررسی علاوه بر قابلیت حلالیت فسفات معدنی از منبع تری کلسیم فسفات قابلیت تولید فیتاز با توانایی حل کنندگی فسفات آلی را دارد (جدول ۱). پیش از این تحقیقات نشان داده باکتری‌های جنس سودوموناس، ریزوبیوم و باسیلوس مهمترین میکروارگانیسم های حل کننده فسفات در گیاهان به شمار می‌روند (Rodríguez and Fraga, 1999). حلالیت فسفات توسط برخی جدایه‌های سودوموناس با استفاده از چندین آنزیم مختلف نظیر آنزیم فیتاز و آلکالین فسفاتاز و اسید فسفاتاز گزارش شده است که باعث افزایش فسفر قابل دسترس و افزایش رشد گیاه می‌شود (Ortega-Torres *et al*., 2021).

نتایج تحلیل مؤلفه‌های اصلی از داده‌های مربوط به ویژگی‌های محرک رشدی سه جدایه سودوموناس Rh13، Rh3 و Me41 نشان داد، ویژگی تثبیت نیتروژن بیشترین تاثیر را در واریانس داده ها داشته است و مناسب‌ترین باکتری از نظر ویژگی‌های محرک رشدی جدایه Rh13 مشخص شد (شکل ۲). این یافته منطبق با برخی بررسی‌ها است که تثبیت نیتروژن را به عنوان یکی از عوامل اصلی و اثرگذار در باکتری‌های محرک رشد نشان داده است و حتی تاثیر این باکتری‌ها در تنظیم متابولیسم و تجمع برخی متابولیت ها در گیاه تیمار شده را نشان داده است (Shi *et al*., 2024).



شکل ۵- تحلیل مؤلفه‌های اصلی داده‌های بدست آمده از ویژگی‌های سه جدایه سودوموناس Rh13، Rh3 و Me41. PC1 و PC2 به ترتیب ۷۶ و ۲۳ درصد واریانس داده‌ها را نشان می‌دهد.

Figure 5. Principal component analysis of data obtained from the characteristics of three *Pseudomonas* isolates Rh13, Rh3 and Me41. PC1 and PC2 represent 76 and 23% of the data variance, respectively.

نتیجه‌گیری کلی

تحقیق حاضر نشان داد باکتری‌های سودوموناس جدا سازی شده به وا سطه مکانیسم‌های مختلفی همچون تثبیت نیتروژن، توانایی حلالیت فسفات، تولید هورمون اکسین، توانایی تولید آنزیم ACC دآمیناز توانستند درصد جوانه‌زنی و شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های هر دو گون مورد برر سی را افزایش دهند. پتانسیل بالقوه این جدایه‌ها در بهبود جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه گون، امکان بهره برداری از آنها را در بیوپرایمینگ بذور گون نشان داد. باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی می‌توانند راهکار مناسبی جهت بهبود جوانه‌زنی بذرها و شاخص‌های ر شدی گیاهان باشند. همچنین نتایج این بررسی نشان داد گره‌ها

ریزوبیومی با وجود این که جایگاه اصلی باکتری های ریزوبیومی در بقولات محسوب می‌شوند، اما می‌توانند محل استقرار و تعاملات باکتری-باکتری و باکتری- میزبان توسط سایر باکتری‌های غیر ریزوبیومی نیز باشند. از آنجایی که استفاده از کودهای شیمیایی ازته و فسفاته، می‌تواند اثرات مخربی بر محیط زیست نظیر از دست دادن تنوع میکروبی خاک، تغییرات در جامعه باکتریایی و تحریک کانی سازی نیتروژن آلی خاک و ... داشته باشد؛ بنابراین توسعه روش‌هایی مانند استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک ضمن افزایش میزان نیتروژن و فسفات بازیافت شده، سبب احیای میکروبی خاک نیز می‌شود از اهمیت بسیار بالایی در کشاورزی پایدار برخوردار است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور به دلیل تامین اولیه بذر گون نخودی سپاسگزاری می‌گردد، همچنین از همکاران مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال و گروه گیاه‌پزشکی دانشکده پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در همکاری علمی در این تحقیق قدردانی می‌شود.

منابع

Abdul-Baki, A.A. and Anderson, J.D. 1973. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria 1. Crop Science, 13(6): 630-633. DOI: 10.2135/cropsci1973.0011183X001300060013x. **(Journal)**

Acharya, S.N., Kastelic, J.P., Beauchemin, K.A. and Messenger, D.F. 2006. A review of research progress on cicer milkvetch (*Astragalus cicer* L.). Canadian Journal of Plant Science, 86(1): 49-62. Doi: 10.4141/P04-174. **(Journal)**

Ahemad, M. and Kibret, M. 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King saud University-science, 26(1): 1-20. DOI: 10.1016/j.jksus.2013.05.001. **(Journal)**

Ansari, F.A. and Ahmad, I. 2019. *Fluorescent Pseudomonas*-FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. Scientific reports, 9(1): 4547. DOI: 10.1038/s41598-019-40864-4. **(Journal)**

Ardestani, E.G., Tarkesh, M., Bassiri, M., and Vahabi, M.R. 2015. Potential habitat modeling for reintroduction of three native plant species in central Iran. Arid Land, 7: 381-390. DOI: 10.1007/s40333-014-0050-4. **(Journal)**

Banchio, E., Bogino, P.C., Zygadlo, J. and Giordano, W. 2008. Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. Biochemical Systematics and Ecology, 36(10): 766-771. DOI: 10.1016/j.bse.2008.08.006. **(Journal)**

Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L.M. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. Genetics and Molecular Biology, 35: 1044-1051. DOI: 10.1590/s1415-47572012000600020. **(Journal)**

Bennett, A.J., Mead, A. and Whipps, J.M. 2009. Performance of carrot and onion seed primed with beneficial microorganisms in glasshouse and field trials. Biological Control, 51(3): 417-426. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2009.08.001. **(Journal)**

Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 47: pp.793-800. DOI: 10.1139/cjm-47-9-793. **(Journal)**

Bhattacharjee, R.B., Singh, A. and Mukhopadhyay, S.N. 2008. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. Applied Microbiology and Biotechnology, 80(2): 199-209. DOI 10.1007/s00253-008-1567-2. **(Journal)**

Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 1327-1350. DOI: 10.1007/s11274-011-0979-9. **(Journal)**

Costa-Gutierrez, S.B., Adler, C., Espinosa-Urgel, M. and de Cristóbal, R.E. 2022. *Pseudomonas putida* and its close relatives: mixing and mastering the perfect tune for plants. Applied Microbiology and Biotechnology, 106(9): 3351-3367. DOI: 10.1007/s00253-022-11881-7. **(Journal)**

Castagno, L.N., Estrella, M.J., Sannazzaro, A.I., Grassano, A.E. and Ruiz, O.A. 2011. Phosphate-solubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti*

isolated from Lotus tenuis rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). Journal of Applied Microbiology, 110(5): 1151-1165. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011. 04968.x. **(Journal)**

Davis, A.M. 1982. Nitrogen production by selected Astragalus species 1. Agronomy Journal, 74(3): 454-456. DOI: 10.2134/agronj1982.00021962007400030014x. **(Journal)**

del Rosario Cappellari, L., Santoro, M.V., Nievas, F., Giordano, W. and Banchio, E. 2013. Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. Applied Soil Ecology, *70*: 16-22. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.04.001. **(Journal)**

Dobbelaere, S., Vanderleyden, J. and Okon, Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critical Reviews in Plant Sciences, 22(2): 107-149. DOI: 10.1080/713610853. **(Journal)**

Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J. and McConkey, B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Critical Reviews in Plant Sciences, 26(5-6): 227-242. DIO: 10.1016/j.joule.2018.11.008. **(Journal)**

Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. Microbiological Research, 169(1): 30-39. DOI: 10.1016/j.micres.2013.09.009. **(Journal)**

Halbleib, C.M. and Ludden, P.W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. The Journal of Nutrition, 130(5), pp.1081-1084. DOI: 10.1093/jn/130.5.1081. **(Journal)**

Haj Hashemi, R., Ebrahimi, A., Ghasare, A. 2017. Investigating the effect of growth-promoting bacteria on the germination components of *Astragalus cyclophyllon* seeds under drought stress conditions. The Second National Conference of Knowledge and Technology of Agricultural Sciences, Natural Resources and Environment of Iran. (In Persian)**(Conference)**

Islam, S., Akanda, A.M., Prova, A., Islam, M.T. and Hossain, M.M., 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. Frontiers in microbiology, 6: 1360. doi: 10.3389/fmicb.2015.01360. **(Journal)**

Israr, D., Mustafa, G., Khan, K.S., Shahzad, M., Ahmad, N. and Masood, S. 2016. Interactive effects of phosphorus and *Pseudomonas putida* on chickpea (*Cicer arietinum* L.) growth, nutrient uptake, antioxidant enzymes and organic acids exudation. Plant Physiology and Biochemistry, 108: 304-312. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.07.023. **(Journal)**

Khalifa, A.Y. and Almalki, M.A. 2015. Isolation and characterization of an endophytic bacterium, *Bacillus megaterium* BMN1, associated with root-nodules of *Medicago sativa* L. growing in Al-Ahsaa region, Saudi Arabia. Annals of Microbiology, 65: 1017-1026. DOI 10.1007/s13213-014-0946-4. **(Journal)**

Li, H.B., Singh, R.K., Singh, P., Song, Q.Q., Xing, Y.X., Yang, L.T. and Li, Y.R. 2017. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. Frontiers in Microbiology, 8: 1268. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01268. **(Journal)**

Xiao Xia, L., Qu Lu, Q.L., Dong YongZhe, D.Y., Han LiFeng, H.L., Liu ErWei, L.E., Fang ShiMing, F.S., Zhang Yi, Z.Y. and Wang Tao, W.T. 2014. A review of recent research progress on the Astragalus genus. Molecules, 19(11): 18850-18880. DOI:10.3390/molecules191118850. **(Journal)**

Maassoumi, A.A. 2005. The genus *Astragalus* in Iran Vol. 5. Perennials. Research Institute of Forests and Rangelands, 804 pp. (In Persian)**(Book)**

Mencherini, T., Picerno, P., Scesa, C. and Aquino, R. 2007. Triterpene, antioxidant, and antimicrobial compounds from *Melissa officinalis*. Journal of Natural Products, 70(12): 1889-1894. DOI: 10.1021/np070351s. **(Journal)**

Meyer, J.M. 2000. Pyoverdines: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of *fluorescent Pseudomonas* species. Archives of microbiology, 174: 135-142. DOI: 10.1007/s002030000188. **(Journal)**

Miladiarsi, N.R.M. and Widyastuti, R. 2017. Selection, characterization and application of rhizobacteria and its effect on chili (*Capsicum annuum* L.) plant growth. Research Journal of Microbiology, 12: 161-169. DOI: jm.2017.161.169. **(Journal)**

Molina, L., Segura, A., Duque, E. and Ramos, J.L. 2020. The versatility of *Pseudomonas putida* in the rhizosphere environment. In Advances in applied microbiology (Vol. 110: 149-180). Academic Press. DOI: 10.1016/bs.aambs.2019.12.002. **(Journal)**

Murunde, R. and Wainwright, H. 2018. Bio-priming to improve the seed germination, emergence and seedling growth of kale, carrot and onions. Global Journal of Agricultural Research, 6(3): 26-34. www.eajournals.org **(Journal)**

Nascimento, F.X., Brígido, C., Glick, B.R., Oliveira, S. and Alho, L. 2012. Mesorhizobium ciceri LMS-1 expressing an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. Letters in Applied Microbiology, *55*(1), pp.15-21. doi:10.1111/j.1472-765X.2012.03251. x. **(Journal)**

Noreen, R.U.B.I.N.A., Ali, S.A., Hasan, K.A., Habiba, F.U., Tariq, A., Ara, J. and Ehteshamul-Haque, S. 2019. Role of fluorescent Pseudomonas associated with root nodules of mungbean in the induction of nodulation by the rhizobia in mungbean. Pakistan Journal of Botany, 51(3): 1161-1168. DOI: 10.30848/PJB2019-3(44). **(Journal)**

Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S. and Downie, J.A. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. Annual Review of Genetics, 45(1): 119-144. DOI: 10.1146/annurev-genet-110410-132549. **(Journal)**

Ortega-Torres, A.E., Rico-García, E., Guzmán-Cruz, R., Torres-Pacheco, I., Tovar-Pérez, E.G. and Guevara-González, R.G. 2021. Addition of phosphatases and phytases to mature compost to increase available phosphorus: a short study. Agronomy, 11(12): 2555. DOI: 10.3390/agronomy11122555. **(Journal)**

Osuna, D., Prieto, P. and Aguilar, M. 2015. Control of seed germination and plant development by carbon and nitrogen availability. Frontiers in Plant Science, *6*: 1023. DOI: 10.3389/fpls.2015.01023. **(Journal)**

Pastor-Bueis, R., Jiménez-Gómez, A., Barquero, M., Mateos, P.F. and González-Andrés, F. 2021. Yield response of common bean to co-inoculation with Rhizobium and Pseudomonas endophytes and microscopic evidence of different colonised spaces inside the nodule. European Journal of Agronomy, 122: 126187. DOI: 10.1016/j.eja.2020.126187. **(Journal)**

Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2001. Levels of ACC and related compounds in exudate and extracts of canola seeds treated with ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 47(4): 368-372. DOI: 10.1139/w01-014. **(Journal)**

Pourhadi, M. 2011. Effect of biofertilizers on the yield and essential oil of peppermint (*Mentha piperita* L.). Jornal of Medicinal Herbs, 1: 137-148. (In Persian)**(Journal)**

Rodríguez, H. and Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances, 17(4-5): pp.319-339. DOI: 10.1016/S0734-9750(99)00014-2. **(Journal)**

Sasirekha, B., Bedashree, T. and Champa, K.L. 2012. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. European Journal of Experimental Biology, 2(1), pp.95-104. www.pelagiaresearchlibrary.com. **(Journal)**

Salehi Eskandari, B., S. M. Ghaderian, R. Ghasemi, and H. Schat. 2017. Optimization of seed germination in an Iranian serpentine endemic, *Fortuynia garcinii*. Flora, 231:38-42. DOI: 10.1016/j.flora.2017.04.005. **(Journal)**

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. and Bhatti, A.S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 34(10): 635-648. DOI 10.1007/s10295-007-0240-6. **(Journal)**

Sakshi, I., Saroj, S., Devendra Kumar, C., Hemant Kumar, G. and RK, G. 2011. Molecular characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from root nodules of various leguminous plants of Shekhawati Region, Rajasthan, India. American Journal of Plant Sciences, 2012. DOI:10.4236/ajps.2012.31005. **(Journal)**

Sánchez, A.C., Gutiérrez, R.T., Santana, R.C., Urrutia, A.R., Fauvart, M., Michiels, J. and Vanderleyden, J. 2014. Effects of co-inoculation of native *Rhizobium* and *Pseudomonas* strains on growth parameters and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under Cuban soil conditions. European Journal of Soil Biology, 62: 105-112. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2014.03.004. **(Journal)**

Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews, 31(4): 425-448. DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00072. x. **(Journal)**

Tavili, A., Abbasi Khalaki, M., Moameri, M. 2012. Effect of different methods of breaking dormancy

on seed germination and some trait of *Astragalus tribuloides*. Journal of Seed Science and Technology, 1(1): 64-72. DOI: 10.22092/ijsst.2020.128801.1316. (In Persian)**(Journal)**

Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N. and Manoharachari, C. 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). European Journal of Soil Science, 57(1): 67-71. DOI: 10.1111/j.1365-2389.2006. 00771.x. **(Journal)**

Vurukonda, S.S.K.P., Vardharajula, S., Shrivastava, M. and SkZ, A. 2016. Enhancement of drought stress tolerance in crops by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiological Research, 184: 13-24. DOI: 10.1016/j.micres.2015.12.003. **(Journal)**

Wang, C., Knill, E. Glick, B. R., and Defago, G. 2000. Effect of transferring ´ 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. Canadian Journal of Microbiology, 46: 898–907. DOI: 10.1139/w00-071. **(Journal)**

White, P.J. and Brown, P. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. Annals of Botany, 105: 1073-1080. DOI: 10.1093/aob/mcq085. **(Journal)**

Wdowiak-Wróbel, S. and Małek, W. 2016. Properties of *Astragalus* sp. microsymbionts and their putative role in plant growth promotion. Archives of Microbiology, 198: 793-801. DOI 10.1007/s00203-016-1243-3. **(Journal)**

Yang, A. and Yen, C. 2012. PCR optimization of BOX-A1R PCR for microbial source tracking of *Escherichia coli* in waterways. Journal of Experimental and Microbiological Immunology, 16: 85-89**. (Journal)**

Zaidi, A., Khan, M.S., Rizvi, A., Saif, S., Ahmad, B. and Shahid, M. 2017. Role of phosphate-solubilizing bacteria in legume improvement (175-197). Springer International Publishing. DOI: 10.1007/978-3-319-59174-2_8. **(Journal)**

Zhao, Y., 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual Review of Plant Biology, 61(1): 49-64. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112308. **(Journal)**

Zare Kia, S., Jafari, A.A., Zandi Esfahan, E., Fallah Hosseini, L. 2013. Study on germination of some perennial herbaceous Astragalus. Iranian Journal of Range and Desert Research, 20: 88-1. DOI: 10.22092/ijrdr.2013.2985. **(Journal)**

Zhang, T., Liu, M., Huang, X., Hu, W., Qiao, N., Song, H., Zhang, B., Zhang, R., Yang, Z., Liu, Y. and Miao, Y. 2020. Direct effects of nitrogen addition on seed germination of eight semi-arid grassland species. Ecology and Evolution, 10(16): 8793-8800. DOI: 10.1002/ece3.6576. **(Journal)**

Zhiyong, S., Yaxuan, G., Yuanyuan, W., Xiang, Y., Xu, G., Zhenhong, L., Jingping, N., Jianping, L. and Zhenyu, L. 2024. Nitrogen-fixing bacteria promote growth and bioactive components accumulation of *Astragalus mongholicus* by regulating plant metabolism and rhizosphere microbiota. BMC Microbiology, 24(1): 261. DOI: 10.1186/s12866-024-03409-y. **(Journal)**

The biological priming effect of *Astragalus cicer* and *Astragalus cyclophyllon* seeds by nitrogen-fixing Pseudomonas that located in rhizobia nodules and rhizosphere

Bita Alizadeh[1], Masoud Ahmadzadeh[2], Kobra Moslemkhani*[3]

Received: December 24, 2024 Accepted: February 5, 2025

Abstract

Despite the importance of some Astragalus species in providing fodder in pastures due to difficult germination and weak seedlings, the development of commercial cultivation of these plants has not been considered. Several researches have recommended the potential of probiotic bacteria, especially some *Pseudomonas* isolates, to increase germination and improve vegetative vigor of plants.In addition to isolating *Pseudomonas* strains with the ability to nitrogen fixation from the rhizosphere and rhizobia nodules of *Astrgalus cicer* and *A. cyclophyllon,* which established in the experimental fields in Alborz province, the present research investigated the effect of the selected Pseudomonas on the growth improvement of mentioned species. Based on preliminary biochemical assays and sequencing, three Pseudomonas species with plant growth-promoting traits were identified from the rhizobia nodule and rhizosphere. Based on the 16S rDNA sequence, the Rh13 strain showed the most similarity (99.83%) to *Pseudomonas putida* species and in all plant growth-promoting traits such as nitrogen fixation, Phosphate solubilization, ndole-3-acetic acid (IAA) production, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase production (ACC deaminase) and phytase production were evaluated as positive. Compared to the control, this isolates significantly improved vegetative factors in both Astragalus species. Seed treatment with two isolates Me41 and Rh3 also increased the germination rate by 10 and 13%, respectively. The results of principal component analysis showed that the most important factor differentiating the strains in terms of growth-promoting traits was nitrogen fixation as a vital macronutrient in improving seedling growth. Seed treatment with useful isolates of Pseudomonas can improve the faster establishment of *Astragalus* species in competition with other pasture weeds, restore the beneficial microbial population and increase the richness of the soil through the supply of usable nitrogen and phosphorus for plants.

Keywords: *Astragalus cicer*; *Astragalus cyclophyllon*; Bacteria; Biopriming; Growth promoting; *Pseudomonas*

How to cite this article
Alizadeh, B., Ahmadzadeh, M. and Moslemkhani, K. 2025. The biological priming effect of *Astragalus cicer* and *Astragalus cyclophyllon* seeds by nitrogen-fixing *Pseudomonas* that located in rhizobia nodules and rhizosphere. Iranian Journal of Seed Science and Research, 11(4): 53-66. (In Persian)**(Journal)**
DOI: 10.22124/jms.2024.8798

COPYRIGHTS
Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research
The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. MSc. graduated in Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. bita.alizade@ut.ac.ir
2. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. ahmadz@ut.ac.ir
3. Associate Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran. Moslemkhany@yahoo.com
*Corresponding author: Moslemkhany@yahoo.com