

مقایسه کارایی باکتری‌های محرک رشد و کود شیمیایی در بهبود رشد و

عملکرد گیاه گندم

سمیه امامی^{۱*}؛ حسینعلی علیخانی^۲؛ احمد علی پوربابایی^۳؛ حسن اعتصامی^۴؛ فریدون سرمدیان^۲ و بابک

متشعزاده^۳

۱- دانش‌آموخته دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴- استادیار گروه علوم و مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت ۹۸/۰۸/۲۶-تاریخ پذیرش ۹۸/۱۲/۱۲)

چکیده:

امروزه استفاده بی‌رویه از کودهای شیمیایی در زمین‌های کشاورزی به دلیل نگرانی‌های زیست محیطی مورد بحث است، بنابراین یافتن راهکارهای جایگزین برای کاهش اثرات مضر فعالیت‌های کشاورزی حائز اهمیت است. هدف از این تحقیق، بررسی پتانسیل جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست جداسازی شده از ریشه گیاه گندم به منظور بررسی ویژگی‌های محرک رشد و اثر آن‌ها بر شاخص‌های رشد گیاه گندم و کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفر بود. به این منظور ابتدا باکتری‌ها از نظر تولید هورمون ایندول استیک اسید در محیط کشت حاوی ال-تریپتوفان غربال‌گری شدند و توانایی آن‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی و آلی ارزیابی شد. در ادامه توانایی این باکتری‌ها در بهبود رشد گیاه گندم در یک آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 به ترتیب با تولید ۲۹۹/۲ و ۳۳۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر و همچنین تولید ۱۹/۲ و ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر هورمون ایندول استیک اسید به عنوان جدایه‌هایی با توان انحلال فسفات‌های نامحلول و مولد ایندول استیک اسید انتخاب شدند. نتایج حاصل از تعیین توالی 16S rRNA نشان داد که جدایه‌های باکتریایی فراریشه‌ای (R185) و درون‌رست (E240) از جنس *Pseudomonas* بودند. به استناد نتایج حاصله، مایه‌کوبی تلفیقی با باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست موجب افزایش ۵۵/۶ درصدی در مقدار فسفر گیاه شد در حالی‌که این مقدار در مورد مایه‌کوبی جداگانه با باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست به ترتیب ۳۵/۶ و ۳۶/۴ درصد بود. در ارتباط با ارقام گندم، رقم روشن نسبت به رقم مرودشت درصد فسفر بالاتر (۴/۷ درصد) و بیومس ریشه بیشتری (۱۴/۲ درصد) تولید کرد.

کلید واژگان: باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست، کود شیمیایی، گندم، کود زیستی، مؤلفه‌های محرک رشد گیاه

۱. مقدمه

تأمین غذای کافی با کیفیت و قیمت مناسب برای افراد یک جامعه، از مهم‌ترین ارکان اصلی توسعه پایدار هر کشور می‌باشد. در عصر حاضر با توجه به محدودیت منابع و افزایش روزافزون جمعیت و در نتیجه افزایش تقاضا برای محصولات غذایی، شرایط ایجاب می‌کند که از منابع محدود به نحو بهینه استفاده شود. غلات منبع اصلی غذایی برای تغذیه بشر در جهان می‌باشد و در میان غلات نیز گندم مهم‌ترین منبع غذایی برای مصرف انسانی است (Curtis et al., 2002). در ایران گندم و نان حاصل از آن به لحاظ راهبردی، مهم‌ترین محصول زراعی در سبد غذایی مردم کشور محسوب می‌شود، به‌طوری که قسمت عمده کالری و پروتئین مورد نیاز مردم از این طریق به دست می‌آید. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مؤثر در تولید و عملکرد بالا برای تولید محصول گندم، مصرف کودهای فسفر است. بدون افزودن کود فسفر عملکرد ارقام موجود شدیداً کاهش می‌یابد. برآورد شده که در دو سوم خاک‌های کشت شده در جهان، قابلیت دسترسی فسفر توسط ریشه گیاهان با مشکل مواجه است (Syers et al., 2008). برای بهبود تغذیه فسفر گیاه روش مرسوم، کاربرد مقدار زیاد کودهای شیمیایی فسفر در خاک است. راندمان کاربرد کود فسفر ۱۰ تا ۳۰ درصد است و باقیمانده فسفر در خاک تثبیت و به شکل نامحلول تبدیل می‌شود. افزون بر این، کودهای فسفر دارای عناصر سمی همچون کادمیوم، فلورید، آرسنیک، جیوه و ... است (Singh et al., 2015). مطالعات نشان داده است که ۴۵ درصد مجموع عناصر ورودی به زمین‌های کشاورزی اتحادیه اروپا را کود فسفات تشکیل می‌دهد و

۵۵ درصد کل کادمیوم موجود در مواد غذایی مربوط به این عنصر در خاک است (Ramteke et al., 2018). این موضوع باعث کاهش کیفیت محصول و کارایی کوددهی و در نتیجه کاهش سودآوری محصول شده که منجر به هدررفت اقتصادی و مشکلات زیست محیطی می‌گردد. با استفاده از قابلیت انحلال زیستی فسفات‌های آلی و معدنی نامحلول می‌توان مصرف کودهای شیمیایی فسفردار را کاهش داد که در کاهش خطرات زیست محیطی نیز مؤثر است. جمعیت‌های قابل توجهی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول در خاک و در فراریشه گیاه وجود دارد که گونه‌های هوازی نسبت به بی‌هوازی غالب است، همچنین جمعیت آن‌ها در فراریشه در مقایسه با خاک غیر فراریشه‌ای به مراتب بیشتر بوده است (Sharma et al., 2013). همکاری میکروارگانیسم‌های موجود در فراریشه گیاهان می‌تواند موجب بهبود جذب فسفات‌های در دسترس و همچنین فراهم ساختن منابع فسفات تثبیت شده برای گیاه شود. از آنجا که عناصر غذایی ضروری گیاه، توسط ریشه از خاک جذب می‌شوند، رشد خوب ریشه یک پیش‌نیاز برای افزایش رشد و نمو گیاه به حساب می‌آید. تعداد زیادی از باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق تولید هورمون‌های گیاهی باعث افزایش رشد ریشه گیاه می‌شوند (Gopalakrishnan et al., 2015). Chen و همکاران (۲۰۱۹) باکتری *Bacillus velezensis* را از نظر ویژگی‌های محرک رشدی نظیر توان انحلال فسفات‌های نامحلول، تولید سیدروفور و افزایش رشد ریشه بادام‌زمینی مورد بررسی قرار دادند. تحت شرایط گلخانه‌ای مایه‌کوبی با باکتری محرک رشد موجب افزایش معنی‌دار در ارتفاع گیاهچه بادام‌زمینی (۴/۶)

سانتی‌متر)، وزن خشک گیاهچه (۰/۳۶ گرم)، طول ریشه (۳/۱ سانتی‌متر) و وزن خشک ریشه (۰/۰۸ گرم) نسبت به گیاهان شاهد شد. Ribeiro و همکاران (۲۰۱۸) توان چهار سویه باسیلوس را در انحلال فسفات آهن نامحلول، تولید سیدروفور و IAA^۱ در شرایط آزمایشگاهی تعیین کردند و در ادامه تأثیر این جدایه‌ها را در شرایط گلخانه‌ای در ارتقاء شاخص‌های رشد گیاه ارزن در یک خاک با فسفر پایین مورد ارزیابی قرار دادند. تمام سویه‌های باسیلوس منبع فسفر نامحلول را حل نموده و برخی از آن‌ها سیدروفورهای نوع کربوکسیلات را تولید کرده و سطح بالاتری از IAA را در حضور تریپتوفان تولید کردند. این سویه‌ها موجب افزایش زیست توده ساقه در حدود ۵۵ درصد و محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم به ترتیب ۳۰، ۵۰ و ۷۰ درصد، در مقایسه با تیمار شاهد شدند. در ایران نیز، Alikhani و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که مایه‌کوبی گندم با باکتری‌های حل‌کننده فسفات ضمن افزایش مقدار فسفر محلول در محیط رشد توانست به‌طور معنی‌داری شاخص‌های رشد گیاه (۳۰ تا ۵۳ درصد) و مقدار جذب فسفر گیاه (۱۴ تا ۳۲ درصد) را نسبت به تیمار بدون باکتری افزایش دهند. علاوه بر باکتری‌های فراریشه‌ای محرک رشد گیاه، باکتری‌هایی از این نوع وجود دارند که قادرند به‌صورت اختصاصی به بخش درونی گیاه از جمله بذر، ریشه، میوه و ساقه نفوذ کنند و در این مکان‌ها مستقر شوند. این باکتری‌ها معمولاً دارای آنزیم‌های حل‌کننده دیواره سلولی برای نفوذ در این اندام‌ها هستند. اگرچه صفات محرک رشدی بین باکتری‌های فراریشه و درون‌رست ممکن است مشابه باشد، بیشتر تحقیقات در مورد

باکتری‌های فراریشه انجام شده است (Emami et al., 2018). با نگاه به توانایی باکتری‌های درون‌رست در بهبود و افزایش رشد گیاه و نیز نبود آگاهی‌های کافی از این باکتری‌ها در گیاه گندم، انجام پژوهش‌هایی در این رابطه ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از این تحقیق، بررسی پتانسیل جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست جداسازی شده از ریشه گیاه گندم به منظور بررسی ویژگی‌های محرک رشد و اثر آن‌ها بر شاخص‌های رشد گیاه گندم و کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفر بود.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. جداسازی باکتری‌های فراریشه‌ای و

درون‌رست ریشه گیاه گندم

در این تحقیق به منظور جداسازی باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد گیاه گندم، نمونه‌برداری از خاک فراریشه گندم مزرعه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران واقع در محمدشهر کرج انجام شد. جهت جداسازی باکتری‌های درون‌رست ریشه، در ابتدا ریشه‌ها شسته شده و ضد عفونی سطحی شدند. قطعات ریشه با استفاده از یک هاون استریل در محلول استریل یک چهارم رینگر به مدت ۱۰ دقیقه خرد و له شدند. سپس همه محتویات مواد خرد شده را به ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر استریل منتقل و به مدت ۴۵ دقیقه بر روی شیکر قرار داده شدند. پس از تهیه رقت‌های ده‌دهی از نمونه، ۰/۱ میلی‌لیتر از هر یک از رقت‌های ۱۰^{-۲} تا ۱۰^{-۷} بر روی

1- Indole-3-acetic acid

پلیت‌های حاوی محیط کشت پخش گردید. همچنین جهت جداسازی باکتری‌های فراریشه‌ای، ۱۰ گرم از خاک ریزوسفری به ارلن‌های حاوی ۹۰ میلی‌لیتر بافر فسفات استریل منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. تهیه سری‌های رقت برای خاک فراریشه هم مشابه به سری‌های رقت ریشه‌ها انجام گرفت. پلیت‌های تلقیح شده به صورت واژگون به مدت ۳ الی ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد درون گرم‌خانه گرماگذاری شدند. کلنی‌های ظاهر شده بر روی ظروف پتری جدا سازی شده و مراحل خالص‌سازی این جدایه‌ها پس از کشت مجدد روی همان محیط از طریق بازکشت انجام گرفت.

۲-۲. غربال‌گری جدایه‌ها از نظر فعالیت محرک

رشد گیاه

اندازه‌گیری کمی تولید ایندول استیک اسید (اکسین) به روش بریک در محیط کشت مایع رنگی در نتیجه استفاده از محلول سالکوفسکی و با قرائت دستگاه اسپکتروفتومتر انجام گرفت (Bric et al., 1991). مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه‌ی جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. در مرحله بعد به منظور بررسی توان جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رستی در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، از محیط کشت اسپربر استفاده گردید (Sperber, 1958). ابتدا باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط نوترینت برات کشت داده شدند. برای تشخیص نیمه کمی توان حل فسفات، ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با روش قطره‌گذاری بر روی ظروف پتری حاوی محیط جامد

اسپربر (شامل ۱۰ گرم در لیتر گلوکز، ۰/۵ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۰/۳۲ گرم در لیتر سولفات منیزیم، ۰/۱۴ گرم در لیتر کلسیم کلرید، ۲/۵ گرم در لیتر تری کلسیم فسفات، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و $pH=7/2$) کشت داده شد. توان انحلال فسفات‌های نامحلول آلی نیز با استفاده از محیط کشت اصلاح‌شده اسپربر تعیین شد که در آن به جای ترکیب شیمیایی تری‌کلسیم فسفات از یک منبع آلی به نام اینوزیتول هگزا فسفات استفاده شد (Alikhani et al., 2007). قطر کلونی رشد یافته و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات که در اطراف هر کلنی تشکیل شده بود به دقت اندازه‌گیری شدند. برای انجام آزمون کمی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول از محیط کشت اسپربر مایع استفاده شد و مقدار جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه‌ها بصورت نیمه کمی با کشت در محیط CAS-Agar با استفاده از روش پیشنهادی Neiland و Schwyn (۱۹۸۷) و براساس استفاده از محیط کشت پایه‌ای کروم آزرول-اس (CAS) صورت گرفت.

۲-۳. شناسایی مولکولی جدایه‌ها

DNA باکتری با استفاده از کیت شرکت کیاژن استخراج و PCR^2 به منظور تکثیر توالی 16S rRNA انجام شد. برای دستیابی به ناحیه بارکد از ژن 16S rRNA باکتری‌های مورد مطالعه از پرایمرهای 27F و 1520R استفاده شد. محصول PCR به دست آمده برای بررسی الگوی بانندی و ارزیابی نتایج، در ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. برای تعیین توالی قطعات تکثیر شده،

محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد بارگزاری شد و پس از استخراج باند مد نظر از ژل به روش سامبورک و همکاران برای تعیین توالی دوطرفه با استفاده از BigDye terminator دستگاه Sequencer مورد استفاده قرار گرفت (Sambrook et al., 2001). توالی‌های به دست آمده پس از مشاهده با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.1 اصلاح و مورد تأیید قرار گرفت. این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW هم‌ردیف‌سازی و به وسیله نرم‌افزار Bioedit 7.0.9 به فرمت‌های قابل استفاده تبدیل شد.

۲-۴. آزمایش گلخانه‌ای

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های آزمایشگاهی، جدایه‌های باکتریایی فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 با توان بالای تولید IAA و انحلال فسفات‌های نامحلول به عنوان تیمارهای باکتریایی مورد استفاده قرار گرفتند. این آزمون با استفاده از آزمایش فاکتوریل به صورت کاملاً تصادفی در سه تکرار بر روی خاک غیر استریل و مقدار کم فسفر قابل جذب انجام گرفت. فاکتورهای آزمایش شامل، فاکتور اول: جدایه‌های باکتری در چهار سطح شامل زادمایه باکتری فراریشه‌ای محرک رشد R185، زادمایه باکتری درون‌رست محرک رشد E240، زادمایه مخلوط باکتری فراریشه‌ای و باکتری درون‌رست (R185+E240)، به همراه شاهد منفی (بدون مایه‌کوبی) و نیز شاهد مثبت (کوددهی بر اساس آزمون خاک از منبع سوپرفسفات تریپل)؛ و فاکتور دوم: ارقام گندم در دو سطح شامل ارقام روشن و مرودشت بود که هر دو دارای تیپ رشدی بهاره و مناسب مناطق معتدل بودند. نمونه خاک مورد استفاده از عمق ۳۰-۰

سانتی‌متری، منطقه اشتهاارد (ارتفاع از سطح دریا ۱۱۸۱ متر، طول جغرافیایی (۱۹°E ۵۰°) و عرض جغرافیایی (۴۴°N ۳۵°) واقع در استان البرز برداشته شد. ویژگی‌های از خاک از جمله: بافت خاک به روش هیدرومتر، قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع خاک، pH گل اشباع، کربن آلی به روش والکلی و بلک و فسفر قابل‌دسترس به روش السن اندازه‌گیری شد (Sparks, 1996). برای کشت گلدانی گندم، در هر گلدان تعداد ۱۰ حفره به عمق ۲ سانتی‌متر ایجاد شد و در هر حفره یک بذر سالم قرار گرفت و مقدار یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت تازه هر جدایه به هر بذر جوانه‌دار شده مایه‌زنی شد و برای تیمارهای شاهد از زادمایه اتوکلاو شده استفاده شد. سپس بذور مایه‌زنی شده با خاک گلدان پوشانده شدند. پس از سبز شدن تمام بذور گندم و خروج آن‌ها از سطح خاک تعداد گیاهک‌ها از طریق تنک کردن به ۵ عدد کاهش داده شد. نور مورد نیاز برای رشد گیاهان در حد ۲۰۰۰۰ لوکس تأمین شد. مدت زمان روشنایی نیز با توجه به دوره رشد، بین ۱۴-۱۲ ساعت تنظیم شد. دمای گلخانه هم 27 ± 2 درجه سانتی‌گراد در طول شبانه روز بود (Ova et al., 2015). در طول دوره رشد گیاه، آبیاری گلدان‌ها به صورت وزنی و بر اساس ۷۵ درصد ظرفیت زراعی با آب مقطر انجام گرفت. پس از گذشت ۱۲۰ روز از زمان کشت، عملیات برداشت انجام و وزن خشک بخش هوایی و ریشه گیاه اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فسفر از روش زرد (مولیبودوانادات) استفاده شد (Westerman, 1991) آزمون‌های انجام شده در این بخش به صورت طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل در سه تکرار انجام شدند. تجزیه واریانس و محاسبات آماری با استفاده از برنامه

SAS و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به روش Tukey در سطح ۵ درصد انجام پذیرفت.

۳. نتایج

۳-۱. جداسازی باکتری

جدایه‌های فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 به‌ترتیب با تولید ۲۹۹/۲ و ۳۳۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر و همچنین تولید ۱۹/۲ و ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر هورمون IAA به عنوان جدایه‌هایی با توان انحلال فسفات‌های نامحلول و مولد IAA بودند. همچنین رشد جدایه‌ها موجب کاهش معنی‌دار pH در محیط مایع اسپربر شد. pH نهایی محیط در انتهای آزمایش از ۷/۲

به ۴/۲، برای جدایه E240، کاهش یافت. به‌طوری که در جدول ۱ دیده می‌شود رابطه معکوسی بین مقدار فسفر آزاد شده و pH محیط کشت وجود دارد. این مسئله نشان می‌دهد که کاهش pH می‌تواند مکانیسم این جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های نامحلول معدنی باشد. شناسایی مولکولی نشان داد که جدایه‌های فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 به‌ترتیب با ۹۸ و ۹۸/۷ درصد تشابه با *Pseudomonas sp. JHEE_s* و *Pseudomonas mosselii* مرتبط است. توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده برای جدایه‌های R185 و E240 در این مطالعه به پایگاه اطلاعاتی بانک ژن فرستاده شد و به‌ترتیب با شماره‌های دسترسی MF579599 و MF579598 ثبت شد.

جدول ۱- ویژگی‌های جدایه فراریشه‌ای و درون‌رست انتخاب شده برای کشت مزرعه‌ای

کد جدایه	IAA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	حلالیت فسفات نامحلول معدنی (قطر هاله به قطر کلونی)	حلالیت فسفات نامحلول آلی (قطر هاله به قطر کلونی)	تولید سیدروفور (قطر هاله به کلونی)	مقدار انحلال فسفات نامحلول معدنی ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	pH در محیط کشت حاوی تری کلسیم فسفات
R 185	19.2 ± 0.1^b	4.0 ± 0.2^b	3.8 ± 0.1^a	1.8 ± 0.1^a	299 ± 2^b	4.5 ± 0.1^a
E 240	22.0 ± 0.3^a	5.0 ± 0.2^a	3.7 ± 0.1^a	1.8 ± 0.1^a	330 ± 3^a	4.2 ± 0.1^b

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) می‌باشند.

۳-۲. ویژگی‌های خاک مورد استفاده برای

آزمایش گلخانه‌ای

نتایج بررسی‌های انجام شده بر روی نمونه خاک تهیه شده در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج ارائه شده بافت خاک لوم رسی شنی و مقدار کربن آلی خاک

زیر یک درصد بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، خاک مورد مطالعه دارای مقادیر قابل توجهی از فسفر کل می‌باشد ولی به دلیل pH بالا، آهک زیاد و نیز پایین بودن مقدار ماده آلی در این خاک، فسفر قابل‌جذب آن زیر سطح بحرانی بود، لذا به احتمال زیاد رشد اکثر گیاهان در این خاک با کمبود فسفر مواجه بود.

جدول ۲- نتایج برخی ویژگی‌های شیمیایی، فیزیکی و زیستی خاک مورد استفاده در آزمون گلخانه‌ای

ویژگی (واحد)	مقدار
EC (dSm^{-1})	۳
pH	۸/۴
فسفر قابل جذب (mg kg^{-1})	۴/۴۲
فسفر کل (mg kg^{-1})	۱۰۳۰/۷۶
ظرفیت تبادل کاتیونی ($\text{cmol}^+ \text{kg}^{-1} \text{ dry soil}$)	۱۴/۵۸
رطوبت ظرفیت مزرعه (%)	۲۵/۸۵
کربن آلی (%)	۰/۷۵
کلاس بافت خاک	لومی رسی شنی

۳-۳. تاثیر مایه کوبی با باکتری‌های محرک رشد بر

وزن خشک گیاه گندم در کشت گلدانی

تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌دار بودن اثر باکتری و رقم بر مقدار وزن خشک اندام هوایی و همچنین وزن خشک ریشه گیاه در سطح یک درصد بود (جدول ۳). با توجه به شکل ۱ مشاهده می‌شود که کاربرد کود شیمیایی سوپرفسفات تریپل (شاهد مثبت) موجب افزایش وزن خشک گیاه شد، تیمار عدم مصرف کود شیمیایی دارای کمترین وزن خشک بود. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است مقدار فسفر قابل جذب خاک پایین می‌باشد، لذا به نظر می‌رسد که با مصرف کود شیمیایی فسفره (سوپرفسفات تریپل) افزایش رشد ریشه منطقی بوده باشد. مایه کوبی گندم با باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی شد، اما تفاوت

معنی‌داری میان تیمار باکتری فراریشه‌ای و باکتری درون‌رست محرک رشد بر وزن خشک اندام هوایی گیاه مشاهده نشد (شکل ۱).

همچنین مایه کوبی گیاهان گندم به صورت تلفیقی با باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد (R185+E240) تأثیر معنی‌داری بر افزایش مقدار وزن خشک ریشه گیاه داشت. مایه کوبی تلفیقی با جدایه‌های فراریشه‌ای و درون‌رست موجب افزایش ۵۸ درصدی وزن خشک شد. به ترتیب بیشترین (۰/۹۸ گرم) و کمترین (۰/۵۳ گرم) وزن خشک ریشه گیاه در تیمارهای مربوط به تیمار مایه کوبی تلفیقی با باکتری‌های فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 در تیمار شاهد منفی مشاهده شد.

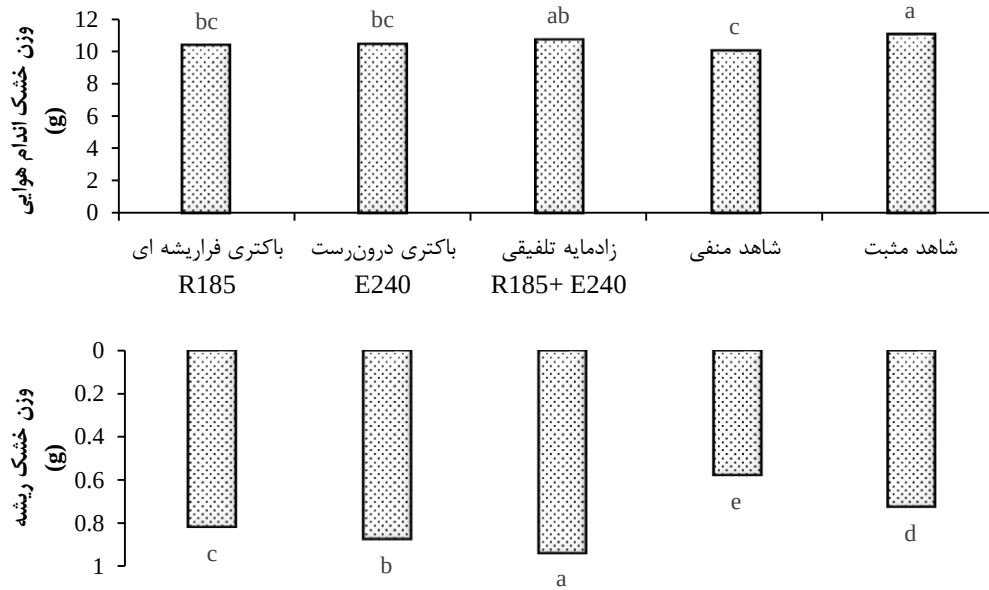
جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر مایه کوبی دو رقم گندم با باکتری‌های محرک رشد بر صفات مورد بررسی در کشت گلدانی

میانگین مربعات						
منبع تغییرات	درجه آزادی	درصد فسفر گیاه	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک اندام ریشه	وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی	عملکرد دانه
باکتری	۴	۰/۰۱۴۴۸**	۰/۸۵۰۹**	۰/۱۱۹۳**	۰/۰۰۰۹**	۱/۳۴۷**
رقم	۱	۰/۰۰۱۲۰*	۶/۰۰۳**	۰/۰۸۱۱۲**	۰/۰۰۰۰۱ ^{ns}	۳/۵۶۸**
باکتری × رقم	۴	۰/۰۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۱۲۲۶ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۳ ^{ns}	۰/۰۰۰۰۱ ^{ns}	۰/۰۵۳**
خطای آزمایش	۲۰	۰/۰۰۰۱۵	۰/۰۷۵۱۶	۰/۰۰۰۱۶	۰/۰۰۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱۵
ضریب تغییرات (%)	-	۴/۷	۲/۶	۵/۲	۶/۶	۲/۰

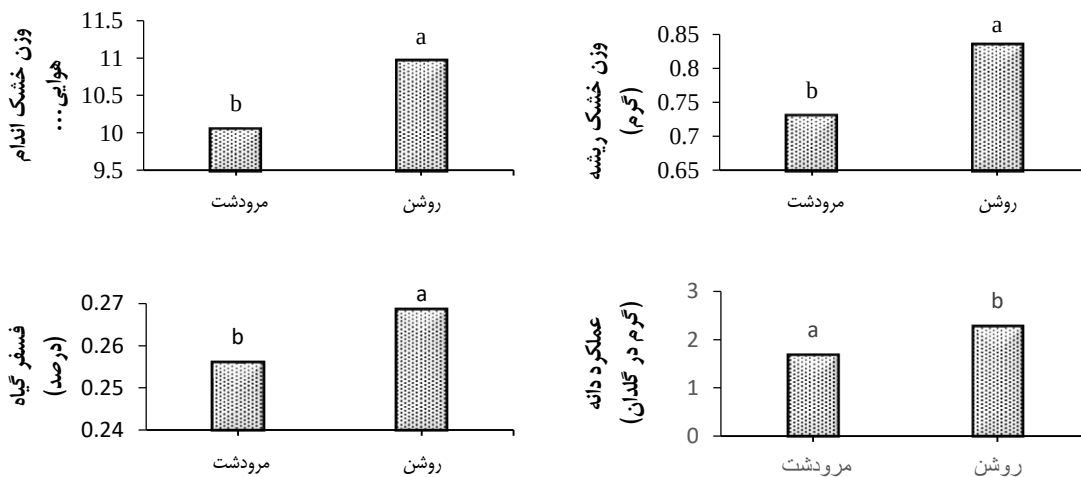
ns، * و ** به ترتیب نمایانگر عدم معنی‌داری و تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد می‌باشد.

بودن اثر تیمار باکتری را بر وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی در سطح یک درصد نشان داد. تغییرات وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی در دو رقم و همچنین بر هم‌کنش باکتری و رقم از نظر آماری تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد سوپرفسفات تریپل اگر چه موجب افزایش وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی گندم شد اما از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (شکل ۳). تیمار مایه‌زنی باکتری R185 و باکتری E240 و تیمار مایه‌زنی ترکیب این دو باکتری باعث افزایش وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی شد. به‌طوری‌که این شاخص در تیمار مایه‌زنی ترکیب این دو باکتری با افزایش ۵۱ درصدی نسبت به شاهد منفی بیشترین مقدار بود.

مقایسه میانگین اثر ارقام مختلف بر وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه تفاوت معنی‌داری را در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۳). وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه در رقم روشن نسبت به رقم مرودشت به‌ترتیب ۸/۹ و ۱۴/۲ درصد بیشتر بود (شکل ۲). ریشه اصلی‌ترین اندام گیاهان برای جذب آب و عناصر غذایی از خاک می‌باشد که اندازه و آرایش آن بر جذب مواد تأثیرگذار خواهد بود. رشد و توسعه ریشه به دلیل افزایش سطح تماس با خاک می‌تواند با افزایش جذب آب و عناصر غذایی باعث افزایش رشد گیاهان شود. تفاوت در وزن خشک گیاه ارقام مختلف را می‌توان به تفاوت ژنتیکی بین آن‌ها نسبت داد. تغییر در مورفولوژی و زیست توده گیاهی ریشه به عنوان یکی از روش‌های گیاهان برای دسترسی بیش‌تر به عناصر خاک در شرایط کمبود مواد غذایی است. تجزیه واریانس داده‌ها، معنی‌دار



شکل ۱- تأثیر مایه کوبی با باکتری‌های محرک رشد بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه گندم، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.05$) می‌باشند.



شکل ۲- تأثیر رقم گندم بر شاخص‌های رشدی، درصد فسفر گیاه و ویژگی‌های زیستی خاک فراریشه، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.05$) می‌باشند.

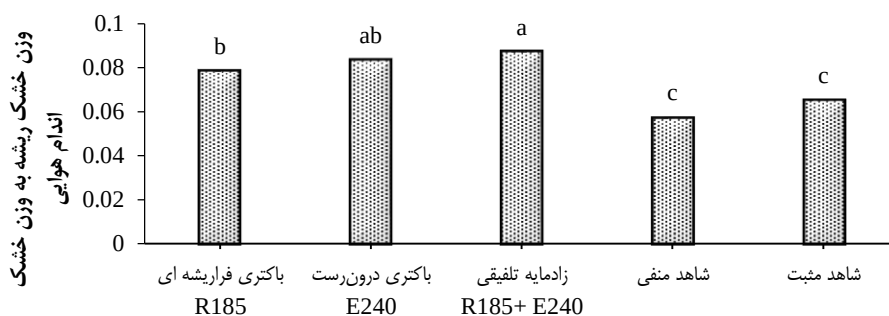
احتمال یک درصد معنی‌دار شده است. افزودن سوپرفسفات تریپل به عنوان شاهد مثبت نسبت به شاهد منفی باعث افزایش این صفت شد (شکل ۴). به‌طور کلی می‌توان گفت که استفاده از کود شیمیایی فسفره مانند سوپرفسفات تریپل باعث افزایش تولید دانه می‌شود ولی

۳-۴. عملکرد دانه

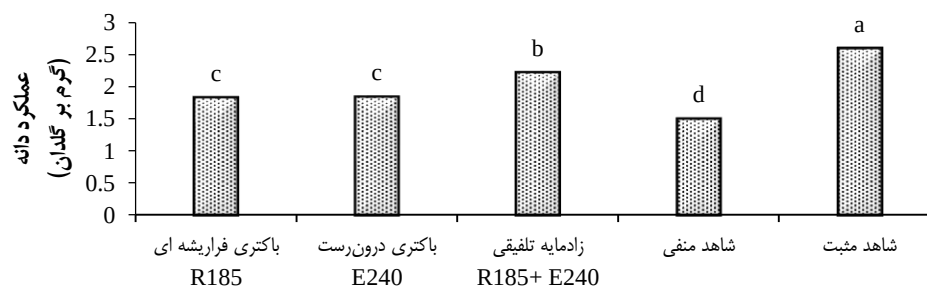
بر اساس نتایج تجزیه واریانس جدول ۳ عملکرد دانه گندم به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر باکتری‌های محرک رشد، رقم گیاه و برهم‌کنش این دو قرار گرفته و در سطح

صفت را افزایش دهند (شکل ۴). عملکرد دانه در نتیجه مایه کوبی با باکتری‌های E240، R185 و E240+R185 به ترتیب نسبت به شاهد منفی ۲۲، ۲۲/۶ و ۴۵ درصد افزایش داشت.

مقدار استفاده از آن برای ایجاد اختلاف معنی‌دار نسبت به شاهد در شرایط مختلف متفاوت است؛ که باید برای ارقام، خاک‌ها و شرایط آب و هوایی متنوع جداگانه آزمایش و تعیین شود. نتایج نشان داد که تیمارهای باکتریایی E240، R185 و E240+R185 می‌توانند این



شکل ۳- تأثیر مایه کوبی با باکتری‌های محرک رشد بر وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی گیاه
حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.05$) می‌باشند.



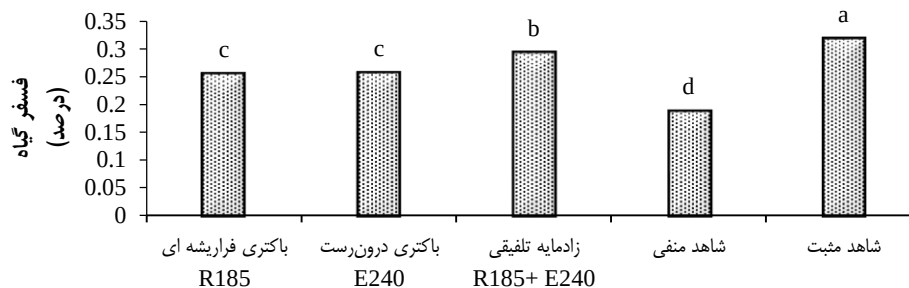
شکل ۴- تأثیر مایه کوبی با باکتری‌های محرک رشد بر عملکرد دانه، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P<0.05$) می‌باشند.

باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست محرک رشد نشان می‌دهد و میان تیمارهای شاهد و گیاهان گندم مایه کوبی شده با باکتری‌های محرک رشد اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود. مایه کوبی تلفیقی با باکتری‌های فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 موجب افزایش ۵۵/۶ درصدی در مقدار فسفر گیاه می‌شود در حالی که این ارقام در مورد مایه کوبی جداگانه با باکتری‌های فراریشه‌ای و درون‌رست ۳۵/۶ و ۳۶/۴ درصد بود.

۳-۵. تأثیر مایه کوبی با باکتری‌های محرک رشد بر

فسفر گیاه گندم در کشت گلدانی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثرات باکتری‌های محرک رشد و رقم‌های مورد استفاده بر درصد فسفر گیاه به ترتیب در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). نتایج مربوط به درصد فسفر گیاه شکل ۵، افزایش درصد فسفر گیاه را همگام با مایه کوبی گیاهان گندم با



شکل ۵- تأثیر مایه کوبی با باکتری‌های محرک رشد بر درصد فسفر گندم، حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری ($P < 0.05$) می‌باشند.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

تحقیق بر روی میکروارگانیسم‌هایی که باعث بهبود حاصلخیزی خاک و افزایش پتانسیل تغذیه گیاهی می‌شوند به علت هزینه رو به افزایش کودهای شیمیایی و بعضی از اثرات محیطی منفی آن‌ها در کانون توجه پژوهشگران قرار دارد. به این منظور مطالعه ساختار جمعیت باکتری‌های فراریشه و درون‌رست، توزیع آن‌ها، اثرات متقابل و نقش آن‌ها درون گیاه میزبان برای درک نقش اکولوژیکی آن‌ها مهم می‌باشد. برای تعیین تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های مختلف آزمایشگاهی انجام شده، دو جدایه با قابلیت حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول و توان تولید IAA انتخاب شدند و به عنوان تیمارهای باکتریایی محرک رشد گیاه مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه‌های R185 و E240 به ترتیب با تولید ۲۹۹ و ۳۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر و همچنین تولید ۱۹/۲ و ۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر هورمون IAA به عنوان جدایه‌هایی با توان انحلال فسفات‌های نامحلول و مولد IAA بودند. Batool و Iqbal (2018)، ۳۰ جدایه با قابلیت حل‌کنندگی فسفات نامحلول و سایر ویژگی‌های محرک رشدی (تولید هورمون و تثبیت نیتروژن) از

در ارتباط با ارقام گندم، رقم روشن نسبت به رقم مرودشت درصد فسفر بالاتری (۴/۷ درصد) داشت. بالاتر بودن غلظت فسفر در رقم روشن نشان‌دهنده توانایی بیشتر سیستم ریشه‌ای این رقم در جذب فسفر از خاک است (شکل ۲). فسفر در رشد ریشه و گسترده‌گی آن در اعماق مختلف خاک و در نتیجه در جذب رطوبت و عناصر غذایی مؤثر بوده و در رشد و عملکرد گیاه تأثیرگذار است. تفاوت ارقام در جذب فسفر می‌تواند به دلیل اختلاف در مورفولوژی ریشه، قدرت جذب عناصر توسط ریشه، مصرف و استفاده از عناصر در متابولیسم و رشد گیاه و همچنین اثرات متقابل ریشه با خاک باشد. ارقامی با سیستم ریشه‌ای بزرگ و انشعابات گسترده قادرند حجم بیشتری از خاک را جستجو کرده و در نتیجه عناصر غذایی و رطوبت بیشتری را جذب نمایند. از عوامل مهم ریشه که در جذب فسفر مؤثرند می‌توان به شکل، توزیع (گسترش عمودی و افقی)، قطر و سطوح جذب ریشه، ریشه‌های موئی و دوام ریشه یا پتانسیل پیرشدگی ریشه اشاره نمود که ارقام مختلف از لحاظ این ویژگی‌ها اختلافات فاحشی نشان می‌دهند. علاوه بر مورفولوژی ریشه، برخی از ژنوتیپ‌ها به دلیل ترشح مواد اسیدی از ریشه‌های خود و پایین آوردن pH می‌توانند مقدار فسفر بیشتری از خاک جذب نمایند.

مناطق مختلف جداسازی کردند. شاخص حلالیت فسفر از ۴ تا ۷ در محیط جامد (کیفی) و مقدار حلالیت فسفر در محیط مایع (کمی) از ۳۰ تا ۲۴۶ میکروگرم در میلی لیتر متغیر بود. شرایط بهینه برای حلالیت فسفات نامحلول دمای ۳۵ درجه سانتی گراد، pH ۷، استفاده از گلوکز و آمونیوم نیترات به ترتیب به عنوان منبع کربن و نیتروژن تعیین شد. نتایج بررسی ها در گلخانه نشان داد که کاربرد جدایه های فراریشه ای R185 و درون رست E240 موجب افزایش معنی دار در مقدار وزن خشک ریشه و اندام هوایی شد. پژوهش ها نشان می دهد که مایه کوبی گیاهان با باکتری های محرک رشد باعث افزایش عملکرد اندام هوایی گیاهان می شود؛ البته افزایش عملکرد زیست توده بسته به پتانسیل میکروبی از یک باکتری به باکتری دیگر و در شرایط مختلف، متفاوت می باشد. نتایج پژوهش های Kasim و همکاران (۲۰۱۳) نیز بیانگر این حقیقت است که مایه کوبی گیاه گندم با باکتری های محرک رشد در شرایط تنشی و غیر تنشی، وزن خشک اندام هوایی گیاهان را افزایش می دهد. نتایجی که از مایه کوبی باکتری های محرک رشد با گیاه گندم بر وزن ریشه گزارش شده است ضد و نقیض است. گزارش شده است که مایه کوبی گندم با *Azotobacter* بر وزن خشک ریشه معنی دار نبود، اگر چه تیمار باکتری نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش وزن خشک ریشه شدند (Rajaei et al., 2007). نتایج نشان دادند به جای استفاده از کود شیمیایی مانند سوپرفسفات تریپل می توان با استفاده بهینه از کودهای زیستی، عملکرد را افزایش داد. از آن جا که فسفر جزو عوامل مهم در دانه بندی و شکل گیری ردیف دانه ها در گندم می باشد، به نظر می رسد باکتری های محرک رشد با توسعه ریشه

در فراریشه و انحلال فسفات نامحلول، امکان دریافت فسفر را برای گیاه به مقدار بیشتری فراهم کرده و نقش مؤثری در افزایش عملکرد گندم داشته است (Rana et al., 2015). در همین راستا Delfim و همکاران (۲۰۱۸) نیز بیان کردند که مایه کوبی گندم با *Bacillus thuringiensis* در خاک های مختلف اثرات متفاوتی (مثبت یا منفی) بر رشد گیاه و خاک داشت.

نتایجی که از تأثیرگذاری حل کننده های فسفات بر محتوای فسفر بخش هوایی در گیاه گندم به دست آمد، حاکی از آن است که افزایش مقدار جذب فسفر توسط ریشه گیاهان تیمار شده با کودهای زیستی فسفات به علت افزایش قابلیت دسترسی به فسفر و متعاقب آن بهبود ظرفیت ریشه برای جذب فسفر و انتقال آن به بخش هوایی گیاه می باشد. نتایج برخی از مطالعات گذشته بی اثری باکتری های محرک رشد گیاه با استفاده از مایه کوبی های جداگانه جدایه (بدون ترکیب با جدایه دیگر) را پیشنهاد کرده است؛ اما ترکیب هایی از جدایه ها کارآمد بوده اند. البته گزارش های متعددی نیز وجود دارد که مؤید افزایش جذب فسفر گیاهان در حضور باکتری های حل کننده فسفات است، که معمولاً این عمل را با افزایش قابلیت دسترسی فسفر خاک و تحریک رشد گیاهان انجام می دهند. Korir و همکاران (۲۰۱۷) اعلام نمودند که شواهدی دال بر افزایش فراهمی عناصر غذایی گیاه در فراریشه به دلیل فعالیت باکتری های فراریشه ای محرک رشد و حل کننده فسفات وجود دارد، فرآیند عمل در این مورد شامل افزایش انحلال عناصر غذایی و یا تولید مواد کلات کننده می باشد. تولید اسیدهای آلی باعث افزایش اسیدی شدن محیط اطراف ریشه می شود، در نتیجه در اثر جایگزینی پروتون به جای کلسیم، فسفر

باکتری فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 بیشترین تأثیر را بر افزایش شاخص‌های رشد و فسفر گیاه گندم داشتند. در تیمار مایه‌کوبی تلفیقی R185+E240 وزن خشک بخش هوایی، وزن خشک ریشه، عملکرد دانه و مقدار فسفر در گیاه از ۱۰ گرم، ۰/۵۷ گرم، ۱/۵ گرم در گلدان و ۰/۱۸ درصد در تیمار شاهد منفی به ترتیب به ۱۰/۷ گرم، ۰/۹۳ گرم، ۲/۲ گرم در گلدان و ۰/۲۹ درصد افزایش پیدا کرد. همچنین رقم روشن نسبت به رقم مرودشت ۸/۹، ۱۴/۲ و ۴/۷ درصد به ترتیب وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و درصد فسفر بیشتری داشت. بنابراین، با توجه به نتایج به دست آمده، باکتری‌های محرک رشد فراریشه‌ای R185 و درون‌رست E240 کاندیداهای مناسبی برای توسعه رشد ریشه، جذب بیشتر فسفر و در نتیجه افزایش عملکرد گندم هستند و می‌توانند به عنوان زادمایه‌هایی برای بهبود سلامت و عملکرد گندم و کاهش سطح مصرف کودهای شیمیایی استفاده شوند.

آزاد می‌شود، که اسید گلوکونیک یکی از این اسیدها می‌باشد (Babu et al., 2017). مکانیسم‌های دیگری نیز برای انحلال فسفر پیشنهاد شده‌اند که شامل تولید مواد کلات‌کننده، تولید اسیدهای معدنی مانند اسید سولفوریک، اسید نیتریک و اسید کربنیک به وسیله میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشد. تولید آنزیم‌های فسفاتاز نیز روش دیگری برای رهاسازی فسفات از منابع آلی فسفات می‌باشد. به نظر باکتری‌های استفاده شده در این آزمایش به‌ویژه زادمایه تلفیقی دو جدایه R185 و E240 که دارای شاخص انحلال فسفات و تولید IAA بالایی هستند در انحلال منابع فسفات موجود در خاک دخالت داشته و همین موضوع باعث بالا رفتن غلظت و مقدار این عنصر در بافت خشک گیاهی در انتهای دوره رشد گیاه شده است. در مجموع نتایج به دست آمده حاکی از آن است که استفاده از تیمارهای باکتریایی سبب افزایش قابل توجه شاخص‌های رشد و مقدار فسفر گیاه می‌شود. در بین این تیمارها، مایه‌کوبی تلفیقی با

References

- Alikhani, H., Etesami, H. & Mohammadi, L. (2018). Evaluation of the Effect of Rhizospheric and Non-Rhizospheric phosphate Solubilizing Bacteria on Improving the Growth Indices of Wheat under Salinity and Drought Stress. *Journal of Sol Biology*, 6(1), 1-14.
- Alikhani, H., Saleh-Rastin, N., & Antoun, H. (2007). Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 35-41.
- Babu, S. V., Triveni, S., Reddy, R. S., & Sathyanarayana, J. (2017). Screening of Maize Rhizospheric Phosphate Solubilizing Isolates for Plant Growth Promoting Characteristics. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(10), 2090-2101.

- Batool, S., & Iqbal, A. (2018). Phosphate Solubilizing Rhizobacteria as Alternative of Chemical Fertilizer for Growth and Yield of *Triticum aestivum* (Var. Galaxy 2013). *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1400-1410.

Bread Wheat Improvement and Production. Rome, Italy: FAO: Plant Production and Protection Series.

- Bric, J. M., Bostock, R. M., & Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 535-538.

- Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D., & Bian, K. (2019). Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus*

- velezensis LDO2. Microbiological Research, 218, 41-48.
- Curtis, B. C., Rajaram, S., & Gómez, M. (2002). Bread Wheat Improvement and Production. Rome, Italy: FAO: Plant Production and Protection Series.
- Delfim, J., Schoebitz, M., Paulino, L., Hirzel, J., & Zagal, E. (2018). Phosphorus availability in wheat, in volcanic soils inoculated with phosphate-solubilizing *Bacillus thuringiensis*. Sustainability, 10(1), 144.
- Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaie, A. A., Etesami, H., Motashare Zadeh, B., & Sarmadian, F. (2018). Improved growth and nutrient acquisition of wheat genotypes in phosphorus deficient soils by plant growth-promoting rhizospheric and endophytic bacteria. Soil Science and Plant Nutrition, 64(6), 719-727.
- Gopalakrishnan, S., Sathya, A., Vijayabharathi, R., Varshney, R. K., Gowda, C. L., & Krishnamurthy, L. (2015). Plant growth promoting rhizobia: challenges and opportunities. 3 Biotech, 5(4), 355-377.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.-S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiological Research, 206, 131-140.
- Kasim, W. A., Osman, M. E., Omar, M. N., El-Daim, I. A. A., Bejai, S., & Meijer, J. (2013). Control of drought stress in wheat using plant-growth-promoting bacteria. Journal of Plant Growth Regulation, 32(1), 122-130.
- Korir, H., Mungai, N. W., Thuita, M., Hamba, Y., & Masso, C. (2017). Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. Frontiers in Plant Science, 8, 141-150.
- Ova, E. A., Kutman, U. B., Ozturk, L., & Cakmak, I. (2015). High phosphorus supply reduced zinc concentration of wheat in native soil but not in autoclaved soil or nutrient solution. Plant and Soil, 393(1-2), 147-162.
- Rajae, S., Alikhani, H., & Raiesi, F. (2007). Effect of plant growth promoting potentials of *Azotobacter chroococcum* native strains on growth, yield and uptake of nutrients in wheat. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 11(41), 285-297.
- Ramteke, L., Sahayam, A., Ghosh, A., Rambabu, U., Reddy, M., Popat, K., & Ghosh, P. (2018). Study of fluoride content in some commercial phosphate fertilizers. Journal of Fluorine Chemistry, 210, 149-155.
- Rana, A., Kabi, S. R., Verma, S., Adak, A., Pal, M., Shivay, Y. S., & Nain, L. (2015). Prospecting plant growth promoting bacteria and cyanobacteria as options for enrichment of macro-and micronutrients in grains in rice-wheat cropping sequence. Cogent Food & Agriculture, 1(1), 1-16.
- Ribeiro, V. P., Marriel, I. E., Sousa, S. M. d., Lana, U. G. d. P., Mattos, B. B., Oliveira, C. A. d., & Gomes, E. A. (2018). Endophytic *Bacillus* strains enhance pearl millet growth and nutrient uptake under low-P. Brazilian Journal of Microbiology, 49, 40-46.
- Sambrook, J., Russell, D. W., & Russell, D. W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set). Immunol, 49, 895-909.
- Schwyn, B., & Neilands, J. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160(1), 47-56.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springer Plus, 2(1), 587.
- Singh, S., Raju, N. J., & Nazneen, S. (2015). Environmental risk of heavy metal pollution and contamination sources using multivariate analysis in the soils of Varanasi environs, India. Environmental Monitoring and Assessment, 187(6), 1-12.
- Sparks, D.L. (1996). Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods, Soil Science Society of American, Inc. American Society of Agronomy, Inc, Madison Wisconsin, USA.
- Sperber, J. I. (1958). The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research, 9(6), 778-781.

Syers, J. K., Johnston, A. E., & Curtin, D. (2008). Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use—reconciling changing concepts of soil phosphorus behaviour with agronomic information. FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin 18. FAO, United Nations, Rome.

Westerman, R. L. (1990) Soil Testing and Plant Analysis, Third Edition. Madison, Wisconsin; Soil Science Society of America.