فصلنامه علمی زیست شناسی کاربردی دانشگاه الزهراء (س)
دوره ۳۶، شماره ۱، پیاپی ۷۵، بهار ۱۴۰۲، ص۱۰۸- ۸۵
نوع مقاله: پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal Of Applied Biology
Vol.36, No.1, Sering. 75, Spring 2023, p. 85-108
Article type: Research Paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۱
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
https://doi.org/10.22051/jab.2023.40791.1493

بررسی مقایسه‌ای اثر تلقیح دو سویه باکتری محرک رشد تولیدکننده سایدروفور (*Bacillus cereus* و *Enterobacter cloacae*) بر دسترسی آهن در نهال‌های پسته (*Pistacia Vera* L.)

فائقه بهرامی نژاد[۱]، فاطمه نصیبی[۲]، حکیمه علومی[۳]، رزا عرب[۴]*

چکیده

مقدمه: *کمبود آهن یکی از مهم ترین مشکلاتی است که رشد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در این پژوهش اثر دو سویه باکتری محرک رشد تولید کننده سایدروفور (Enterobacter cloacae و Bacillus cereus) بر ویژگی های بیوشیمیایی نهال های پسته در شرایط فراهمی و کمبود آهن بررسی گردید.* ***روش ها:*** *در این تحقیق که به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد، آهن فریک (Fe^{+3}) و آهن فروس (Fe^{+2}) با غلظت ۲۰ میکرومولار به نهال‌هایی که به مدت یک ماه رشد کرده بودند داده شد. گیاهان فاقد آهن (آهن صفر) به عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.* ***نتایج:*** *نتایج نشان داد آهن فریک در غلظت ۲۰ میکرومولار و آهن صفر باعث کاهش رشد گیاه و آسیب به آنها گردید. با به کارگیری باکتری‌های محرک رشد در گیاهان تیمار یافته با آهن فریک، برخی از پارامترهای رشد مانند وزن تر، رنگیزه های فتوسنتزی، ترکیبات فنلی، قندهای محلول، پراکسیداسیون لیپیدها و پرولین بهبود یافتند. تیمار گیاهان با باکتری‌های محرک رشد همچنین منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاهان تیمار شده با آهن فریک گردیدند. باکتریهای محرک رشد همچنین منجر به افزایش جذب آهن در اندام‌های هوایی نهال‌های تیمار شده با آهن فریک شدند. به نظر می‌رسد در گیاهان تیمار شده با آهن فریک، باکتری‌های محرک رشد با تولید سایدروفور منجر به احیا آهن و افزایش آهن در دسترس گیاه و تخفیف تنش کمبود آهن شدند.*

واژه‌های کلیدی: آهن فریک، باکتری های PGPR، پراکسیداسیون لیپید، کمبود آهن.

۱ . دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
۲ . دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان.
۳ . دانشیار دانشگاه تحصیلات تکمیلی و فناوری پیشرفته کرمان.
۴ . مربی گروه زیست شناسی، واحد بم، دانشگاه ازاد اسلامی، بم، ایران. (*ایمیل نویسنده مسئول: rozaarab.iau@gmail.com)

مقدمه

آهن جز عناصر کم مصرف گیاهان است که کمبود آن در کل جهان، یکی از مشکلات بزرگ کشاورزان است. برخی وظایف آهن در گیاهان عبارتند از: شرکت در واکنش های متابولیسمی گیاه بخصوص واکنش های اکسایش- احیا، جز اصلی برخی پروتئین ها و آنزیم‌ها، ایفای نقش در فرایندهای زیستی اساسی از قبیل فتوسنتز، سنتز کلروفیل، تنفس، تثبیت نیتروژن و مکانیسم‌های سنتز DNA از طریق عملکرد ریبونوکلئوتید ردوکتازها، کوفاکتور بسیاری از آنزیم‌های سنتز کننده هورمون‌های گیاهی مثل اتیلن و لیپواکسیژنازها (Jeong & Connolly, 2009, Ferreira *et al.*, 2019). به طور کلی، آهن سه ظرفیتی (Fe^{3+})، فرم قابل جذب برای گیاهان نیست و آهن دو ظرفیتی به فرم (Fe^{2+}) شکل اصلی آهن قابل جذب گیاهان است به همین دلیل گیاهان زیادی دچار کمبود آهن می شوند و باید برای برطرف شدن کمبود، به این گیاهان کود آهن داد (Rout & Sahoo, 2015). سایدروفورها و فیتوسایدروفورها به عنوان شلاتور مخصوص Fe^{3+} با وزن مولکولی کم (کمتر از ۱۵۰۰ Da) هستند که کمپلکس هایی را با آهن آزاد تشکیل می دهند و از طریق گیرنده های غشایی آن را وارد سلول می کنند (Johnstone and Nolan, 2015; Saha *et al.*, 2016) . اتصال قوی بین Fe^{3+} و سایدروفور کمپلکس را در برابر هیدرولیز و تخریب آنزیمی در محیط محافظت می کند (Winkelmann, 2007) .

امروزه برای برطرف کردن کمبود برخی عناصر تغذیه‌ای از کودهای زیستی به جای کودهای شیمیایی استفاده می شود. کودهای زیستی میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی می‌باشندکه در بستری از مواد نگهدارنده خاک حضور دارند. به عبارت دیگر این نوع کودها دارای گونه‌های باکتریایی مؤثر برای تأمین عناصر غذایی گیاهان هستند. میکروارگانیسم‌های موجود در این کودهای زیستی، عناصر غذایی غیر قابل جذب را به مواد غذایی قابل جذب برای گیاه تبدیل می کنند. تبدیل این عناصر به مواد غذایی مورد نیاز گیاه فرآیند بیولوژیکی است که توسط این میکروارگانیسم‌ها انجام می‌شود (Rahmani, 2010, Ramesh, 2013). از جمله کودهای زیستی می توان به کودهای زیستی حاوی باکتری‌های محرک رشد گیاهی

(Plant Growth Promotion Rhizobium) یـا (PGPR) هـا اشـاره کـرد. PGPR هـا، از انـواع باکتری های خـاک بـوده و در فعالیـت هـای زیسـتی اکوسیسـتم خـاک درگیـر هسـتند و بـه نوبـه‌ی خـود در جـذب مـواد غـذایی بـرای تولیـد محصـول و افـزایش رشـد و افـزایش حاصـلخیزی و... نقـش دارنـد. درجـه ارتقـا رشـد بـه نـوع گیـاه و نـوع بـاکتری بسـتگی دارد (Do Amaral *et al.*, 2016).

PGPRهـا دارای توانـایی‌هـایی از جملـه تجزیـه‌ی مـواد آلـی، افـزایش تحمـل گیـاه بـه تـنش، افـزایش عملکـرد گیـاه، اثـر بـر سـوخت و سـاز گیـاه ، اثـر بـر فراینـدهای سـلولی و بیوسـنتز گیـاه، کـاهش آلاینـده‌هـای آلـی، بهبـود سـاختار خـاک آلـوده بـه وسـیله‌ی جداسـازی فلـزات سـنگین و سـمی، تحریـک رشـد ریشـه و تنظـیم سـطح تنظـیم کننـده‌هـای گیـاهی مثـل: اکسـین، اتـیلن، جیبـرلین و سـیتوکینین مـی باشـند (Do Amaral *et al.*, 2016, Cassán *et al.*, 2016).

همچنـین انحـلال برخـی عناصـر مثـل Fe وP، تثبیـت نیتـروژن، سـنتز ویتـامین‌هـا، حفاظـت در برابر پـاتوژن و یـا مهـار آن‌هـا، القـای مقاومـت سیسـتمیک در گیاهـان و... از دیگـر توانـایی هـای آن هـا مـی باشـد (Ferreira *et al.*, 2019). عـلاوه بـر ایـن، طیـف گسـترده‌ای از PGPR هـا دارای صـفاتی از قبیـل تولیـد سـایدروفور، ۱-آمینـو سـیکلو پروپـان ۱-کربوکسـیلات (ACC)، هیـدروژن سـیانید(HCN) ، فعالیـت هـای نیتروژنـازی، تولیـد اگزوپلـی سـاکاریدها (ESP) و ترشـح آنتـی بیوتیک می باشند (Singh *et al.*, 2015; Do Amaral *et al.*, 2016; La Torre-Ruiz *et al.*, 2016).

گیاهـان آهـن را بـه فـرم دو ظرفیتـی یـا فـرو (Fe^{2+}) جـذب مـی کننـد در حالیکـه عمـده آهـن موجـود در خـاک بـه فـرم سـه ظرفیتـی یـا فریـک (Fe^{3+}) اسـت و بنـابراین بـرای گیاهـان قابل جذب نمی‌باشـد و عمومـا از دسـترس گیاهـان و میکروارگانیسـم هـا خـارج اسـت بـه همـین دلیل در اکثر موارد کمبود آهـن بـه دلیـل موجـود نبـودن آهـن در خـاک نیسـت بلکـه بـه دلیـل در دسـترس نبـودن آهـن و غیـر قابـل جـذب بـودن آن بـرای گیـاه اسـت. برخـی میکروارگانیسـم‌هـا دارای مکانیسـم هـای تکامـل یافتـه ای هسـتند کـه باعـث جـذب آهـن می‌شوند، این میکرو ارگانیسـمها بـا تولیـد سـایدروفورها کـه تمایـل زیـادی بـرای اتصـال بـه آهـن دارنـد، جـذب آهـن را افـزایش مـی دهنـد (Fukushima, 2013 , Williamson *et al.*, 2021).

باکتری هـای تولیـد کننـده سـایدروفور، هـم بـاکتری‌هـای گـرم مثبـت و هـم بـاکتری هـای گـرم

منفی را شامل می شوند. در باکتریها، کمپلکس سایدروفور- آهن تشکیل می شود و در غشا باکتری‌ها فرآیند کاهش رخ می دهد و Fe^{3+} به Fe^{2+} تبدیل می‌شود و در دسترس گیاه قرار می گیرد (Sah & Singh, 2015).

پسته از مهم ترین محصولات کشاورزی است و حدود 80 در صد سطح زیر کشت و تولید آن مربوط به استان کرمان است. شرایط حاکم بر باغ های پسته، مانند شوری آب آبیاری، بالابودن pH ، مقدار کربنات کلسیم و بیکربنات، و پایین بودن درصد مواد آلی و همچنین در مواردی بالا بودن فسفر می تواند باعث مشکلات تغذیه ای و کاهش فراهمی عناصر کم مصرف از جمله آهن در خاک و در نتیجه کمبود آن در این گیاه شود (Mirzapour andkhoshgoftarmanesh, 2013). تحقیقات انجام شده در مورد وضعیت تغذیه ای درختان پسته، در مناطق پسته کاری استان کرمان نشان داده است که باغ‌های پسته با عملکرد پایین به طور کلی دارای ترتیب نیاز عناصر غذایی Mn>Zn>K>Fe>N>Cu>P>Ca>B>Mg است که در این توالی Fe در اولویت چهارم از نظر کمبود در باغ های با عملکرد پایین قرار دارد (حسینی فرد و همکاران ۱۳۹۶،). نتایج حسینی فرد و همکاران (۱۳۹۸) نشان داد که محلول پاشی کودهای آهن بر روی درختان پسته دارای کمبود این عنصر، اثرات مثبتی روی کمیت و کیفیت پسته داشته و باعث کاهش میزان پوکی، زود خندانی پسته و ریزش جوانه های زایشی شده است (حسینی فرد و همکاران ۱۳۹۸). بنابراین با توجه به اهمیت عنصر آهن در مناطق پسته کاری ایران و محدودیت در شرایط جذب این عنصر از خاک‌های آهکی این مناطق، یک گزینه مهم برای بالابردن کیفیت و عملکرد گیاه پسته می تواند استفاده از باکتری های محرک رشدی باشد که قابلیت تولید سایدروفور را داشته باشد. هدف از این پروژه تحقیقاتی بررسی اثرات دو سویه *(Enterobacter cloacae و Bacillus cereus)* از باکتری های محرک رشد ریشه ای تولید کننده سایدروفور، در افزایش دسترسی به آهن در نهال‌های پسته بوده است.

مواد و روش‌های آزمایشگاهی

کشت باکتری

باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق *Enterobacter cloacae*(T) و *acillus cereus*(W) بودند. این سویه های باکتری که تولید کننده سایدروفور هستند در محیط کشت Nutrient Broth Agar در پتری در انکوباتور با دمای ۳۰-۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت رشد کردند و پس از رشد، محیط کشت های جامد در یخچال نگهداری شدند. برای انتقال باکتری ها به خاک، ابتدا باکتری ها رشد کرده از محیط کشت جامد به محیط مایع انتقال داده شدند و به مدت۲۴ ساعت در شیکر - انکوباتور قرار داده شدند تا رشد کرده و سوسپانسیون باکتری تهیه گردید.

کشت گیاه

گیاه مورد مطالعه در این پژوهش، گیاه پسته (*Pistacia vera*) رقم احمد آقایی بود. بذرهای پسته از منطقه نوق رفسنجان تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. بذرها قبل از کشت با هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی شدند، سپس سه بار با آب مقطر شستشو گردیدند. بذرهای ضدعفونی شده به مدت بیست و چهار ساعت در آب خیسانده شده و پس از آن در پارچه نخی مرطوب قرار گرفتند و روزی یکبار پارچه تعویض گردید. پس از جوانه زنی، به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند و به تعداد یک عدد در هر گلدان که حاوی ماسه بادی الک شده، اسید شویی شده و اتوکلاو شده بود، کاشته شدند. پس از جوانه زنی بذرها، هفته ای یکبار به هر گلدان ۲۰ سی سی از سوسپانسیون باکتری داده شد (این کار تا یک ماه ادامه داشت). گلدان ها به صورت یک روز در میان آبیاری شدند و هفته ای ۱ بار به آنها مقدار یکسان محلول غذایی هوگلند (با رقت ۱/۲) نیز داده شد. محلول هوگلند در این مرحله فاقد آهن بود (Afrousheh *et al.*, 2010). سپس گلدان ها در زیر گروه های تیماری برای تیمار با آهن قرار داده شدند.

روش تیمار آهن

پس از بهینه سازی آهن با غلظت های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میکرومولار در آزمایشات مقدماتی، غلظت ۲۰ میکرومولار انتخاب شد. محلول های آهن هفته ای یکبار به گیاهانی که به مدت یک ماه رشد کرده بودند، داده شد. این تیمار دهی به مدت ۴ هفته انجام گردید. در گلدان های تحت تیمار آهن Fe^{3+} ، به مقدار ۳۰ سی سی محلول آهن فریک (Fe^{3+}) ۲۰میکرومولار و در گلدان های تحت تیمار آهن Fe^{2+} به مقدار ۳۰ سی سی محلول آهن فروس(Fe^{2+}) ۲۰میکرومولار، به گلدان ها داده شد.(در این پژوهش: Fe0 به عنوان کنترل و تیمار فاقد آهن، Fe^{2+} به عنوان فرم آهن مورد استفاده گیاه و Fe^{3+} به عنوان فرم آهن غیر قابل استفاده برای گیاه در نظر گرفته شد).

تست سایدروفور

برای اطمینان از تولید سایدروفور در باکتری های مورد استفاده، تست سایدروفور انجام شد. برای انجام تست سایدروفور ابتدا نمونه های باکتری در محیط مایع M9 تلقیح شدند. پس از تلقیح، نمونه ها به مدت ۴ روز در شیکر- انکوبار با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از رشد باکتری به مدت ۴ روز محلول‌های سنجش CAS و شاتل برای تست سایدروفور آماده گردید. پس از چهار روز از رشد باکتری ها، ۱ میلی لیتر از محیط کشت برداشته و درون ویال ریخته شد. به مدت ده دقیقه با دورrpm ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ نمونه ها، به محلول رویی، محلول CAS و شاتل اضافه گردید و مجدداً ورتکس شد و جذب نمونه ها در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانده شد. محیط کشت بدون باکتری، حاوی محلول سنجش CAS و محلول شاتل به عنوان شاهد (بلانک) مورد استفاده قرار گرفت (Alexander & Zuberer,1991).

$$\left[\frac{(Ar - As)}{Ar}\right] \times 100$$

Ar: جذب شاهد (محلول شاتل + محلول سنجش CAS + محیط کشت) در ۶۳۰ نانومتر می باشد.

As: جذب نمونه (محلول رویی+ محلول سنجش CAS+ شاتل) در ۶۳۰ نانومتر می باشد.

پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی

مالون دآلدئید (MDA) یکی از محصولات پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به عنوان شاخص تنش به روش (۱۹۶۹) Packer و Heath اندازه‌گیری شد.

تعیین مقدار پروتئین کل

جهت سنجش مقدار پروتئین کل از روش (۱۹۷۶) Bradford استفاده شد.

سنجش کربوهیدرات های محلول

برای سنجش کربوهیدرات های محلول از روش (۱۹۵۱) Fales و معرف آنترون استفاده گردید و غلظت هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

اندازه گیری محتوی پرولین

برای اندازه گیری پرولین از روش (۱۹۷۳) Bates و معرف نین هیدرین استفاده شد. برای محاسبه‌ی مقدار پرولین از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید و نتایج برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید.

سنجش مقدار ترکیبات فنلی

محتوای ترکیبات فنلی با استفاده از روش (۲۰۰۰) Gao و همکاران اندازه‌گیری شد.

رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ

سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، شامل کلروفیل a، b وکلروفیل کل و کاروتنوئیدها (کاروتنوئید و گزانتوفیل)، به روش(Lichtenthaler, 1987) انجام گردید.

سنجش مقدار آهن کل برگ به روش جذب اتمی

در هر تیمار به ۰/۲ گرم از وزن خشک برگ گیاه، سه سی سی اسید نیتریک غلیظ اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا مواد آلی کاملا تجزیه شوند سپس با استفاده از حرارت، اسید موجود تبخیر و حجم نمونه ها با آب یون زدایی شده به ۱۰ سی‌سی

رسانده شد. جذب نمونه ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی خوانده شد و غلظت آهن کل بر اساس منحنی استاندارد محاسبه گردید و بر حسب میلی گرم برگرم وزن خشک گزارش شد.

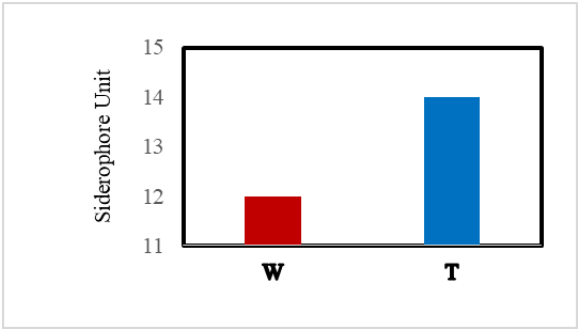
محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل‌های آماری در این مطالعه با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. تجزیه و تحلیل‌های آماری داده های به‌دست‌آمده حاصل سنجش‌های کمی مختلف در این مطالعه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS و به روش آنالیز واریانس انجام گرفت و اختلاف میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند. شکل‌های مربوطه با نرم‌افزار Excel 2007 رسم گردید.

نتایج

نتایج حاصل از سنجش تولید سایدروفور

نتایج حاصل از اندازه گیری میزان تولید سایدروفور توسط باکتری های مورد استفاده در این تحقیق در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود باکتری *Enterobacter cloacae*(T) توانایی تولید سایدروفور بیشتری را نسبت به باکتری *Bacillus cereus*(W) داشت.

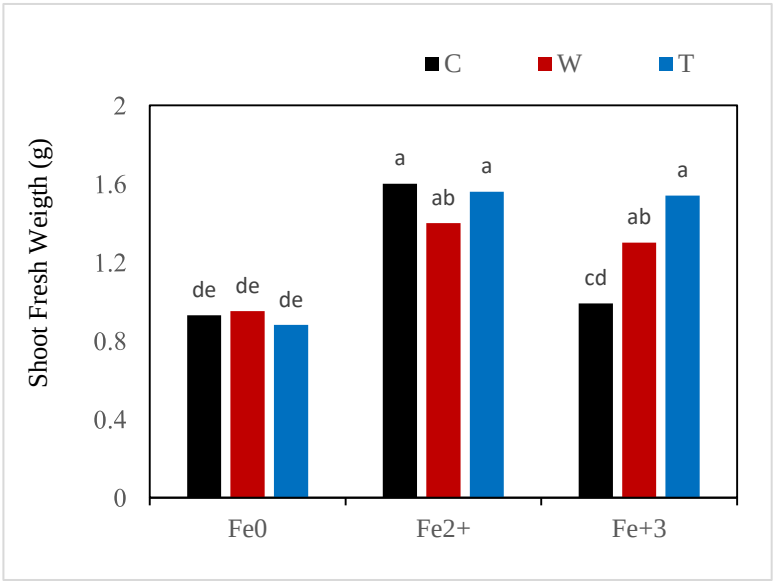


شکل ۱- نتایج حاصل از اندازه گیری تولید سایدروفور در دو سویه باکتریهای *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) مورد استفاده در این پژوهش.

Figure.1 Results of siderophore production measurements in two bacterial strains *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) which used in this research

وزن تر اندام هوایی

نتایج حاصل از اندازه گیری وزن تر اندام هوایی نشان داد که گیاهان در تیمارهای Fe0 (تیمار شاهد) و Fe^{3+} (آهن غیر قابل دسترس)، دارای وزن کمتری نسبت به گیاهان تیمار شده با Fe^{2+} (آهن قابل جذب برای گیاه) می باشند. تیمار نهال‌های پسته با باکتری‌های T و W اثر معنی داری بر وزن تر گیاهان در تیمارهای Fe^{2+} و Fe0 در مقایسه با نمونه های تیمار نشده با باکتری، نداشت. درحالیکه در تیمار Fe^{3+} باکتری T و باکتری W باعث افزایش معنی دار وزن تر اندام هوایی نسبت به گیاهان بدون تیمار با باکتری گردید.

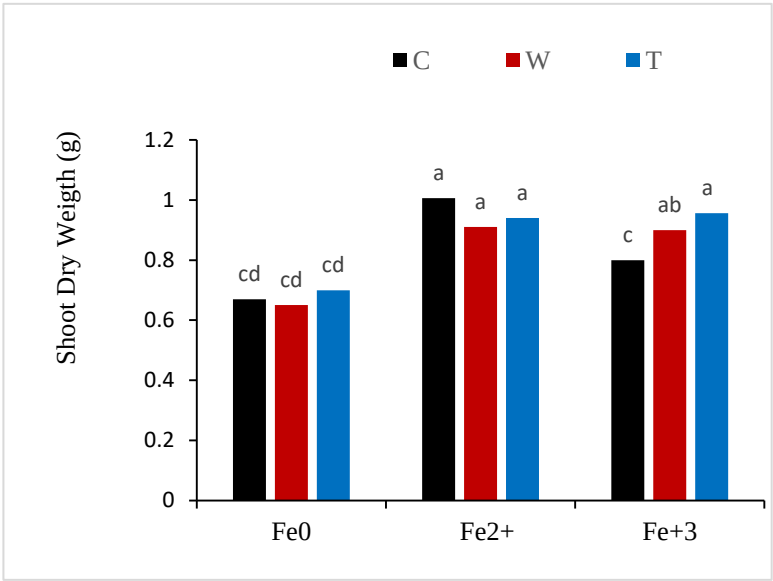


شکل ۲-اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط کمبود و فراهم بودن آهن بر وزن تر اندام هوایی (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 2. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on fresh weight of shoots (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

وزن خشک اندام هوایی

نتایج حاصل از اندازه گیری وزن خشک اندام هوایی نشان داد که گیاهان بدون تیمار باکتری، تحت تیمارهای کمبود آهن (Fe^{3+} , Fe0) دارای وزن خشک کمتری نسبت به گیاهان تحت تیمار Fe^{2+} بودند. وزن خشک در گیاهان تیمار شده با باکتری‌های T و W تنها در تیمار Fe^{3+} افزایش معنی داری را در مقایسه با گیاهان بدون تیمار باکتری نشان داد. در تیمارهای Fe0 و Fe^{2+} استفاده از باکتری ها تاثیر معنی داری بر وزن خشک در مقایسه با گیاهان بدون باکتری نداشت.

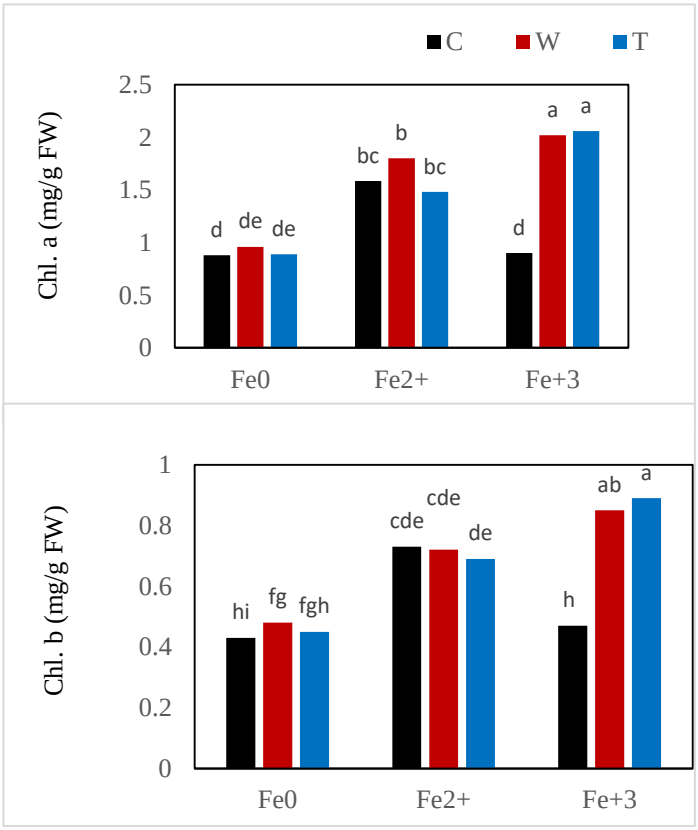


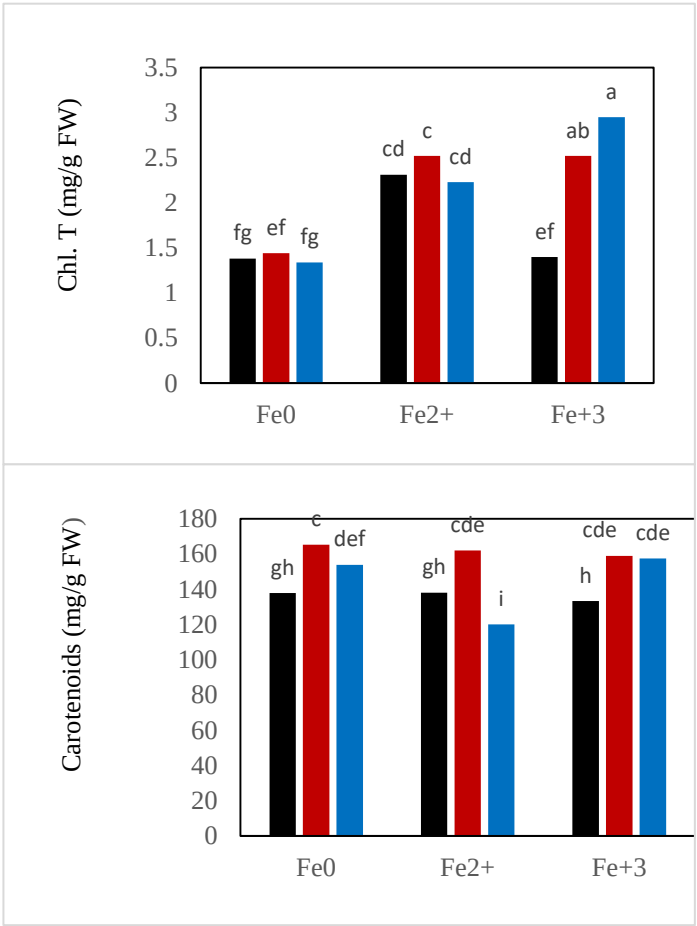
شکل ۳- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری *Enterobacter* cloacae(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط کمبود و فراهم بودن آهن، بر وزن خشک اندام هوایی (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 3. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on dry weight of shoots (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

مقدار کلروفیل و کاروتنوئیدها

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید ها در شکل شماره ۴ نشان داده شده است. نتایج حاصل از اندازه گیری مقدارکلروفیل‌های a، b و کلروفیل T برگ‌ها نشان داد که در گیاهان تیمار شده با Fe0 و Fe^{3+} مقدار کلروفیل ها به میزان قابل توجهی کمتر از گیاهان تیمار شده با Fe^{2+} است و گیاهان حالت رنگ پریدگی پیدا کردند. تیمار با باکتری ها در گیاهان تیمار شده با آهن Fe0 اثر معنی داری بر مقدار کلروفیل ها نداشت. اما در گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} افزودن باکتری ها به محیط ریزوسفر مقدار کلروفیل‌ها را به مقدار معنی داری افزایش داد. سنجش مقدار کاروتنوئیدها نشان داد که تیمار با فرم های مختلف آهن اثر معنی داری بر مقدار کاروتنوئیدها نداشت اما تیمار با هر دو سویه باکتری تقریبا در تمامی گیاهان مقدار کاروتنوئیدها را افزایش داد.



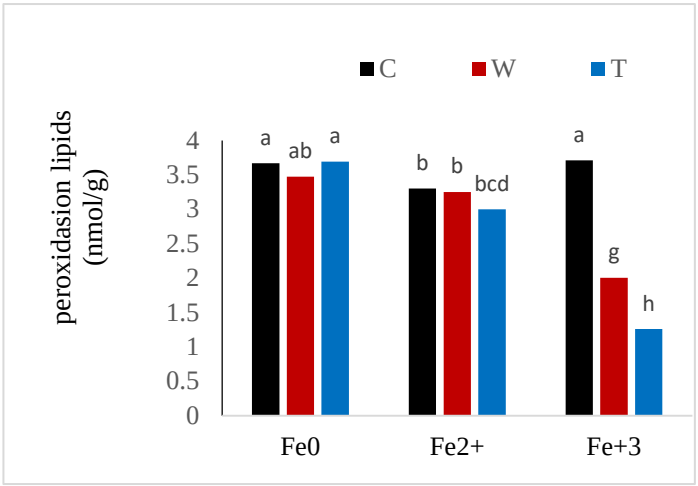


شکل ۴- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط کمبود و فراهمی آهن، بر رنگیزه های فتوسنتزی برگ . (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 4. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on photosynthetic pigments of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

پراکسیداسیون لیپیدها

نتایج حاصل از اندازه گیری پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی نشان داد که گیاهان بدون تیمار باکتری، تحت تیمارهای کمبود آهن (Fe^{3+} , Fe0) افزایش معنی داری را در مقدار پراکسیداسیداسیون لیپیدها در مقایسه با گیاهان تیمار شده با آهن فروس داشته‌اند که نشان دهنده افزایش تنش تغذیه ای در آنها بود. تیمار گیاهان با باکتری های T و W پراکسیداسیون لیپیدها در گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} را کاهش داد هرچند اثر باکتری W در این گیاهان بیشتر از باکتری T بود اما تاثیر معنی داری در گیاهان تحت تیمار Fe0 و Fe^{2+} نداشتند (شکل ۵).

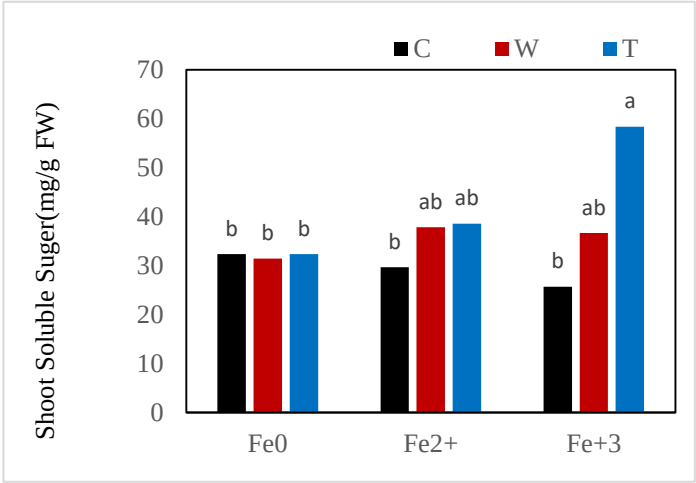


شکل۵ - اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری (T)*Enterobacter cloacae* و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 5 . Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron on lipid peroxidation of membrane (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

مقدار قندهای محلول

همانطور که در شکل شماره ۶ نشان داده شده است تیمار با باکتری ها اثر معنی داری بر مقدار قندهای محلول در گیاهان تیمار شده با فرم های مختلف آهن نداشت . تنها باکتری T در گیاهان تیمار شده با Fe^{3+} مقدار قندهای محلول را افزایش داد.

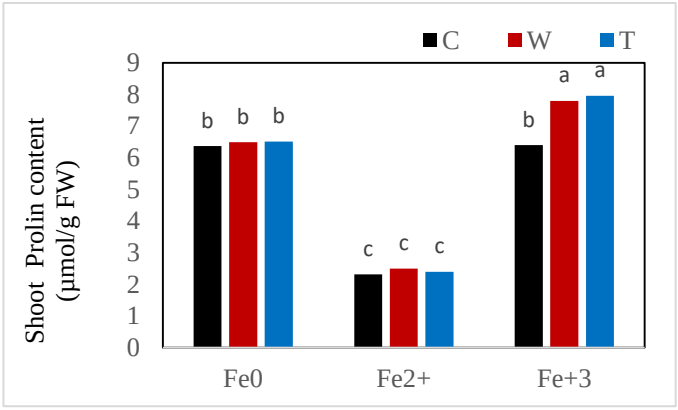


شکل۶- اثر تیمار نهالهای پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W)در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدارکربوهیدراتهای محلول برگ (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 6. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron on soluble carbohydrates of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

مقدار پرولین

اندازه گیری مقدار پرولین نشان داد که مقدار پرولین در تیمار های Fe^{3+} و Fe0 که کمبود آهن وجود دارد افزایش معنی داری نسبت به تیمار Fe^{2+} داشت. تیمار ریشه ی گیاهان با باکتری های T و W در این شرایط فقط مقدار پرولین را در گیاهان تیمار شده با آهن Fe^{3+} افزایش داد.

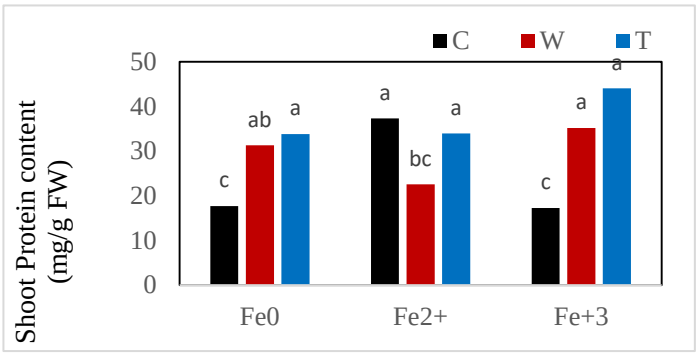


شکل۷- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری (T)*Enterobacter cloacae* و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار پرولین برگ (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 7. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on proline content of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

مقدار پروتئین

اندازه گیری پروتئین های محلول اندام هوایی نشان داد که باکتری ها مقدار پروتئین‌ها را در تیمارهای کمبود آهن افزایش دادند اما در تیمار Fe^{2+} باکتری W مقدار پروتئین را کاهش داد.

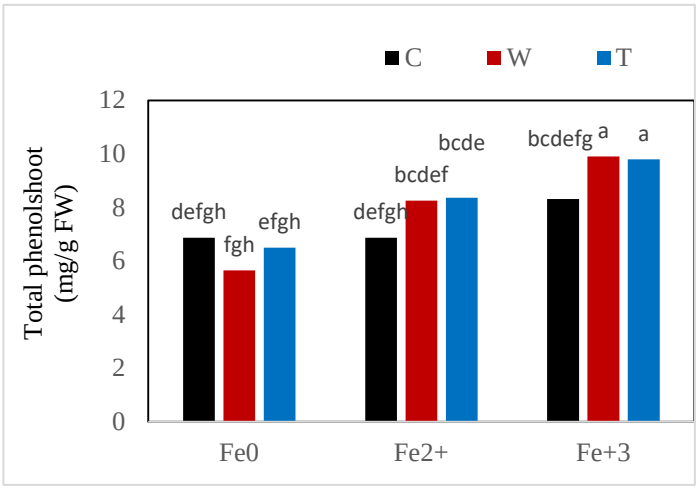


شکل۸- اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری (T)*Enterobacter cloacae* و *Bacillus cereus(W)* در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار پروتئینهای برگ . (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 8. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on protein content of the leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

مقدار ترکیبات فنلی کل

نتایج حاصل از اندازه گیری ترکیبات فنلی اندام هوایی نشان داد در گیاهان بدون تیمار باکتری، کمبود آهن اثر معنی داری بر مقدار ترکیبات فنلی نداشته است و تنها در گیاهان تیمار شده با آهن فریک، باکتریهای T و W مقدار ترکیبات فنلی را افزایش دادند.

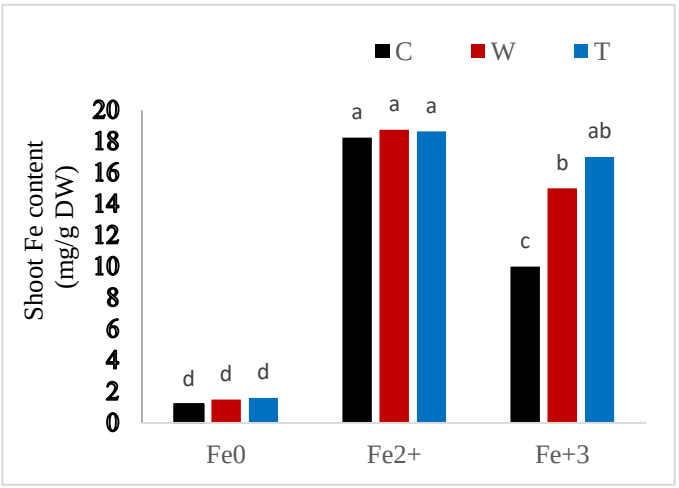


شکل۹ - اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری *Enterobacter cloacae*(T) و *Bacillus cereus*(W) در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار فنل های کل (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure .9 Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron, on total phenol (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

مقدار آهن

مقدار آهن در برگ های گیاهان کنترل و تحت تیمار Fe^{3+} کاهش معنی داری را در مقایسه با تیمار Fe^{2+} (فرم قابل جذب آهن) نشان داد. تیمارگیاهان با باکتری، در شرایط کنترل (بدون افزودن آهن) و در تیمار با آهن Fe^{2+} که فرم قابل جذب آهن است، تاثیر معنی داری بر مقدار آهن کل جذب شده گیاه نداشت اما در گیاهانی که با آهن Fe^{3+} تیمار شده بودند، تیمار با باکتری ، مقدار آهن جذب شده توسط گیاه را به میزان معنی داری افزایش داد.



شکل۱۰ - اثر تیمار نهال های پسته (رقم احمد اقایی) با دو سویه باکتری (T)*Enterobacter cloacae* و (W)*Bacillus cereus* در شرایط فراهمی و کمبود آهن، بر مقدار آهن برگ (C به عنوان گیاه شاهد تیمار نشده با باکتری در نظر گرفته شده است). میانگین ها با آزمون LSD مقایسه شدند. مقادیر±SE است. حروف یکسان بیانگر عدم اختلاف معنی دار در سطح P<0.05 است.

Figure 10. Effect of pistachio seedlings treatment (Ahmad Aghaei cultivar) with two strains of *Enterobacter cloacae* (T) and *Bacillus cereus* (W) bacteria, in conditions of availability and deficiency of iron on Fe content of leaves (C is considered as control plant not treated with bacteria). The means were compared by LSD test. Values are ± SE. Same letters indicate no significant difference at the level of P <0.05.

بحث

بهبود جذب آب و تولید فیتوهورمون ها به وسیله ی باکتری می تواند از دلایل بهبود رشد در گیاهان تیمار شده با باکتری های محرک رشد باشد (El-Ghany *et al.*, 2015). گزارش شده است که ترشحات باکتریایی باعث تحریک سنتز هورمون هایی مانند اکسین، جیبرلین و

سیتوکینین در گیاه می شوند که در بهبود رشد نقش دارند (Kant *et al.*, 2006). علاوه بر این رهاسازی ترکیبات احیاکننده و شلات کننده مثل سایدروفورها توسط باکتری های محرک رشد در ریزوسفر، دسترسی به Fe^{2+} را برای گیاهان بیشتر می کند و کمبود آهن گیاه را جبران کرده و اختلالات تغذیه ای حاصل از کمبود آهن را کاهش می دهند (Rout & Sahoo, 2015, Esther *et al.*, 2020; Aguado-Santacruz *et al.*, 2012; Mimmo *et al.*, 2014). بنابراین تولید سایدروفور و فراهم کردن آهن برای گیاهان می تواند یکی از اثرات مثبت باکتری ها باشد که باعث افزایش رشد گیاهان شده و بیوماس گیاه را افزایش می دهند (de Souza *et al.*, 2015) که این افزایش رشد در اثر تیمار با باکتری در مطالعه حاضر نیز به وضوح مشاهده گردید. با توجه به اینکه سایدروفورهای باکتریایی نسبت به فیتوسایدروفورها تمایل بیشتری به آهن دارند و قادر به رها سازی آهن ازکمپلکس های آهن-سایدروفور هستند، بنابراین تلقیح گیاهان با باکتری های تولید کننده سایدروفور به عنوان یک استراتژی برای غلبه بر کمبود آهن، مورد استفاده قرار گرفته است (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). البته گزارش شده است که اثر این باکتری ها ممکن است از طریق القای ژن‌های گیاهی مرتبط با پاسخ‌های بیوشیمیایی به محدودیت آهن با واسطه باکتری و یا عملکرد مستقیم سایدروفورهای تولید شده توسط باکتری ها باشد (Zhang *et al.*, 2009). در این پژوهش نیز اندازه گیری مقدار سایدروفور تولیدی نشان داد که باکتری‌های مورد استفاده قادر به تولید سایدروفور می باشند و احتمالا نقش آنها در جبران کاهش رشد ناشی از کمبود آهن به همین دلیل است. در تحقیقات قبلی بر روی ذرت، آفتابگردان و خیار نیز نشان داده شده است که فعالیت میکروبی برای تجمع آهن در ریشه‌ها و انتقال آهن به برگ‌ها تعیین‌کننده است و تأیید می کند که سایدروفورهای باکتریایی نقش مهمی در فرآیند تأمین آهن در گیاهان دارند (Masalha *et al.*, 2000; de Santiago *et al.*, 2013; Pii *et al.*, 2015). افزایش مقدار آهن کل در برگ ها نیز که در این پژوهش مشاهده شده می تواند به دلیل عملکرد مثبت باکتری ها در فراهمی آهن قابل جذب در گیاهان پسته باشد. کلروزگی برگها یکی از مهمترین نشانه های کمبود آهن در گیاهان است و گزارش شده است که باکتری های محرک رشد، با در دسترس قرار دادن آهن، منجر به بهبود مسیر سنتز کلروفیل و برطرف شدن کلروزگی برگ ها

مـی شـوند. همچنـین بـاکتری هـا باعـث کـاهش نفوذپـذیری غشـاء و پراکسیداسـیون لیپیـدها و حفـظ یکپارچگی و عملکـرد غشـاها مـی شـوند و بـا مهـار تولیـد گونـه هـای فعـال اکسـیژن حفاظـت گیاهـان را در شـرایط تـنش برعهـده دارنـد (Sah & Singh, 2015 , Shukla *et al.*, 2012). بنـابراین شـاید یکـی از دلایـل افـزایش محتـوای کلروفیـل گیاهـان در ایـن پـژوهش، پـس از کـاربرد بـاکتری هـای محـرک رشد در شرایط کمبود آهن، بـه دلیـل نقـش مـوثر بـاکتری هـا در فـراهم کـردن آهـن همـراه بـا حفاظـت غشا و ساختار کلروپلاست با از بـین بـردن گونـه هـای فعـال اکسـیژن باشـد. عـلاوه بـر ایـن گـزارش شـده است که باکتری های محرک رشـد بـا تولیـد سـایدروفور، بـا تبـدیل آهـن فریـک بـه آهـن فـروس کمبـود آهن را جبران کـرده و آهـن قابـل جـذب را در اختیـار گیـاه قـرار مـی دهنـد و از آسـیب غشـایی ناشـی از کمبـود آهـن جلـوگیری مـی کننـد و بـا کـاهش میـزان مـالون دآلدئیـد نقـش حفـاظتی بـرای غشـا ایفـا می‌کنند (Shukla *et al.*, 2012,).

در ایـن پـژوهش مشـاهده شـد کـه در تیمـار آهـن غیـر قابـل جـذب توسـط گیـاه، کـاربرد باکتریهـای PGPR باعـث افـزایش مقـدار کربوهیـدرات هـا در مقایسـه بـا گیاهـان بـدون تیمـار بـاکتری گردید. این اثر باکتری هـا در افـزایش مقـدار کربوهیـدرات هـا در مطالعـات قبـل نیـز گـزارش شـده اسـت و بیان داشته اند کـه ایـن اثـر مـی توانـد بـه دلیـل فـراهم شـدن آهـن در دسـترس گیـاه، افـزایش مقـدار کلروفیـل و متعاقـب آن افـزایش فتوسـنتز و سـنتز قنـدها، کـاهش تـنش اکسـیداتیو و حفاظـت از غشـای کلروپلاسـتی و غشـای سـلول هـا باشـد (Bharti *et al.*, 2016). افـزایش محتـوای پـروتئین و پـرولین پس از کاربرد بـاکتری در شـرایط کمبـود آهـن، نیـز احتمـالا بـه دلیـل نقـش مـوثر بـاکتری هـا در بهبـود ظرفیـت آنتـی اکسـیدانی و جلـوگیری از وارد شـدن آسـیب هـای اکسـیداتیو بـه پـروتئین هـا و تخریـب آن هـا مـی باشـد (Morales *et al.*, 2000, Ahluwalia *et al.*, 2021). در ایـن پـژوهش، وجـود آهـن سـه ظرفیتـی (Fe^{3+}) در خـاک و عـدم جـذب آن، باعـث ایجـاد تـنش و افـزایش مقـدار پـرولین گردیـده اسـت کـه ایـن افـزایش پـرولین هـم در گیاهـان فاقـد آهـن (Fe0) و هـم گیاهـان تیمـار شـده بـا Fe^{3+} مشاهده شـد. در ایـن مطالعـه بـا وجـود اینکـه تصـور بـر ایـن بـود کـه افـزودن بـاکتری فراهمـی آهـن را افزایش دهد و مقـدار پـرولین را کـاهش دهـد امـا علیـرغم تصـور مـا افـزایش پـرولین در آنالیزهـا مشـاهده شد.

در گیاهان تحت تنش، تعدادی از پروتئین ها کاهش می یابند اما برخی دیگر که نقش حفاظتی یا دفاعی دارند افزایش می یابند بنابراین در گیاهانی که تحت تنش قرار می گیرند، الگوی خاصی برای افزایش یا کاهش مقدار پروتئین های کل وجود ندارد و بستگی به جنس و گونه گیاه و نوع تنش و شرایط رشدی گیاه متفاوت است و مقدار پروتئین که اندازه گیری شده می تواند افزایشی و یا کاهشی باشد که در این مطالعه تیمار گیاهان با باکتری های محرک شد مقدار پروتئین محلول را در گیاه پسته افزایش داده است.

در این پژوهش افزایش مقدار فنل های گیاه در تیمار آهن فریک مشاهده شد. فنل های ترشح شده می توانند باعث افزایش پروتون و تبدیل آهن فریک به اهن فرو شوند که قابل جذب برای گیاه است. به نظر می رسد باکتری ها از طریق ارتباطات سیگنالینگ افزایش فنل را منجر می شوند تا مقدار اهن احیا شده و در دسترس گیاه بتواند از این طریق نیز افزایش یابد (Miransari, 2014 , Siddiqui, 2005). در پژوهش های قبلی نیز گزارش شده است که باکتری های محرک رشد سبب افزایش ترکیبات فنلی در گیاه گوجه (Sharma 2017 &Sharma,)، موز (Meena, 2000) و برنج (Maziah, 2010) تحت تنش شوری شده است.

به طور کلی در این مطالعه به نظر می رسد که باکتری ها با تولید سایدروفور و ایجاد کمپلکس آهن فریک- سایدروفور و احیا فرم آهن فریک به آهن فروس، آهن قابل جذب فروس را در اختیار گیاه قرار داده و کمبود آهن را در گیاه جبران کرده اند. بنابراین می توان در گیاهانی که دچار کمبود آهن هستند به جای استفاده از کودهای آهن از باکتری های PGPR استفاده کرد تا به روش زیستی آهن را احیا کرده و در اختیار گیاه قرار دهند و کاهش رشد گیاه را جبران نمایند.

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم دانسته که مراتب تشکر خود را از کلیه افرادی که در انجام این تحقیق آن ها را یاری کرده اند، اعلام دارند.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافعی در این مقاله وجود ندارد.

منابع

حسینی فرد، س ج، بصیرت، م، صداقتی، ن، و اخیانی، ا. (۱۳۹۶). دستورالعمل مدیریت تلفیقی حاصلخیزی خاک و تغذیه درختان پسته. انتشارات موسسه تحقیقات خاک و آب، کرج.

حسینی فرد، س ج، صداقتی، ن، محمدی محمد آبادی، ا، علی پور، ح، نیکویی دستجردی، م. (۱۳۹۸). اثرات محلولپاشی آهن از منابع سولفاته و کلاته بر عملکرد و کیفیت میوه درختان پسته رقم اوحدی در استان کرمان. مجله علوم و فناوری پسته، جلد ۴. شماره ۸.

Bates L.S., Waldern R.P. and Tare I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil, 29:205-207

Afrousheh, M., Ardalan, M., Hokmabadi, H. and Afrousheh, M. (2010). Nutrient deficiency disorders in Pistacia vera seedling rootstock in relation to eco-physiological, biochemical characteristics and uptake pattern of nutrients. Scientia Horticulturae, 124: 141-148.

Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-G´omez, B., Jim´enez-Francisco, B., Garc´ıa-Moya, E., Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: A synthesis. Revista Fitotecnia Mexicana, 35: 9-21

Ahluwalia, O., Singh, P.C. and Bhatia, R. (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. Resources, Environment and Sustainability, 5:100032.

Alexander, D. B. and Zuberer, D. A. (1991). Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. Biology and Fertility of soils, 12(1): 39-45.

Bharti, N., Pandey, S. S., Barnawal, D., Patel, V. K. and Kalra, A. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria Dietzia natronolimnaea modulates the expression of stress responsive genes providing protection of wheat from salinity stress. Scientific reports, 6: 34768.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2): 248-254

Cassán, F., Vanderleyden, J. and Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus Azospirillum. Journal of Plant Growth Regulation, 33(2): 440-459.

De Santiago, A., Garc´ıa-L´opezm A, M., Quintero, J. M., Avil´es, M., Delgado, A. (2013). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. Soil Biology and Biochemistry, 57: 598–605.

De Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L. M. P. (2015). Plant growth promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. Genetic and Molecular Biology, 38: 401–419.

Do Amaral, F. P., Pankievicz, V. C., Arisi, A. C. M., de Souza, E. M., Pedrosa, F. and Stacey, G. (2016). Differential growth responses of Brachypodium distachyon genotypes to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria. Plant molecular biology, 90(6): 689-697.

El-Ghany, A., Masrahi, Y. S., Mohamed, A., Abboud, A. and Alawlaqi, M. M. (2015). Maize (Zea Mays L.) Growth and Metabolic Dynamics with Plant Growth-Promoting Rhizobacteria under Salt Stresses. J Plant Pathol Microb, 6: 305.

Esther, J., Pattanaik, A., Pradhan, N. and Sukla, L.B. (2020). Applications of Dissimilatory Iron Reducing Bacteria (DIRB) for recovery of Ni and Co from low-grade lateritic nickel ore. Materials Today: Proceedings, 30: 351-354.

Fales, F.W. (1951). The assimilation and degradation of carbohydrates by yeast cells. Journal of Biological Chemistry.193: 113-124.

Ferreira, M.J., Silva, H. and Cunha, A. (2019). Siderophore-producing rhizobacteria as a promising tool for empowering plants to cope with iron limitation in saline soils: A review. Pedosphere, 29(4):409-420.

Gao, L., Velioglu Y.S., Mazza G. and Oomah B.D (1998) Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of agricultural and food chemistry. 19;46(10): 4113-7.

Heath R.L. and Packer L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics, 1;125:189-98

Kant S., Kant P., Raveh E., and Barak S. (2006). Evidence that differential gene expression between the halophyte, *Thellungiella halophila*, and *Arabidopsis thaliana* is responsible for higher levels of the compatible osmolyte proline and tight control of Na+ uptake in *T. halophila*. Plant, Cell & Environment, 29 (7): 1220-1234.

La Torre-Ruiz, D., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Rincón-Molina, C. I., Rodríguez-Mendiola, M., Arias-Castro, C., Gutiérrez-Miceli, F. A. and Rincón-Rosales, R. (2016). Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana* L. Brazilian journal of microbiology, 47(3): 587-596.

Lightenthaler H. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, Methods in Enzymology,148:350-82.

Masalha, J., Kosegarten, H., Elmaci, O., Mengel, K. (2000). The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. Biology and Fertility of Soils, 30: 433–439.

Maziah, M. Z. (2010). Influence of boron on the growth and biochemical changes in plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculated banana plantlets, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(5): 933-944.

Meena, B. R. (2000). Induction of pathogenesis related proteins, phenolics and phenylalanine ammonia lyase in groundnut by Pseudomonas fluorescens. Pakistan Journal of Biological Sciences, 12(17): 1181-1187.

Mimmo, T., Del Buono, D., Terzano, R., Tomasi, N., Vigani, G., Crecchio, C., Pinton, R., Zocchi, G., Cesco, S. (2014). Rhizospheric organic compounds in the soil-microorganism-plant system: Their role in iron availability. Europian journal of Soil Sciences, 65**:** 629–642

Mirzapour, M .H. and Khoshgoftarmanesh, A .H. (2013). Effect of soil and foliar application of iron and zinc on quantitative and qualitative yield of pomegranate. Journal of plant nutrition, 36(1): 55-66.

Morales, F., Belkhodja, R., Abadía, A. and Abadía, J. (2000). Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). Photosynthesis Research, 63(1): 9-21.

Pii, Y., Penn, A., Terzano, R., Crecchio, C., Mimmo, T., Cesco, S. (2015). Plant-microorganism-soil interactions influence the Fe availability in the rhizosphere of cucumber plants. Plant physiology and Biochemistry, 87: 45–52

Rout, G. R. and Sahoo, S. (2015). Role of iron in plant growth and metabolism. Reviews in Agricultural Science, 3: 1-24

Sah, S. and Singh, R. (2015). Siderophore: structural and functional characterization–a comprehensive review. Agriculture (Polnohospodárstvo), 61(3): 97-114.

Sharma, I., and Sharma, A. (2017). Physiological and biochemical changes in tomato cultivar PT-3 with dual inoculation of mycorrhiza and PGPR against root-knot nematode. Symbiosis, 71: 175-183.

Shukla, P. S., Agarwal, P. K. and Jha, B. (2012). Improved salinity tolerance of *Arachishypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. Journal of plant growth regulation, 31(2): 195-206.

Siddiqui, Z. A. (2005). PGPR: prospective biocontrol agents of plant pathogens. In PGPR: biocontrol and biofertilization, pp: 111-142).

Singh, N., Mishra, K. and Varma, A. (2015). Isolation, screening and characterization of PGPRs from the semi-arid rhizospheric soil of *Jatropha curcas*. Journal of Endocytobiosis and Cell research, 2: 13-20.

Williamson, A.J., Folens, K., Matthijs, S., Cortes, Y.P., Varia, J., Du Laing, G., Boon, N. and Hennebel, T. (2021). Selective metal extraction by biologically produced siderophores during bioleaching from low-grade primary and secondary mineral resources. Minerals Engineering, 163: 106774

Zhang, H. M., Sun, Y., Xie, X. T., Kim, M. S., Dowd, S. E., Par´e, P. W. (2009). A soil bacterium regulates plant acquisition of iron *via* deficiency-inducible mechanisms. Plant Journal. 58: 568–577.

A comparative study of inoculation with two growth-promoting and siderophore-producing bacteria (*Enterobacter cloacae* & *Bacillus cereus*) on iron availability in pistachio seedlings *(Pistacia Vera* L.)

F. Bahraminejad[1], F. Nasibi[2], H. Oloumi[3], R. Arab[4] *

Received: 2022.6.19
Accepted: 2023.1.21

Abstract

Introduction: Iron deficiency is one of the most important problems that affects the growth of plants. In this study, the effect of two strains of growth stimulating bacteria producing siderophore (*Enterobacter cloacae* & *Bacillus cereus*) on biochemical properties of pistachio seedlings in conditions of availability and deficiency of iron was investigated.**Methods**: In this research, which was done in a factorial design in the form of a completely randomized pattern, ferric iron (Fe^{+3}) and ferrous iron (Fe^{+2}) were given to plants that had grown for two months at a concentration of 20 micromolar. Plants without iron (zero iron) were considered as controls.**Results:** The results showed that ferric iron in concentrations of 20µM and zero iron reduced plant growth and damage to them. By using growth-promoting bacteria in ferric iron-treated plants, some growth parameters such as fresh weight, photosynthetic pigments, phenolic compounds, soluble sugars, lipid peroxidation and proline were improved. Treatment of plants with growth-promoting bacteria also increased the amount of protein in plants treated with ferric iron. Growth-promoting bacteria also increased iron uptake in the shoots of ferric iron-treated seedlings. It seems that in plants treated with ferric iron, growth-promoting bacteria with the production of siderophore led to the reduction of iron and increase the available iron in the plant and reduce iron deficiency stress.

Keywords: *Ferric iron, Plant growth promoting bacteria, Lipid peroxidation, iron deficiency.*

1.MSc student, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.
2.Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Bahonar University, Kerman, Iran.
3.Associate Professor, Ecology Department, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman
4.Instructor, Department of Biology, Bam Branch, Islamic Azad University, Bam, Iran**(***Corresponding author: rozaarab.iau@gmail.com**)**