

ارزیابی میزان مهار زیستی *Rhizoctonia solani* در گیاه پنبه با جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens*

۱. فاطمه زهرا عبداللہی پور*؛ ۲. اکبر شیرزاد؛ ۳. حمید محمدی
۱. کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۲. استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۳. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۳۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۹)

چکیده

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد، جایگزینی مناسب برای سموم شیمیایی در کنترل بیمارگرها به‌خصوص بیمارگرهای خاکزاد هستند. *Rhizoctonia solani* یکی از قارچ‌های مهم بیماریزای خاکزی است که خسارات جدی به محصولات کشاورزی وارد می‌کند. در این پژوهش، میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر با جدایه‌های سودوموناس در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. جدایه‌های باکتری از لحاظ تولید اکسین، انحلال فسفر، تولید سیدروفور، تولید آنزیم ۱- آمینوسیکلوپروپان ۱- کربوکسیلیک اسید (ACC) د - آمیناز و ردیابی ژن *phlD* غربال شدند. از بین جدایه‌های مورد مطالعه ۲۰ جدایه از لحاظ میزان بازدارندگی برای مطالعات بعدی انتخاب شدند که از میان آن‌ها جدایه‌های 139، 33 و 137 بیشترین میزان تولید اکسین و توانایی حل فسفات را داشتند. میان انحلال فسفات و کاهش pH به سمت اسیدی، همبستگی مشاهده شد. از بین جدایه‌ها، ۶ جدایه که تولید اکسین بالاتری داشتند و در شرایط آزمایشگاه توانایی خوبی در بازدارندگی از رشد *R. solani* نشان دادند، برای بررسی توانایی تولید آنزیم ACC د - آمیناز انتخاب شدند. هر ۶ جدایه توان تولید آنزیم ACC د - آمیناز را داشتند. ژن *phlD* که در مسیر بیوستز آنتی‌بیوتیک ۲- ۴ دی‌استیل فلورو گلوکوسینول نقش کلیدی دارد، در جدایه‌های 159، 139، 137، CHA0 و 58A ردیابی شد. با توجه به خصوصیات جدایه‌ها، ۵ جدایه کارآمد برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. در آزمایش‌های گلخانه‌ای، هر ۵ جدایه به‌طور معنی‌داری ($P < 0.01$) بیماری را کنترل کردند که بیشترین کنترل‌کنندگی مربوط به جدایه 137 بود.

کلیدواژگان: بیوکنترل، پنبه، *Pseudomonas fluorescens*، *Rhizoctonia solani*

مقدمه

(Azaddisfani et al. 1390) که در میان آن‌ها بیمارگر *R. solani* اهمیت بیشتری دارد (Hillocks 1992). بیمارگر *R. solani* یکی از قارچ‌های مهم بیماریزای خاکزی است که می‌تواند خسارات جدی به محصولات کشاورزی از قبیل پنبه، لوبیا و سیب‌زمینی وارد کند.

مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های مهم پنبه در مناطق مختلف کشور است که همه‌ساله خسارت زیادی به مزارع پنبه وارد می‌کند، گسترش جهانی دارد و با مجموعه‌ای از عوامل بیماریزا، خصوصاً عوامل قارچی به‌وجود می‌آید

مکانیسم‌های مورد استفاده در این روش هستند (Klopper *et al.* 1988).

آنتی‌بیوتیک DAPG^۲، یکی از آنتی‌بیوتیک‌های مهم است که توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنت تولید می‌شود (Weller 1988). تولید این آنتی‌بیوتیک توسط ۸ ژن، در سه واحد نسخه‌برداری کنترل می‌شود که ژن *phlD* یکی از ژن‌های کلیدی در مسیر بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک است (Solymani Monfared *et al.* 1391).

فسفر یکی از عناصر ضروری مورد نیاز در گیاهان است. خاک مخزن بزرگی از فسفر است، اما بخش کوچکی از فسفر موجود در خاک برای گیاهان قابل دسترس است. به این دلیل که بخش بزرگی از فسفر خاک در فرم نامحلول و جذب‌نشده است، در حالی که گیاهان فقط می‌توانند فرم محلول در آب ($H_2PO_4^{1-}$)، ریزوباکترها می‌توانند منابع فسفر معدنی و آلی را از طریق ترشح اسیدهای آلی و آنزیم‌های حل‌کننده فسفات از قبیل فسفاتاز، فیتاز، فسفوناتازها و C-P lyases حل کنند و رشد و عملکرد محصولات را افزایش دهند (Richardson *et al.* 2009). علاوه بر این، باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد می‌توانند با تولید هورمون اکسین معماری ریشه را تغییر و رشد و عملکرد گیاه را ارتقا دهند (Klopper *et al.* 2007). اکسین نقش چشمگیری در افزایش ناحیه سطحی ریشه و تعداد ریشه‌های مویی دارد که باعث افزایش جذب مواد غذایی و تثبیت محکم گیاه در خاک می‌شود (Han *et al.* 2005) و از این طریق باعث بهبود رشد و عملکرد گیاه می‌شود. ریزوباکترها می‌توانند اکسین را از مسیرهای گوناگون سنتز کنند؛ اما مکانیسم اصلی سنتز وابسته به پیش‌ماده تریپتوفان است که ریشه گیاهان آن را ترشح می‌کند (Spaepen *et al.* 2007) افزایش اکسین در ریشه گیاه باعث افزایش تولید ACC، می‌شود که پیش‌ماده تولید اتیلن است. همچنین، تولید اتیلن در شرایط تنش از قبیل شوری، خشکی، حمله بیمارگر و مسمومیت با فلزات سنگین افزایش پیدا می‌کند (Saleem *et al.* 2007). هرچند اتیلن برای رشد و توسعه نرمال در گیاهان ضروری است، در غلظت‌های بالا برای فرآیندهای سلولی مضر است که به کاهش

این بیمارگر قارچی موجب پوسیدگی ریشه، طوقه و سوختگی در اندام‌های هوایی گیاه می‌شود. بیمارگر در گیاه پنبه باعث گیاهچه‌میری قبل از خروج گیاه از خاک و ایجاد زخم و پوسیدگی در ناحیه طوقه می‌شود (Azaddisfani *et al.* 1390). روش شیمیایی سریع‌ترین راه کنترل این بیمارگر است، اما به دلیل خاکزاد بودن عوامل مرگ گیاهچه، استفاده از روش‌های شیمیایی مثل پوشش دادن بذر با سموم شیمیایی یا سم‌پاشی مزارع نتیجه رضایت‌بخشی ندارد (Azaddisfani *et al.* 1390).

موضوع کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به خصوص باکتری‌های متعلق به سودوموناس‌های فلورسنت از قبیل: *P. putida* و *P. fluorescens* در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی مطرح است (Weller 1988). ریزوسفر غنی از عوامل میکروبی است و ریزوباکترهایی که توانایی کلنیزاسیون ریشه را دارند، نقش برجسته‌ای را در ناحیه ریزوسفر دارند. از میان ریزوباکترهای بهبوددهنده رشد گیاه (PGPR)^۱، باکتری‌های متعلق به جنس سودوموناس به‌خصوص سودوموناس‌های فلورسنت اهمیت ویژه‌ای دارند (Weller, 1988). باکتری‌های ریزوسفر محرک رشد می‌توانند با استفاده از مکانیسم‌های مختلفی به‌طور مستقیم در افزایش رشد و عملکرد گیاه ایفای نقش کنند. افزایش انحلال عناصر غذایی با حلالیت کم مانند فسفر، تولید ACC د - آمیناز، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین، تثبیت نیتروژن و تولید سیدروفور (از دیدگاه افزایش قابلیت جذب آهن) از مکانیسم‌های مهم مورد استفاده با عوامل PGPR هستند (Ping and Boland 2004). به‌طور غیرمستقیم، باکتری‌های ریزوسفر محرک رشد با استفاده از مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی تأثیرات مضر بیمارگرهای گیاهی را خنثی یا تعدیل می‌کنند و بدین طریق موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Ping and Boland 2004). رقابت برای جذب مواد و اشغال جایگاه‌های مناسب برای فعالیت بیمارگر، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید سیدروفورها، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و تولید سیانید هیدروژن از مهم‌ترین

مواد و روش‌ها

از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، ۲۰ جدایه *P. fluorescens* تهیه شد که این جدایه‌ها از ناحیه ریزوسفر گیاهان زراعی مناطق مختلف آذربایجان، ارومیه و تبریز، جداسازی شده بودند. جدایه‌ها در محلول 0.1M MgSO₄ نگهداری شدند. عامل بیمارگر *R. solani* AG-4 از آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه تهران تهیه شد (در مقالات مختلف گزارش شده است که گروه آناستوموزی AG-4 در گیاه پنبه بیماریزاست و برای حصول اطمینان تست بیماریزایی نیز انجام شد).

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر *R. solani* با جدایه‌های باکتری در شرایط آزمایشگاه

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد *R. solani* درون تشتک پتری برای بررسی قدرت بازدارندگی از رشد *R. solani* در شرایط آزمایشگاه از روش Hagedorn *et al.* (1998) با اندکی تغییرات استفاده شد. ابتدا، ۲۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری‌ها به صورت دونقطه‌ای با فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA+NA^۲، به نسبت مساوی، کشت داده شدند. یک روز بعد، یک دیسک از کشت جوان قارچ در وسط تشتک‌های پتری قرار داده شد. در پتری شاهد از آب مقطر استریل به جای باکتری استفاده شد. سپس، تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای مقایسه قدرت بازدارندگی باکتری‌ها، فاصله کلنی باکتری تا کلنی قارچ محاسبه شد و با مقایسه قطر کلنی شاهد توان بازدارندگی باکتری‌ها سنجیده شد.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد *R. solani* با متابولیت‌های فرار باکتری‌ها

این آزمون مطابق روش فیدامن و روزال انجام شد (Fiddaman and Rossall, 1994). برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری آنتاگونیست روی محیط NA پخش شد و هم‌زمان یک دیسک از کشت میسلیومی جدید بیمارگر روی محیط PDA در تشتک جداگانه کشت شد و بیمارگر در قسمت رویی باکتری‌های آنتاگونیست قرار داده شد. فاصله باز آن دو

عملکرد محصول منجر می‌شود (Bhattacharyya and Jha 2012). تعدادی از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد دارای آنزیم ACC د - آمیناز هستند که می‌توانند با تجزیه ACC به آلفاکتوتیریک اسید و آمونیوم میزان اتیلن را در شرایط تنش تنظیم کنند.

یکی از رقابت‌های مهم میان میکروارگانیسم‌ها، رقابت بر سر آهن است. باکتری‌های ریزوسفری در شرایط کمبود آهن با تولید سیدروفور که تمایل زیادی به جذب آهن سه ظرفیتی دارد، آهن محدود موجود در ریزوسفر را در دسترس می‌گیرند و آن را برای بیمارگرها غیرقابل دسترس و در نتیجه رشد آن‌ها را محدود می‌کنند (Loper and Henkels 1999). همچنین، با در اختیار قراردادن کمپلکس سیدروفور - آهن برای گیاه باعث بهبود رشد گیاه در شرایط کمبود آهن می‌شوند. علاوه بر این نقش سیدروفورهای پایوردین در توان آنتاگونیستی تعدادی از سودوموناس‌های فلورسنت علیه بیمارگرهای گیاهی (*Fusarium oxysporum*, *Pythium spp.*) و میکروارگانیسم‌های زبان‌آور با استفاده از موتانت‌هایی که توانایی تولید سیدروفور را از دست داده بودند، به اثبات رسیده است (Duijff *et al.* 1993). در سال ۱۹۷۸، اثر آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط سودوموناس فلورسنت جداشده از ریزوسفر پنبه در کنترل *R. solani* در گیاه پنبه بررسی و مشاهده شد که آنتی‌بیوتیک پیروول نیتروین تولیدشده توسط *P. fluorescens* رشد عامل بیماریزا را در شرایط گلخانه مهار می‌کند و بقای گیاهچه را افزایش می‌دهد (Howell and Stipanovic 1979). در سال ۲۰۰۰، فعالیت آنتاگونیستی جدایه *P. fluorescens* EM85 علیه *R. solani*، عامل گیاهچه‌میری پنبه بررسی شد. مطالعات نشان داده است که باکتری‌ها با مکانیسم‌هایی از قبیل تولید HCN^۱ و سیدروفور و آنتی‌بیوتیک ضد قارچی، نقش مؤثری در کنترل عامل بیماریزا دارند (Pal *et al.* 2001).

هدف از انجام این پژوهش تعیین کارآمدترین سویه‌ها از لحاظ فعالیت‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاهی و تأثیر این مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم در کنترل بیمارگر در شرایط آزمایشگاه و گلخانه است.

2. Nutrient agar

3. Potato Dextrose agar

محیط TSB کشت داده شدند. سپس، به ۲۰ میلی‌لیتر از سه محیط (۱) DF حاوی ۳ میلی‌مولار ACC، (۲) محیط DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم (به‌عنوان مثبت) (۳) محیط بدون ACC و سولفات آمونیوم (به‌عنوان شاهد منفی)، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه تلقیح شد. بعد از ۴۸ ساعت، نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۲۰، با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در ۴۰۵ نانومتر به‌طور جداگانه برای هر سه محیط خوانده شد. توان تولید آنزیم ACC د - آمیناز، براساس میزان رشد باکتری در محیط حاوی ACC در مقایسه با رشد آن در محیط‌های شاهد، ارزیابی شد.

اندازه‌گیری توان حل فسفات

اندازه‌گیری توان حل فسفات معدنی در محیط جامد اندازه‌گیری توان حل فسفات معدنی در محیط جامد مطابق روش Rashid *et al.* (2004) انجام شد. برای تشخیص نیمه کمی توان حل فسفات، ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری با روش قطره‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط جامد PVK که حاوی ۵ گرم تری‌کلسیم فسفات به‌عنوان تنها منبع فسفر بود، کشت داده شد. برای ارزیابی میزان نسبی انحلال فسفات، نسبت قطر کل (هاله و کلنی) بر قطر کلنی در سه نوبت به فواصل ۴، ۶ و ۸ روز تعیین شد. ظهور هاله شفاف در پیرامون کلنی باکتری به‌عنوان نشانه حل فسفات در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری توان حل فسفات در محیط مایع

توان حل فسفات جدایه‌ها با استفاده از روش Jeon *et al.* (2003) که از محیط مایع PVK که حاوی ۵ گرم تری‌کلسیم فسفات استفاده شده بود، اندازه‌گیری شد و مقدار فسفر آزاد شده توسط هر جدایه براساس میزان جذب نور مربوط به آن با استفاده از منحنی استاندارد تهیه‌شده از KH_2PO_4 و از فرمول $Y=0.0873 X-0.0124$ محاسبه شد.

بررسی توان تولید سیدروفور با استفاده از روش طیف‌سنجی

این آزمون با استفاده از روش Castaneola *et al.* (2005)

با نوار پارافیلیم بسته شد. در پتری شاهد از آب مقطر سترون به‌جای باکتری استفاده شد و تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. اندازه‌گیری قدرت بازدارندگی متابولیت‌های فرار باکتری‌ها، با مقایسه میزان رشد نمونه‌ها با میزان رشد شاهد قارچی بدون باکتری سنجیده شد.

$$= \text{درصد بازداری از رشد بیمارگر} \\ \times 100 = \frac{\text{قطر رشد میسلیم هر تیمار} - \text{قطر رشد میسلیم شاهد}}{\text{قطر رشد میسلیم شاهد}}$$

بررسی برخی از مکانیسم‌های بیوکنترلی باکتری *P. fluorescens*

بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها

توان تولید اکسین جدایه‌های باکتری با استفاده از روش پاتن و گلیک انجام شد (Patten and Glick 2002). به‌منظور بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها، ابتدا، باکتری‌ها در محیط TSB (دکستروز ۲/۵ گرم، K_2HPO_4 ۲/۵ گرم، کلرید سدیم ۵ گرم، پپتون ۳ گرم و تریپتون ۱۷ گرم) به‌مدت ۴۸ ساعت، کشت داده شدند. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هریک از جدایه‌های باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط DF منتقل شد که حاوی صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ال-تریپتوفان، پیش‌ماده تولید اکسین بود. بعد از ۴۸ ساعت، انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. ۱ میلی‌لیتر از محلول بالایی با ۴ میلی‌لیتر معرف سالکووسکی مخلوط شد. پس از ۲۰ دقیقه، با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور آن در ۵۳۵ نانومتر خوانده شد. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه‌شده با غلظت‌های صفر (به‌عنوان بلنک)، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید و از فرمول $Y=0.1147X-0.099$ محاسبه شد.

بررسی توان تولید آنزیم ACC د - آمیناز

آزمون توان تولید آنزیم ACC د - آمیناز به روش Amico *et al.* (2005) با کمی تغییرات انجام شد. به‌منظور بررسی توان جدایه‌های مورد مطالعه در استفاده از ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن که می‌تواند نشانه تولید آنزیم ACC د - آمیناز توسط باکتری باشد، جدایه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت، در

ابتدا، برای کشت یک سوم گلدان‌ها با خاک استریل و سپس، دو سوم بقیه با خاک حاوی اینوکولوم (۳ گرم اینوکولوم به ازای ۱ کیلوگرم خاک) پر شد. ابتدا، بذور پنبه با اسید سولفوریک ۱ نرمال کرک‌زدایی شدند و سپس، با هیپوکلرید سدیم ۵ درصد به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و ۳ مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند. سپس، به بذور سوسپانسیون باکتری (با جمعیت 10^8 سلول باکتری در ۱ میلی‌لیتر) تلقیح شدند. در هر گلدان ۴ عدد بذر پنبه رقم ورامین، کشت شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۷ تیمار شامل کنترل مثبت (بدون *R. solani*) و دارای باکتری آنتاگونیست) و منفی (دارای *R. solani*) و بدون باکتری آنتاگونیست)، ۴ جدایه کارآمد 137، 139، 108 و 73 از لحاظ مکانیسم‌های بررسی و یک جدایه 159 برای مقایسه انجام شد.

بوته‌های کاملاً سالم = صفر درصد
گیاهان با تغییر رنگ آوندی با لکه‌های ظریف در ساقه = ۲۵-۰ درصد
گیاه با علائم خیلی کم پژمردگی و لکه‌های ظریف در ساقه = ۵۰-۲۵ درصد

پژمردگی و شانکر در ناحیه طوقه و ساقه = ۷۵-۵۰
گیاهچه‌های آلوده‌ای که بوته‌ها کوتوله و جوانه‌زنی کامل نیست = ۷۵-۱۰۰

پس از یک ماه، فاکتورهای رشدی گیاه از قبیل: درصد جوانه‌زنی بذر و تعداد لکه‌های ناحیه طوقه، طول ریشه، طول ساقه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن ($P < 0.01$) انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی قدرت بازداری از رشد *R. solani* با جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه
این آزمون در پژوهش‌های بسیاری به‌عنوان روشی برای غربال عوامل آنتاگونیست موفق به‌کار گرفته شده است

انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری در ۴۰ میلی‌لیتر محیط مایع سوکسینات در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و به مدت ۴۰ ساعت در انکوباتور شیکر با ۱۲۰ rpm رشد داده شدند، سلول‌های باکتری با سانتریفیوژکردن در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد.

ردیابی ژن *phlD* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز آغازگرهای *phl2a* و *phl2b* برای تکثیر قطعه ۷۴۵ جفت بازی ژن *phlD* استفاده شدند (Shirzad et al. 2009).

ردیف بازهای آغازگرها به قرار زیر بود:

phl2a: 5'-GAG GAG GTC GAA GAC CAC CA-3'
phl2b: 5'-ACC GCA GCA TCG TGT ATG AG-3'

استخراج DNA باکتری‌ها براساس روش Wang et al. (2001) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای ژن *PhlD* در حجم واکنش ۲۰ میکرولیتر و مخلوط واکنش با ترکیب ۲/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱۰۰ میکرومول از مخلوط نوکلئوتیدهای dNTP و ۱/۵ واحد DNA پلی‌مراز *Taq* و در 1X بافر PCR انجام شد.

برنامه حرارتی PCR مطابق برنامه پیشنهادی Shirzad et al. (2009) با اندکی تغییرات شامل یک مرحله واسرشته‌شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس، یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای با هر چرخه شامل ۴۵ ثانیه دمای ۹۲ درجه سلسیوس، ۳۵ ثانیه دمای ۵۵ درجه سلسیوس و ۴۵ ثانیه دمای ۷۲ درجه سلسیوس و یک بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد در ولتاژ ۸۰ به مدت ۴۵ دقیقه در بافر TAE (1X) الکتروفورز (به ابعاد ۳۰×۱۷) شد. برای تخمین اندازه فرآورده تکثیرشده از نشانگر ژنومی ۱ کیلو جفت بازی، شرکت Fermentas، استفاده شد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

بررسی توانایی باکتری‌ها در کنترل بیمارگر *R. solani* AG-4 در شرایط گلخانه
اینوکولوم قارچ به روش Pal et al. (2001) تهیه شد.

(جدول ۱). میزان بازدارندگی از رشد *R. solani* با متابولیت‌های فرار جدایه‌ها نشان داد که اثر جدایه‌های باکتری در کنترل رشد بیمارگر با متابولیت‌های فرار نیز در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده است. بیشترین بازدارندگی در درجه اول مربوط به جدایه‌های 8B و 34B با میزان ۱۰۰ درصد و در درجه دوم مربوط به جدایه‌های 108، 73، 137، 139 و F23 بود (جدول ۱).

(Tjamos et al. 2004). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر جدایه‌های باکتری در بازداری از رشد بیمارگر در کشت متقابل در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده است. بیشترین بازدارندگی مربوط به جدایه‌های 108، 139، 58B، 30B، 45، F68، 34B، 137، 73، F23 و 129 و کمترین بازدارندگی مربوط به جدایه‌های F33 و 125 بود که هیچ بازدارندگی از خود نشان ندادند

جدول ۱. مقایسه میانگین اثر جدایه‌های باکتری در بازداری از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

جدایه	میزان بازدارندگی در کشت متقابل	میزان بازدارندگی در متابولیت‌های فرار	جدایه	میزان بازدارندگی در کشت متقابل	میزان بازدارندگی در متابولیت‌های فرار
73	۶۲/۸۶a	۵۲/۸۲b	F70	۲۶bcde	۱۸/۱۸cd
137	۶۰a	۵۱/۹۱b	CHA0	۲۵/۹bcde	۲۱/۸۱cd
34B	۵۸/۳۹a	۱۰۰a	F5	۲۵bcdef	۹/۰۹cde
139	۵۵/۸۴a	۲۱/۱۱cd	41A	۱۸/۵cdef	۲۳/۸۳cd
108	۵۳/۵۷a	۴۷/۱۶b	159	۱۶/۲۳def	۰e
129	۵۳/۸۳a	۲۰/۲cd	103	۱۲/۱۴def	۷/۲۷de
F23	۵۳/۳۳a	۳۹/۱۸b	46	۸/۸۳def	۰e
F68	۵۰ab	۰e	153	۸/۸۳def	۰e
45	۴۸/۴۴ab	۱۷/۰۶cd	33	۸/۸۱def	۱۳/۸۳cde
30B	۴۶/۴۳ab	۱۱/۸۱cde	173	۴/۲۹def	۱۶/۶۶cde
58A	۴۲/۲۲abc	۰e	125	۰f	۲۴/۷۴c
133	۲۸/۷۵bcd	۲۳/۳۳cd	135	۲/۸۶ef	۱۱/۱۱cde
8B	۲۶/۵۱bcde	۱۰۰a	F33	۰f	۱۹/۲۹cd

مقایسه میانگین با روش دانکن انجام شد و حروف مشابه در هر ستون، بیانگر نداشتن اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است.

جدول ۲. تجزیه واریانس تأثیرات باکتری‌ها روی خصوصیات مختلف تحریک‌گندگی رشد گیاه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
حلالیت فسفر (جامد)		۴۸h ۹۶h ۱۴۴h
باکتری	۲۰	۰/۲۷** ۰/۲۶** ۰/۲۱**
اشتباه آزمایش	۲۱	۰/۰۰۱ ۰/۰۰۱ ۰/۰۰۱
حلالیت فسفر (مایع)		
باکتری	۲۰	۱۶/۱۸**
اشتباه آزمایش	۲۱	۱/۶۶
تولید اکسین	۱	۱۱/۶۷**
پلوک		
غلظت	۳	۳۳/۶۱**
باکتری	۲۰	۳/۵۱**
غلظت × باکتری		۱/۵۱ ^{ns}
اشتباه آزمایش		۱/۳
تولید سیدروفور		
باکتری	۲۰	۰/۷۱**
اشتباه آزمایش	۲۱	۰/۰۲۸

***، ** و ns به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و بدون معنی است.

جدول ۳. بررسی فعالیت تحریک‌کنندگی رشد جدایه‌های مختلف باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens*

جدایه	میزان اکسین (mg/L)	سیدروفور (جذب نور)	حلالیت فسفر (mg/L)	pH	(نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) 48h ^۲	(نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) 72h	(نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) 144h
CAH0	۱/ef	۱/۵۸abc	۱۲/۸۵ab	۴/۹۹	۱/۲۲h	۱/۳۳e	۱/۵d
33	۲/۹۷a	۱/۸۸a	۱۴/۲۳a	۴/۳	۱/۱۴j	۱/۲۵z	۱/۱۳k
137	۲/۶۷abc	۰/۹۹fg	۱۱/۵۹ab	۴/۸۷	۱/۴۴C	۱/۶۶a	۱/۶۶b
135	۲/۱۱ab	۰/۴۲hijk	۱۱/۳ab	۵/۲	۱/۳f	۱/۵c	۱/۵b
139	۲/۸۷ab	۱/۴۷bcd	۱۴/۰۶ab	۴/۸	۱m	۱l	۱/۱l
108	۲/۴۶abcd	۰/۳۴hijk	۱۱/۹ab	۴/۹	۱/۱k	۱/۳f	۱/۳g
73	۲/۲۶abcde	۱/۱۹def	۱۲/۰۵ab	۵/۱۳	۱/۳۳e	۱/۶۶a	۱/۶۶b
129	۲/۴۳abcd	۰/۷۲gh	۱۱/۹ab	۵/۰۱	۱/۲i	۱/۵c	۱/۵d
125	۱/۸abcdef	۱/۶۸abc	۱۲/۴۸ab	۴/۹	۱m	۱/۲i	۱/۲j
173	۱/۱۵def	۰/۴۷hij	۱۳/۱۷ab	۴/۶۶	۱/۴d	۱/۶b	۱/۶c
159	۱/۱۸bcdef	۰/۷۳gh	۱۲/۶۸ab	۵	۱/۲i	۱/۵c	۱/۵d
153	۱/۸۱bcdef	۰/۳۱jkl	۱۲/۲۵ab	۵/۰۶	۱/۶۶a	۱/۶۶a	۱/۶۶b
45	۲/۳۹abcd	۰/۹۵fg	۱۲/۳۹ab	۵/۲	۱/۱۴j	۱/۴۳d	۱/۴۲e
58A	۱/۸۵bcdef	۱/۰۷efg	۱۲/۹۷ab	۴/۶۹	۱/۲۵g	۱/۳۳e	۱/۳۳f
41A	۱/۶۲cdef	۰/۲۹ijk	۱۲/۲۸ab	۵/۰۱	۱M	۱/۲۸g	۱/۲۸l
8B	۱/۴۲def	۰/۳۷hijk	۱۱/۲۱ab	۵/۰۶	۱m	۱/۲۵h	۱/۲۵i
30B	۰/۷۲f	۰/۱۲ijk	۱۳/۴۶ab	۴/۸۷	۱/۵b	۱/۶b	۱/۸a
34B	۰/۹۱f	۰/۰۶k	۱۲/۸ab	۴/۶	۱/۱۱k	۱/۲i	۱/۲j
F23	۱/۰۸ef	۱/۳۸cde	۱۱/۵ab	۴/۹	۱m	۱/۲۵h	۱/۲۵i
F82	۱/۱۴ef	۰/۲۶ijk	۱۱/۰۱ab	۵/۳	۱/۰۶l	۱/۰۶k	۱/۰۶m

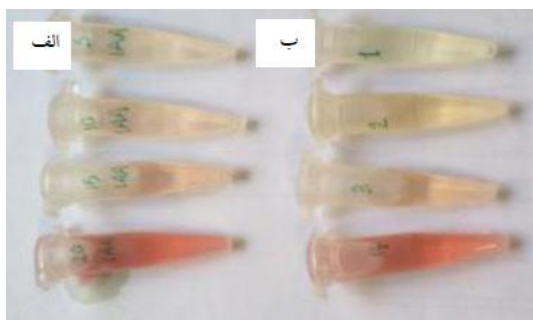
۱. میزان تغییر pH در محیط مایع PVK اندازه‌گیری شد، برای اینکه همبستگی میان حلالیت فسفر و تغییر pH محیط نشان داده شود. ۲. میزان حلالیت فسفر در محیط جامد PVK در سه نوبت اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین با روش دانکن انجام شد و حروف مشابه در هر ستون، بیانگر نداشتن اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است.

جدول ۴. مقایسه میانگین تولید اکسین در غلظت‌های

مختلف ال - تریپتوفان

غلظت ال - تریپتوفان	میزان اکسین (mg/L)
غلظت 0 mg/L	۱/۱۱b
غلظت 50 mg/L	۱/۲۳b
غلظت 100 mg/L	۱/۳۳b
غلظت 200 mg/L	۲/۷۷a

حروف مشابه بیانگر نداشتن اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است.



شکل ۱. الف) استانداردهای اکسین ب) تولید اکسین جدایه 33

میزان اکسین تولیدشده با جدایه‌ها

طبق تجزیه واریانس داده‌ها اثر جدایه‌های باکتری و غلظت ال - تریپتوفان در تولید اکسین در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده است؛ در حالی که، اثر متقابل جدایه‌های باکتری و غلظت ال - تریپتوفان در تولید اکسین معنی‌دار نبوده است (جدول ۲). نتایج مقایسه میانگین تولید اکسین در ۲۰ جدایه باکتری نشان داد که بین جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان تولید اکسین نزدیک به ۳ میلی‌گرم در لیتر و مربوط به جدایه‌های 33، 108، 137 و 139 است (جدول ۳). همچنین، تولید اکسین در غلظت‌های مختلف ال - تریپتوفان به غیر از غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش معنی‌داری نشان نداد (شکل ۱ و جدول ۴). تولید غلظت بالای اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت یک خصوصیت بارز برای بیشتر این باکتری‌هاست (Ahmad et al. 2008).

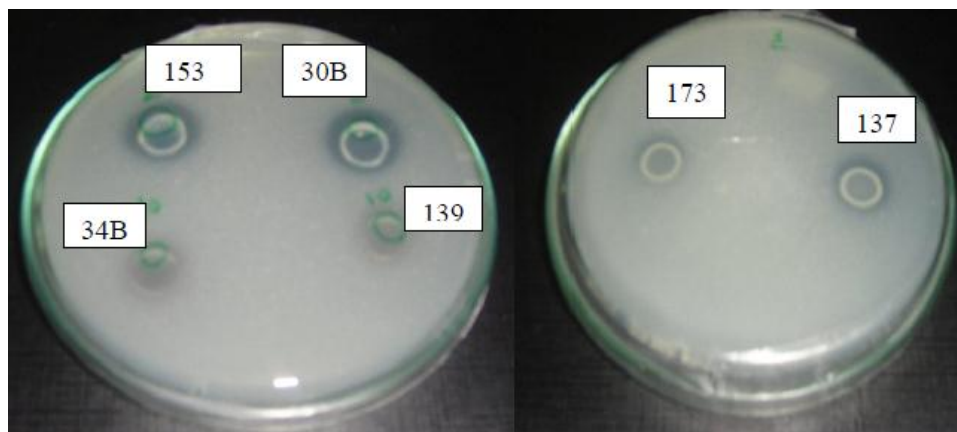
توانایی انحلال فسفر جدایه‌ها

میزان انحلال فسفر جدایه‌ها در محیط مایع PVK

انحلال فسفر توسط باکتری‌های ریزوسفر باعث افزایش فسفر قابل دسترس گیاه می‌شود و از این طریق اثر مثبت روی رشد و عملکرد گیاه می‌گذارند. نتایج این بررسی نشان داد که بین جدایه‌ها از لحاظ قابلیت انحلال تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، ولی با این حال، بیشترین میزان انحلال مربوط به جدایه‌های 33 و 139 با میزان 14 mg/L پس از 5 روز است (جدول ۳). گزارش‌هایی وجود دارد که همبستگی میان انحلال فسفر و کاهش pH را نشان داده است (Abbas-Zadeh et al. 2010). این نتایج مطابق با نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش است که جدایه‌های 33 و 139 با بیشترین انحلال pH را به ترتیب از 6/3 به 4/3 و 4/8 کاهش داده است؛ در حالی که، جدایه F82 با کمترین حلالیت pH را از 6/3 به 5/3 کاهش داده است. توان باکتری‌های خاکزی به‌ویژه *P. fluorescens* در افزایش انحلال فسفات‌های نامحلول به فراوانی گزارش شده است (Tao et al. 2008) و تحقیقات متعددی تأثیر مثبت باکتری‌های حل‌کننده فسفات را بر عملکرد محصولات مختلف نشان

داده است (Hilali et al. 2000) سودوموناس‌ها با ترشح اسیدهای آلی و فسفاتاز فسفات نامحلول در خاک را حل و تولید فسفات محلول می‌کنند که قابل دسترس برای گیاه است و در نتیجه باعث افزایش رشد گیاه می‌شود (Dey et al. 2004).

میزان انحلال فسفر جدایه‌ها در محیط جامد PVK با مشاهده هاله شفاف در اطراف کلنی جدایه‌های باکتری می‌توان به توانایی آن‌ها در انحلال فسفر پی برد. میزان توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفر با نسبت قطر هاله شفاف به قطر رشد کلنی سنجیده شد. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیرات جدایه‌ها روی انحلال فسفات در سطح 1 درصد معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین انحلال فسفر جدایه‌ها نشان داد، تفاوت معنی‌داری در توانایی انحلال جدایه‌ها وجود دارد. نتایج نشان داد حداکثر توانایی در 48 ساعت اولیه مربوط به جدایه 153، در 96 ساعت بعدی مربوط به جدایه‌های 137، 153 و 73 و همچنین، در 144 ساعت نهایی مربوط به جدایه 30B بود. کمترین توانایی در میان جدایه‌های مورد بررسی مربوط به جدایه 139 بود (شکل ۲ و جدول ۳).



شکل ۲. میزان تولید آنزیم فسفاتاز با جدایه‌های باکتری در محیط جامد PVK حاوی تری کلسیم فسفات

جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق توانایی تولید سیدروفور را داشتند؛ ولی جدایه‌ها از لحاظ تولید سیدروفور تفاوت معنی‌داری نشان دادند که بیشترین میزان تولید مربوط به جدایه‌های 33، F33، 125، CHA0 و F70 و کمترین میزان مربوط به جدایه 34B بود (جدول ۳). باکتری‌های PGPR در شرایط کمبود

میزان سیدروفور پایوردین تولیدشده با جدایه‌ها

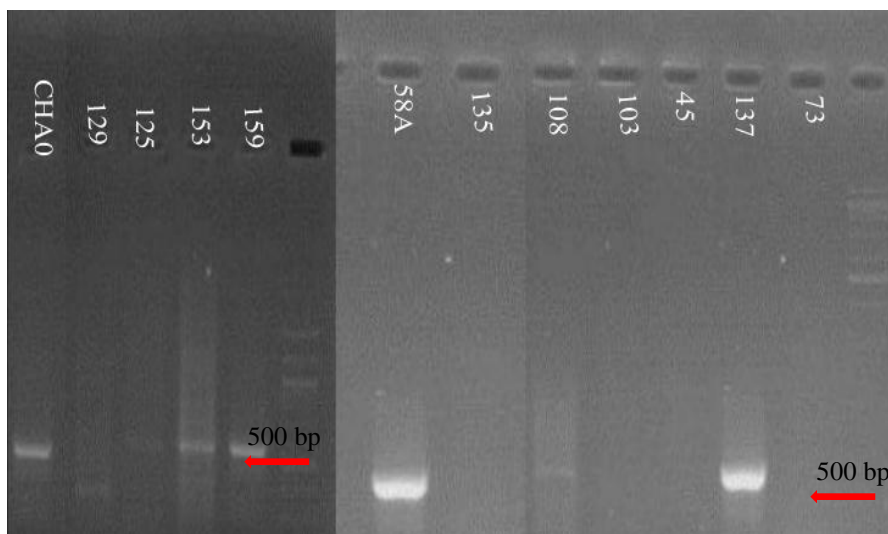
یکی دیگر از مکانیسم‌های باکتری‌های PGPR برای تحریک رشد گیاه، رقابت بر سر آهن با تولید ترکیب سیدروفور است. سیدروفور نوع پایوردین، مهم‌ترین و عمومی‌ترین نوع سیدروفور تولیدشده توسط باکتری‌های *P. fluorescens* است (Sharifi et al. 1387). همه

سویه‌های خاصی از *P. fluorescens* می‌توانند متابولیت‌های بازدارندهٔ بیمارگرهای گیاهی خاکزی را تولید و رهاسازی کنند (Thomashow *et al.* 2002). یکی از این متابولیت‌ها آنتی‌بیوتیک DAPG است که توسط بیشتر سودوموناس‌های فلورسنت تولید می‌شود (Weller 1988) که یک ترکیب فنلی با طیف اثر وسیع ضد قارچی، ضد باکتری، ضد ویروسی، ضد نماتدی و ضد کرمی است (Thomashow and Weller 1995). سودوموناس‌های فلورسنت تولیدکنندهٔ آنتی‌بیوتیک 2,4DAPG گروه مهمی از PGPRها هستند که بسیاری از بیماری‌های ریشه و گیاهچه و پژمردگی را در گیاهان کنترل می‌کنند (Weller 1988) و در کنترل طبیعی پاختورهٔ گندم نقش کلیدی ایفا می‌کنند (Weller *et al.* 1993).

آهن با تولید این ترکیب، آهن موجود در ریزوسفر را از دسترس عوامل بیمارگر خارج و همچنین، آن را برای گیاه مهیا می‌کند و از این طریق باعث بهبود رشد گیاه و حفاظت از آن در برابر بیمارگرها می‌شوند. Sharifi *et al.* (2008) نشان دادند که افزودن کلات آهن باعث کاهش توان بیوکنترلی باکتری‌های *P. fluorescens* می‌شود. کلات‌های آهن با فراهم آوردن آهن قابل جذب برای باکتری، مانع تولید سیدروفور توسط آن می‌شود (Lemanceau *et al.* 2006).

ردیابی ژن *phlD* در جدایه‌ها

در این پژوهش ردیابی ژن *phlD* انجام شد که در سنتز این آنتی‌بیوتیک نقش دارد و مشخص شد ۵ جدایهٔ 137، 159، 58A، 139 و 58A واجد این ژن بودند (شکل ۳).



شکل ۳. قطعهٔ ۷۴۵ جفت بازی ژن *phlD* مسئول سنتز DAPG که توسط آغازگرهای *phlA* و *phlB* تکثیر شده است

باکتری‌های حاوی آنزیم ACC د - آمیناز سطح اتیلن را در گیاه از طریق تجزیهٔ ACC (پیش‌مادهٔ تولید اتیلن) تنظیم می‌کنند (Saleem *et al.* 2007). همچنین، سنتز اتیلن گیاه در حضور بیمارگرها افزایش می‌یابد که چندین گزارش وجود دارد که از فرضیهٔ اثر آنتاگونیستی آنزیم ACC د - آمیناز علیه باکتری‌های پاتوژن حمایت می‌کند (Bashan 1994). یوان و همکاران گزارش کردند که جدایه‌ای از باکتری حاوی آنزیم ACC د - آمیناز فعالیت آنتاگونیستی قوی علیه پاتوژن *Fusarium oxysporum* دارد (Saleem *et al.* 2007). Wang *et al.*

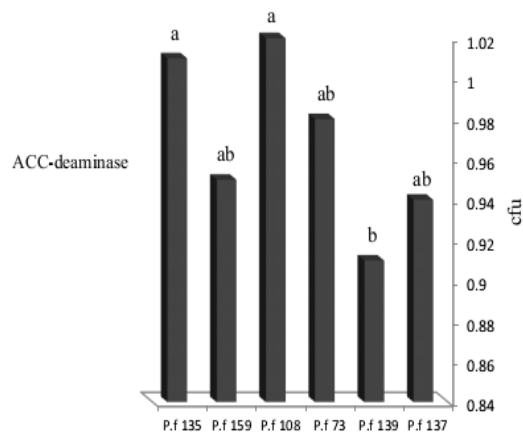
میزان آنزیم ACC د - آمیناز تولیدشده توسط جدایه‌ها با سنجش نسبت رشد باکتری در محیط حاوی ACC (به‌عنوان منبع نیتروژن) به رشد باکتری در محیط شاهد مثبت (حاوی آمونیوم) مشاهده شد همهٔ جدایه‌ها توانایی تولید آنزیم ACC د - آمیناز را داشتند و در میان جدایه‌ها از لحاظ تولید این آنزیم تفاوت معنی‌داری وجود دارد که در میان آن‌ها جدایهٔ 108 بیشترین توان استفاده از ACC را داشت (شکل ۴). گیاهان در شرایط استرس میزان زیادی هورمون اتیلن تولید می‌کنند که اثر منفی روی رشد گیاه دارد. در چنین شرایطی



شکل ۵. اثبات بیماریزایی *R. solani* روی گیاه پنبه (تأثیر در جوانه‌زنی بذور و ایجاد زخم در ناحیه طوقه)

با توجه به نتایج آزمایشگاهی از لحاظ مکانیسم‌های مورد بررسی و قدرت کنترل‌کنندگی در شرایط آزمایشگاه، جدایه‌های 73، 108، 137، 139 و 159 به‌عنوان جدایه‌های کارآمد برای کارهای گلخانه‌ای انتخاب شدند. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تأثیر جدایه‌ها در کنترل بیماری در سطح ۱ درصد معنی‌دار بوده است. نتایج نشان می‌دهد بیشترین درصد کنترل‌کنندگی مربوط به جدایه 137 است که تنها ۱۵ درصد بذور دچار گیاهچه‌میری شدند و گیاهان زنده دچار زخم در ناحیه طوقه نشدند (شکل ۶ و جدول ۵). این جدایه $PhlD^+$ بود، همچنین، دارای آنزیم ACC د - آمیناز بود، بنابراین، به نظر می‌رسد که آنزیم ACC د - آمیناز از طریق کاهش تولید اتیلن و کمک به گیاه در شرایط تنش‌ها باعث بهبود رشد گیاه و احتمالاً باعث مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماریزای شود، همچنین، به نظر می‌رسد احتمالاً آنتی‌بیوتیک DAPG تولید شده و در کنترل نقش داشته است. کمترین میزان بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مربوط به جدایه 159 است که ۳۵ درصد جدایه‌ها دچار گیاهچه‌میری شده است. هرچند میان جدایه 159 و جدایه‌های 73 و 108 از لحاظ درصد جوانه‌زنی در شرایط گلخانه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، گیاهان جوانه‌زده که با آنتاگونیست 159 تیمار شده بودند، در ناحیه طوقه و ساقه دچار زخم شده بودند؛ در حالی که، جدایه 159 دارای ژن *phlD* بوده است (جدول

(2001) گزارش کردند که *Pseudomonas putida* استرین UW4 که با ژن آنزیم ACC د - آمیناز کلون شده است، در بیوکنترل *Pythium ultimum* مؤثر است؛ در حالی که، گونه وحشی آن مؤثر نیست. اندوفیت *Burkholderia* spp. که حاوی آنزیم ACC د - آمیناز است، فعالیت آنتاگونیستی علیه *R. solani* و *Sclerotinia sclerotium* نشان داد (Pandey et al. 2005). باکتری *Pseudomonas brassicacearum* که حاوی آنزیم ACC د - آمیناز است، در جمعیت پایین، رشد گیاه گوجه‌فرنگی را از طریق شکستن خواص پاتوژن‌های گیاهی بهبود می‌بخشد (Belimov et al. 2007). این تأثیر آنزیم ACC د - آمیناز در باکتری‌های PGPR متعددی از قبیل *Azospirillum lipoferum*، *Burkholderia*، *Bacillus*، *Aclaligenes*، *Methylobacterium*، *Agrobacterium genomovars*، *Entrobacter*، *Pseudomonas fujisawaense* و *Ralstonia solanacearum*، *Rhizobium*، *Rhodococcus* گزارش شده است (Belimov et al. 2005).



شکل ۴. مقایسه میزان ACC د - آمیناز تولیدشده توسط جدایه‌های باکتری

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

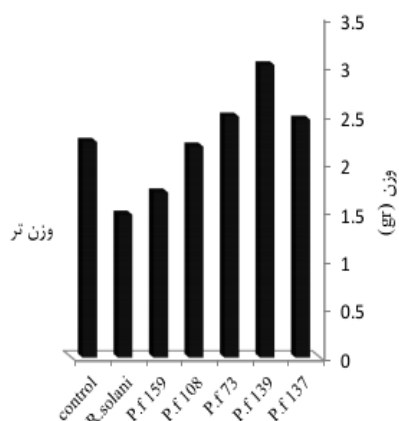
بررسی تأثیر جدایه‌ها در کنترل *R. solani* در شرایط گلخانه نتایج آزمون اثبات بیماریزایی نشان داد که جدایه AG-4 *R. solani* در گیاه پنبه باعث بیماریزایی می‌شود (شکل ۵).

مایه‌زنی‌شده با جدایه‌های 137 و 73 بیشتر از گیاهان مایه‌زنی‌شده با سایر جدایه‌ها بود، اما در مورد طول ساقه گیاه جدایه‌های 73 و 108 تأثیر بیشتری داشتند، ولی ریشه هر دو جدایه گسترش زیادی داشتند. پژوهش‌ها نشان داده است که جدایه‌هایی که اکسین بیشتری تولید می‌کنند، به‌مراتب تأثیر مثبت زیادی در مورفولوژی ریشه و در نتیجه میزان رشد گیاه نسبت به جدایه‌هایی دارند که اکسین تولید نمی‌کنند یا اکسین کمتری تولید می‌کنند (Khakpour et al. 2008).

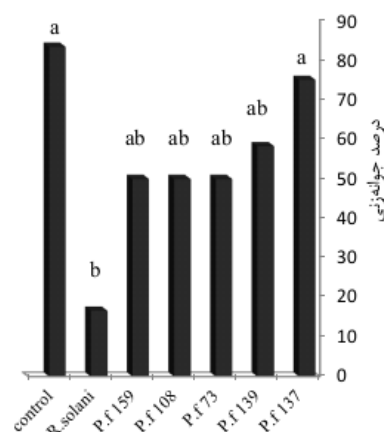
۵. طبق نتایج Shirzad et al. (2012) استرین 41A دارای ژن *phlD* است؛ در حالی که، تولید آنتی‌بیوتیک در این جدایه ناچیز بود. نتایج ما نیز نشان داد استرین 159 که واجد این ژن بود، ولی کنترل‌کنندگی ناچیزی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه دارد که احتمالاً می‌تواند حاکی از تولید ناچیز آنتی‌بیوتیک باشد. نتایج به‌دست‌آمده از آزمایش‌های گلخانه‌ای نیز نشان داد که جدایه‌های باکتریایی اثر معنی‌داری در افزایش رشد گیاه در مقایسه با تیمار شاهد داشتند (شکل‌های ۷، ۸ و ۹). طول ریشه گیاهان

جدول ۵. مقایسه میانگین درصد آلودگی ریزوکتونیایی پنبه

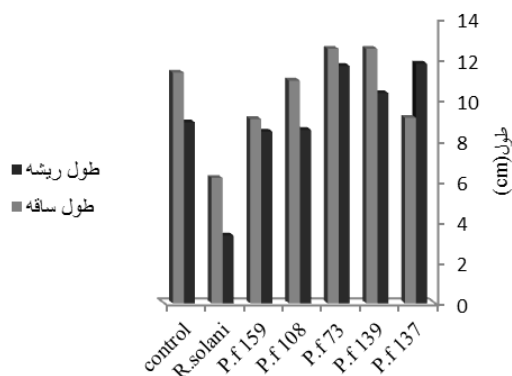
آلودگی بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد	آلودگی بین ۵۰ تا ۷۵ درصد	آلودگی بین ۲۵ تا ۵۰ درصد	آلودگی بین ۰ تا ۲۵ درصد	بدون آلودگی
شاهد منفی	۱۵۹	۷۳	۱۳۷	شاهد مثبت
۱۶/۶۶	۵۰	۵۰	۷۵-۵۰	۸۳/۳۳



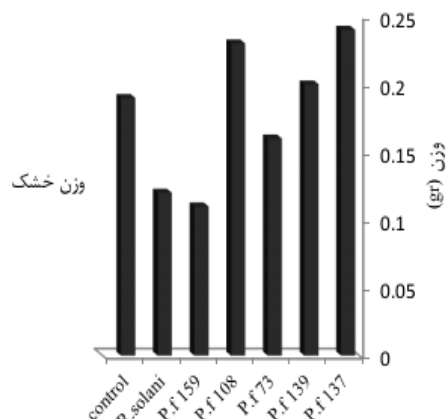
شکل ۸. تأثیر جدایه‌ها بر وزن تر گیاه در حضور بیمارگر (کنترل بدون بیمارگر و آنتاگونیست است)



شکل ۶. تأثیر جدایه‌ها بر درصد جوانه‌زنی بدون پنبه



شکل ۹. تأثیر جدایه‌ها بر طول ریشه و ساقه گیاه پنبه در حضور بیمارگر (کنترل بدون بیمارگر و آنتاگونیست است)



شکل ۷. تأثیر جدایه‌ها بر وزن خشک گیاه در حضور بیمارگر (کنترل بدون بیمارگر و آنتاگونیست است)

جدول ۶. درصد همبستگی میزان کنترل‌کنندگی و صفات رشد گیاه پنبه

وزن خشک	وزن تر	طول ریشه	طول ساقه	کنترل‌کنندگی	درصد جوانه‌زنی	ACC	pH	(نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) ۱۴۴h	(نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) ۷۲h	(نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) ۴۸h	حلالیت فسفر (mg/L)	سیدروفور (جذب نور)	میزان اکسین (mg/L)
۰/۸۷۲**	۰/۸۶۴**	۰/۴۵۶ ^{ns}	۰/۵۵۸*	۰/۷۱۸**	۰/۵۴۸*	۰/۱۵۷ ^{ns}	۰/۵۵۹ ^{ns}	۰/۲۷۷ ^{ns}	۰/۳۲۸ ^{ns}	۰/۰۵۳ ^{ns}	۰/۰۷۳ ^{ns}	۰/۳۸۹ ^{ns}	۱ (mg/L) میزان اکسین
-۰/۰۷۴ ^{ns}	۰/۷۶۲*	۰/۵۱۴*	۰/۶۷۳*	۰/۳۵۸ ^{ns}	۰/۲۹۴ ^{ns}	۰/۷۷۸*	۰/۰۸۵ ^{ns}	۰/۰۵۵ ^{ns}	۰/۱۹۷ ^{ns}	۰/۰۰۶ ^{ns}	۰/۵۸۴*	۱	- سیدروفور (جذب نور)
-۰/۲۶۳ ^{ns}	۰/۴۶۵ ^{ns}	۰/۴۵۱ ^{ns}	۰/۱۸۹ ^{ns}	۰/۳۲۶ ^{ns}	۰/۱۹۴ ^{ns}	۰/۶۵۰ ^{ns}	۰/۴۰۸ ^{ns}	۰/۰۷۴۶ ^{ns}	۰/۰۸۱۶ ^{ns}	۰/۷۶۳ ^{ns}	۱	-	(mg/L) حلالیت فسفر
۰/۰۵۹ ^{ns}	۰/۲۲۰ ^{ns}	۰/۴۴۹ ^{ns}	۰/۶۲۵*	۰/۰۸۱ ^{ns}	۰/۵۰۶*	۰/۰۶۱ ^{ns}	۰/۴۴۳ ^{ns}	۰/۹۶۱**	۰/۹۳۹**	۱	-	-	- نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) ۴۸h
-۰/۱۷۸ ^{ns}	۰/۴۷۲ ^{ns}	۰/۴۵۴ ^{ns}	۰/۴۰۵ ^{ns}	۰/۲۲۶ ^{ns}	۰/۱۹۵ ^{ns}	۰/۲۷۸ ^{ns}	۰/۶۷۸*	۰/۹۸۹**	۱	-	-	-	- (نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) ۷۲h
-۰/۱۸۱ ^{ns}	۰/۳۷۰ ^{ns}	۰/۴۰۵ ^{ns}	۰/۵۱۳*	۰/۲۷۷ ^{ns}	۰/۲۶۲ ^{ns}	۰/۱۵۷ ^{ns}	۰/۶۶۱*	۱	-	-	-	-	- (نسبت قطر هاله بر قطر کلنی) ۱۴۴h
-۰/۶۱۹ ^{ns}	۰/۴۳۴ ^{ns}	۰/۱۰۶ ^{ns}	۰/۱۳۳ ^{ns}	۰/۵۶۷*	۰/۵۲۳ ^{ns}	۰/۴۲۹ ^{ns}	۱	-	-	-	-	-	- pH
۰/۱۲۳ ^{ns}	۰/۴۵۸ ^{ns}	۰/۰۳۰ ^{ns}	۰/۳۳۹ ^{ns}	۰/۳۷۸ ^{ns}	۰/۵۰۴ ^{ns}	۱	-	-	-	-	-	-	- ACC
-۰/۶۰۱ ^{ns}	۰/۳۶۵ ^{ns}	۰/۳۸۷ ^{ns}	۰/۵۹۹*	۰/۳۶۴ ^{ns}	۱	-	-	-	-	-	-	-	- درصد جوانه‌زنی
-۰/۹۴۴ ^{ns}	۰/۳۰۱ ^{ns}	۰/۰۳۶ ^{ns}	۰/۰۲۶ ^{ns}	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	- کنترل‌کنندگی
۰/۳۱۴ ^{ns}	۰/۶۰۶*	۰/۲۶۱ ^{ns}	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- طول ساقه
۰/۰۷۴ ^{ns}	۰/۶۹۷*	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- طول ریشه
۰/۵۱۳*	۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- وزن تر
۱	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- وزن خشک

***، ** و ns به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و بدون معنی است.

نتیجه‌گیری کلی

تحقیقات این پژوهش نشان می‌دهد که باکتری‌های ناحیه ریزوسفر با مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم باعث کاهش خسارت بیمارگر می‌شوند. جدایه‌های 137 و 139 که از لحاظ صفات تحریک‌کنندگی، جدایه‌های کارآمد بودند و همچنین، دارای ژن *phlD* بودند، بیشترین میزان

کنترل‌کنندگی را داشتند؛ ولی جدایه‌های 108 و 73 نیز توانستند بیماری را کنترل کنند با اینکه ژن *phlD* را نداشتند که احتمال این است که ACC د - آمیناز تولیدشده از طریق بهبود رشد گیاه باعث مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماریزا شده باشد. همچنین، همه جدایه‌ها باعث افزایش صفات رشد در حضور بیمارگر شدند.

REFERENCES

- Abbas-Zadeh P, Saleh-Rastin N, Asadi-Rahmani H, Khavazi K, Soltani A, Shoary-Nejati AR, Mohammad Miransari (2010) Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. *Acta Physiologica Plantarum* 32: 281-288.
- Ahmad F, Ahmad I, Khan MS (2008) Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research* 163: 173-181.
- Amico ED, Cavalca L, Andreoni V (2005) Analysis of rhizobacterial communities in perennial Gramineae from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* 52: 153-162.
- Azaddysfani F, Rohani H, Falahati Rastgar M, Mehdikhani magdom A (1390) Cotton immune responses to *Trichoderma* species and its effect on the control of damping off caused by *Rhizoctonia solani*. *Plant Protection* 27: 1-10. (in Persian)
- Bashan Y (1994) Symptom expression and ethylene production in leaf blight of cotton caused by *Alternaria macrospora* and *Alternaria alternaria* taalone and combined. *Botany* 72: 1574-1579.
- Belimov AA, Dodd IC, Safronova VI, Hontzeas N, Davies WJ (2007) *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1- aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Experimental Botany* 58(6): 1485-95.
- Belimov AA, Hotzeas N, Safronova VI, Demchinskaya SV, Piluzza G, Bullitta S, Glick BR (2005) Cadmium-tolerant plant growth- promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology and Biochemistry* 37: 241-250.

- Bhattacharyya PN, Jha DK** (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *Microbiol Biotechnology* 28: 1327-1350.
- Castaneola GC, Munoc TJJ, Videa JRP** (2005) A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strain of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Microchemical* 81: 35-40.
- Dey R, Pal KK, Bhatt DM, Chauhan SM** (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159: 371-394.
- Duijff BJ, Meijer JW, Bakker PAHM, Schippers B** (1993) Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of *Fusarium* wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Plant Pathology*. 99: 277-289.
- Fiddaman PJ, Rossall K** (1994) Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *J Applied Bacteriology* 79: 395-405.
- Glass ADM** (1989) *Plant nutrition: an introduction to current concepts*. Jones and Bartlett Publishers, Boston, p 234.
- Glick BR, Jacobson CB, Schwarze MM, Pasternak JJ** (1994) 1-Aminocyclopropane-1 carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Microbiology* 40: 911-915.
- Hagedorn C, Gould WD, Bardinelli TR** (1998) Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling Disease pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 55: 2793-2797.
- Harrison LA, Letendre L, Kovacevich P, Pierson FA, Weller DM** (1993) Purification of an antibiotic effective against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* produced by a biocontrol agent, *Pseudomonas aureofaciens*. *Soil Biog and Biochemistry* 25, 215-221.
- Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W** (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Systematic and Applied Microbiology* 28(1): 66-76.
- Hilali A, Przvost D, Broughton WJ, Antoun H** (2000) Potential use of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii as plant growth promoting rhizobacteria with wheat. Abstract, 17th North American Conference on Symbiotic Nitrogen Fixation, Laval University, Quebec, Canada.
- Hillocks RJ** (1992) *Cotton Diseases*. C. A. B. International Wallingford. UF. 415 pp.
- Howell CR, Stipanovic RD** (1979) Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology* 69: 480-482.
- Jeon JS, Lee SS, Kim HY, Ahn TS, Song HG** (2003) Plant growth promotion in soil by some inoculated microorganism. *Microbiology* 41: 271-276.
- Khakipour N, Khavazi K, Mojallali H, Pazira E, Asadirahmani H** (2008) Production of auxin hormone by fluorescent pseudomonads. *Agricultural and Environmental Science* 4: 687-692.
- Kloepper J, Lifshitz WR, Schroth MN** (1988) *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *Animal and Plant Sciences* 60-64.
- Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA** (2007) Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiology* 53(2): 159-167.
- Lemanceau P, Robin A, Mazurier S, Vansuyt G** (2006) Implication of Pyoverdines in the Interactions of Fluorescent *Pseudomonas* with Soil Microflora and Plant in the Rhizosphere. *Microbial siderophores* Pp. 165-192.
- Loper JE, Henkels MD** (1999) Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5357-5363.
- Pal KK, Tilak KVBR, Saxena AK, Dey R, Singh CS** (2001) Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 156: 209-223.
- Pandey P, Kang SC, Maheshwari DK** (2005) Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. *Current Science* 89: 170-180.
- Patten CL, Glick BR** (2002) The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3795-3801.
- Ping L, Boland W** (2004) Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in plant Science* 9: 263-266.
- Rashid MS, Khalil N, Ayub S, Alam S, Latif F** (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Biology Sciences* 7: 187-196.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C** (2009) Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* 321: 305-339.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS** (2007) Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Microbiol Biotechnology* 34: 635-648.

- Sharifi R, Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Fallahzadeh V**, (1387) Competition for Iron Uptake by Fluorescent Pseudomonads to Control of *Rhizoctonia Solani* Kuhn Causing Agent of Bean Damping-Off Disease. *Plant Protection* 22: 183-195. (in Persian)
- Shirzad A, Valizadeh Kamran R, Ahmadabadi M** (2009) Comparison of Fluorescent Pseudomonads DNA extraction methods for PCR. Sixth National Congress of Biotechnology. (in Persian)
- Shirzad A, Fallahzadeh-Mamagani V, Pazhouhandeh M** (2012) Antagonistic potential of Fluorescent pseudomonas and control of crown and root rot of cucumber caused by *Phytophthora drechsleri*. *Plant Pathology* 28(1): 1-9.
- Solymani Monfared P, Kazemi Tabar K, Tohidfar M, Ebrahimi T** (1391) Identification and cloning of the gene coding for antibiotic DAPG of Fluorescent Pseudomonads UTP-F68 gene. *J Genetic of Third Millenary* 10(1): 2649-2655. (in Persian)
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R** (2007) Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS microbiology Reviews*. pp 1-24.
- Tao G, Tian S, Cai M, Xie G** (2008) Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere* 18: 515-523.
- Tjamos EC, Tsitsigiannis DI, Tjamos SE, Antoniou, PP, Katinakis P** (2004) Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soil as biocontrol agents against *verticillium dahlia* of solanaceous hosts. *Plant Pathology* 110: 35-44.
- Thomashow LS, Bonsall RF, Weller DM** (2002) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In *Manual of Environmental Microbiology* 99: 164-6430.
- Thomashow LS, Weller DM** (1995) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control. *Plant-microbe interactions* 1: 187-235.
- Wang C, Ramette A, Punjasamarnwong P, Zala M, Natsch A, Moenne-Loccoz Y, Defago G** (2001) Cosmopolitan distribution of phlD-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 105-116.
- Weller DM** (1988) Biological control of soilborne Plant pathogens in the Rhizosphere with bacteria. *Annual review of Phytopathology* 26: 379-407.
- Weller DM, Cooke RJ** (1983) Suppression of take all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonas. *Phytopathology* 73(3): 463-4.