کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۷، شمارهٔ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۷ (۸۲-۶۵)
DOI: 10.22059/jbioc.2019.272675.254

بررسی اثر برخی باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی جداسازی‌شده از مناطق شور و خشک در کنترل *Phytophthora drechsleri* عامل بیماری گموز پسته در شرایط آزمایشگاه

هادی شمسی[۱]، روح اله صابری ریسه[۲*]، حسین علایی[۲]، پژمان خدایگان[۲] و عبدالرضا اخگر[۳]
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان
۲. دانشیار ، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان
۳. دانشیار، گروه خاک شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰)

چکیده

در این تحقیق اثر برخی از باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی جداسازی شده از مناطق شور و خشک در کنترل عامل بیماری گموز پسته و خصوصیات محرک رشدی بررسی شد. دویست جدایه باکتریایی از ناحیه ریزوسفر و غیرریزوسفر درختان پسته و علف‌های هرز حاشیه باغات استان کرمان جداسازی شد. تعداد سی جدایه توانستند حداکثر سطح شوری استفاده شده را تحمل کنند. جدایه‌های منتخب در آزمون القای واکنش فوق حساسیت مورد ارزیابی قرار گرفتند. سه جدایه به دلیل مثبت بودن در این آزمون کنار گذاشته شدند و بقیهٔ جدایه‌ها به عنوان عوامل آنتاگونیست بالقوه مورد مطالعه بیشتر قرار گرفتند. در مرحلهٔ اول قابلیت بیوکنترلی این جدایه‌ها در مقابل قارچ عامل بیماری گموز پسته ***Phytophthora drechsleri*** مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور آزمون ایجاد هاله بازدارنده (آنتی‌بیوز) به‌کار گرفته شد. در این آزمون جدایه‌های آنتاگونیست اثر معنی‌داری در مهار رشد قارچ، ***P. drechsleri*** از خود نشان دادند. توانایی جدایه‌ها در تولید برخی متابولیت‌ها از جمله تولید پروتئاز، ترکیبات فرآر ضد قارچی و تولید سیانید هیدروژن ارزیابی شد. همچنین خصوصیات محرک رشدی این جدایه‌ها از جمله میزان تولید سیدروفور، تولید اندول و توان حل کنندگی فسفات‌های معدنی نیز اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد از ۲۷ جدایه انتخاب‌شده برای تعیین صفات محرک رشدی، هشتاد درصد حداقل دارای یکی از صفات پروبیوتیک های گیاهی بودند. ۶۴ درصد از جدایه‌ها مولد سیدروفور، هشتاد درصد مولد **IAA**، ۴۵ درصد دارای توانایی حل فسفات‌های نامحلول بودند. جدایه‌های (**C16, F47, G11**) به عنوان جدایه‌های برتر این مطالعه در شرایط آزمایشگاهی در کنترل بیماری موفق و همچنین از خصوصیات بالایی برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، آنتی‌بیوز، پوسیدگی طوقه و ریشه، کنترل بیولوژیک، پروبیوتیک‌های گیاهی.

The effect of some plant probiotic bacteria isolated from salty and dry areas in control of pistachio gummosis caused by *Phytophthora drechsleri* under in vitro condition

Hadi Shamsi[1], Roohallah Saberi Riseh[2*], Hossain Alaei[2], Pejman Khodaygan[2]and Abdolreza Akhgar[3]
1. M.Sc. Student Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e- Asr University of Rafsanjan,
3. Associate Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Vali-e- Asr University of Rafsanjan
(Received: January 1, 2019 - Accepted: March 11, 2019)

ABSTRACT

In this study, the effect of some plant probiotic bacteria isolated from salty and dry areas were investigated in control the fungus agent pistachio gummosis disease and growth stimulating properties. 200 bacteria isolates were isolated from rhizosphere and bulk soils of pistachio trees and weeds in the margins of gardens in Kerman province. Thirty isolates were able to endure the used salt tolerant. The bacteria isolates were investigated at the hypersensitivity reaction (HR) test. Three of them were eliminated due to positive result of HR and the other were studied more as antagonist agents. In the early stage the biocontrol ability of these isolates against the fungus causing pistachio gummosis diseases such as *Phytophthora drechsler*i were studied. For this purpose, inhibition zone test (antibiosis) was performed that antagonist isolates showed significant effect on *P. drechsleri* growth. In the secondary stage, The ability of isolates to produce some biocontrol metabolites including protease, antifungal volatile compounds and hydrogen cyanide were evaluated. Growth stimulating characteristics of these isolates including amount of siderophore and IAA production were measured. soluble ability of insoluble mineral phosphate was surveyed, too. The results showed from 27 studied isolates for growth stimulating properties, %80 at least had one of the plant growth promoting properties. %64 of the isolates were productive of siderophore, %80 productive of IAA, %45 having solving ability of insoluble mineral phosphate. The isolates C16, F47 and G11 as superior isolates of this study were in vitro successful in controlling of the disease.

Keywords: Antagonist, Antibiosis, Crown and root rot, Biological control.
* Corresponding author E-mail: : r.saberi@vru.ac.ir

تازه‌های تحقیق

بر اساس نتایج این تحقیق به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که جدای‌های E2، A30، C16، و F47 قابلیت یک باکتری پروبیوتیک را دارا می‌باشند. شناسایی مقدماتی و تست‌های بیوشیمیایی این جدایه‌ها در(جدول- ۳) بیان شده است. در این پژوهش صفات محرک رشدی جدایه‌های انتخاب شده بسیار برجسته بوده و باتوجه به تحمل بالای این جدایه‌ها به تنش شوری و خشکی محیط، انتظار می‌رود پس از انجام مطالعات گلخانه‌ای بتوان از مایع تلقیح آنها برای بهبود وضعیت تغذیه‌ای و رشد درختان پسته در شرایط نامساعد باغ‌های استان کرمان استفاده کرد. عقیده بر این است که جداسازی و مطالعات جدایه‌های بومی که با محیط سازگار شده‌اند می‌تواند منجر به تولید مایع تلقیح هایی شود که برای محصولات آن منطقه کارایی بیشتری نسبت به جدایه‌های غیر بومی داشته باشند. شناسایی مولکولی و آزمایشات گلخانه‌ای این جدایه‌ها در حال انجام است.

مقدمه

امروزه با توجه به مشخص‌بودن بیش از پیش زیان-های سموم شیمیایی برای انسان و محیط زیست، اهمیت کاربردی کنترل زیستی برای مدیریت بیماری‌های گیاهی آشکار شده است. بیماری پوسیدگی فیتوفترایی طوقه و ریشه پسته (گموز) که توسط گونه‌های مختلف فیتوفترا ایجاد می‌شود در ایران و در برخی از نقاط دنیا دارای اهمیت اقتصادی است (Ogawa and English 1991). از علائم بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه پسته، پوسیدگی لکه‌ای طوقه و ریشه درختان است که با تراوش قطرات شفاف، ریز و درشت صمغ (قطرات صمغ وقتی در مجاورت هوا قرار می‌گیرند به‌تدریج قهوه‌ای رنگ می‌شوند) در سطح یا در شکاف‌های پوست درخت، در محل طوقه و یا ۳۰-۲۰ سانتی-متری بالاتر از سطح خاک همراه است. چنانچه پوست قسمت آلوده برداشته شود، شیره سفید رنگی به بیرون تراوش می‌کند که در مجاورت هوا سریعاً به رنگ قهوه‌ای تا سیاه در می‌آید و موجب خشکیدگی ناگهانی درخت و از بین‌رفتن آوندهای آبکش و نرسیدن آب و مواد غذایی به قسمت‌های سبز و بارور درخت می‌شود (Mirabolfathy 1987). درختان پسته در تمام مراحل رشد به این بیماری مبتلا می‌شوند. نشانه‌های بیماری در اندام هوایی به صورت سبزخشکی درختان بوده که این حالت با شروع گرما مشاهده می‌شود البته ممکن است قبل از بروز حالت سبزخشکی در اندام هوایی، ضعف و رنجوری درختان و نشانه‌هایی شبیه کمبود مواد غذایی نیز مشاهده گردد (Mirabolfathy 1987). علائم این بیماری با توجه به سن درخت فرق می‌کند. درختان جوان که آلودگی شدید دارند، سریعاً خشک می‌شوند. درحالیکه در درختان مسن، کاهش برگ، خشکیدگی سرشاخه‌ها و نهایتاً خشک شدن کامل درخت صورت می‌گیرد. عوامل محیطی روی تمام مراحل توسعه بیماری‌های ناشی ازگونه‌های *Phytophthora* تأثیر دارند. رطوبت به عنوان یک فاکتور محیطی نقش مهمی در پوسیدگی طوقه و ریشه و سیکل زندگی فیتوفتورا دارد به گونه‌ای که افزایش رطوبت خاک پوسیدگی و مرگ‌ومیر ناشی از آن را افزایش می‌دهد. روش‌های مختلفی مانند مبارزه زراعی، مبارزه شیمیایی و مبارزه بیولوژیک برای کنترل این بیماری توصیه شده است. استفاده از قارچ‌کش‌ها روی درختان با محدودیت زیادی همراه است به عنوان مثال اکثر آن‌ها قادر به حرکت سیستمیک در گیاه نیستند، در حالی‌که بافت آبکش در ریشه بسیاری از گیاهان مورد حمله جدایه‌های مختلف فیتوفتورا قرار می‌گیرد. این موضوع نشان‌دهنده کاربرد محدود قارچ‌کش‌ها تحت شرایط باغی و به دنبال آن اثرات مخرب روی اکوسیستم می‌باشد. انسان محیط زیست خود را با باقیمانده سموم کشاورزی به مقدار زیاد آلوده ساخته و زیان‌های فراوانی را به محصولات زراعی، دام‌ها و میکروارگانیسم‌های خاک وارد کرده است. اکنون ما در موقعیتی هستیم که به‌خوبی دریافته‌ایم کسب موفقیت در مبارزه با عوامل بیماریزا در غالب موارد

با آلوده کردن محیط زیست همراه بوده است. با افزایش توجه جامعه جهانی به حفظ منابع طبیعی و کاستن از مواد آلاینده هوا، خاک و آب، استفاده از روش‌های طبیعی یا بیولوژیک برای کنترل بیماری‌های گیاهی از اهمیت روزافزونی برخوردار گردیده است. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی روندی کند دارد ولی در عین حال فاقد هر گونه اثر سوء برای طبیعت است. در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست بخصوص باکتری‌های متعلق به سودوموناد‌های فلورسنت از قبیل *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* و تعدادی از گونه‌های جنس باسیلوس مثل *Bacillus subtilis* و *B. cereus* و همچنین باکتری‌های *Burkholderia cepacia* و*Streptomyces* spp. در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفته‌اند. میکروارگانیسم‌هایی که در ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند، گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیکی هستند، زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشد (Weller 1988). تاکنون تأثیر ریزوباکتری‌های آنتاگونیست زیادی بخصوص از گروه سودوموناد‌های فلورسنت و برخی گونه‌های باسیلوس در کنترل بسیاری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه اغلب گیاهان زراعی به اثبات رسیده است. باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر از گروه سودوموناد‌های فلورسنت به‌طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم کننده‌های رشد گیاه، و نیز به‌طور غیر مستقیم از طریق کنترل بیولوژیکی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان باعث افزایش رشد آن‌ها می‌شوند (Weller 1988). تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک (Picard *et al*. 2000)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین (Leong 1986)، سیانید هیدروژن (Picard *et al*. 2000) و آنزیم پروتئاز (Keel and Défago 1997) از مهم‌ترین مکانیسم‌های مؤثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتری‌ها به شمار می‌روند. بعلاوه تأثیر مثبت این باکتری‌ها روی سایر میکروارگانیسم‌های مفید خاک و میکوریزا و همچنین کمک به قدرت جذب مواد معدنی (بخصوص فسفر و ازت) توسط گیاه از دیگر مکانیسم‌های مؤثر در افزایش رشد گیاه می‌باشند (Keel and Défago 1997). با توجه به اهمیت بررسی کنترل بیولوژیک بیماری انگومک در باغات پسته، هدف از این تحقیق، جداسازی و بررسی قابلیت بیوکنترلی برخی عوامل پروبیوتیک گیاهی جهت کنترل بیماری گموز پسته و خصوصیات محرک رشدی در شرایط تنش شوری و خشکی بوده است.

مواد و روش ها

تهیه قارچ عامل بیماری

در تمامی آزمایش‌ها از جدایه شماره IPRPh-1-1 *Phytophthora drechsleri* (بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی موسسه تحقیقات پسته کشور) جداسازی شده از منطقه موسی‌آباد رفسنجان استفاده گردید. لازم به ذکر است که گونه فوق بر اساس مشخصات مورفولوژیکی اندام‌های تولید مثل جنسی و غیرجنسی تشخیص داده شده است.

تهیه مایه تلقیح *P. drechsleri*

برای تهیه مایه‌ی تلقیح بیمارگر از فلاسک‌های حاوی برنج سترون استفاده شد. ۲۵ گرم برنج در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری محتوی هجده میلی‌لیتر آب ریخته شد. فلاسک‌ها طی دو روز متوالی هر بار به مدت سی دقیقه در دمای ۱۲۱°C و فشار یک اتمسفر سترون گردیدند. سپس شش قرص میسلیومی از پرگنه‌های جوان (سه روزه) کشت داده‌شده روی محیط لیمابین آگار (Limabean agar) برداشته و به هر فلاسک اضافه گردید. فلاسک‌ها به مدت سه هفته در ۲۵°C و تاریکی نگهداری شدند (Holmes and Benson 1994).

آزمون بیماریزایی

به‌منظور اثبات بیماریزایی از گیاهچه‌های دو ماهه

پسته رقم سرخس استفاده گردید. مایه‌زنی با اضافه کردن پنج گرم مایه تلقیح عامل بیماری به ازای یک کیلوگرم خاک در هر گلدان انجام شد. برای تیمار شاهد از برنج سترون شده بدون عامل بیماری استفاده گردید. نتایج بعد از یک تا پنج هفته با ارزیابی پیشرفت بیماری وکشت بافت آلوده بر محیط‌های نیمه انتخابی بررسی گردید.

نگهداری جدایه‌های *Phytophthora*

جدایه‌های خالص شده در شیشه‌های کوچک حاوی آب مقطر سترون و لوله‌های حاوی لیمابین آگار (LBA) در دمای ۱۵-۱۸°C نگهداری شدند (Boesewinkel 1976).

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص سازی و گروه-بندی عوامل آنتاگونیست

به‌منظور جداسازی عوامل آنتاگونیست نمونه‌برداری از خاک ریزوسفر درختان، علف‌های هرز باغات پسته و همچنین از برخی مناطق شور و خشک استان کرمان انجام گرفت، در هر شهرستان از چند باغ (مجموعا چهل نمونه) با شرایط متفاوت از نظر شوری و حاصلخیزی خاک، دور آبیاری و رقم پسته، نمونه‌برداری گردید. در هر باغ یک نمونه مرکب شامل قطعاتی از ریشه و خاک چسبیده به آن تهیه و به کیسه‌های مخصوص منتقل و همزمان نمونه خاک مرکب نیز از اعماق ۴۰-۰ و ۸۰-۴۰ سانتیمتر به‌منظور بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک تهیه شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و جداسازی جدایه‌ها و اندازه‌گیری‌های لازم مانند EC و pH انجام گرفت. به منظورجداسازی باکتریهای ریزوسفری موجود در خاک از هر یک از نمونه‌ها رقت‌های مختلف 10^{-1} تا 10^{-9} تهیه و سپس یک میلی لیتر از رقت های 10^{-4} تا 10^{-9} در سه تکرار روی محیط آگار مغذی (NA) تلقیح شدند. جدایه-هایی که از نظر شکل، رنگ، حاشیه پرگنه و سرعت رشد تفاوت بیشتری با بقیه داشته باشند، انتخاب شدند و پس از کشت مجدد روی همان محیط خالص‌شده و در دو تکرار در لوله‌های آزمایش در پیچ‌دار حاوی محیط کشت شیب‌دار در دمای ۴-۲ درجه سلیسیوس نگهداری شدند. سپس جهت گروه‌بندی جدایه‌ها، از نتایج آزمون‌هایی مانند واکنش گرم با استفاده از روش حلالیت در هیدروکسید پتاسیم سه درصد، تولید رنگ فلورسانس در محیط کشت کینگ ب، بهره گرفته شد. همچنین برای حذف جدایه‌ها با پتانسیل بیماری‌زایی، هر یک از جدایه‌ها در آزمون‌های القای واکنش فوق حساسیت در گیاه شمعدانی مورد بررسی قرار گرفتند (Schaad *et a*l. 2001).

نگهداری باکتری‌ها

نگهداری کوتاه مدت در پتری‌دیش

جدایه‌های موردنظر روی محیط‌کشت NA کشت شدند و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت انکوبه‌کردن در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، برای استفاده روزانه در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

نگهداری طولانی‌مدت

در این روش دو میلی‌لیتر آب مقطر سترون درون لوله‌های کوچک (میکروتیوپ دو میلی لیتری) اتوکلاوشده، ریخته شد و سپس با لوپ از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری برداشته و به آب مقطر سترون اضافه گردید. درب لوله‌ها به وسیله نوار پارافیلم مسدود و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری گردید.

آزمون میزان تحمل به شوری

به‌منظور بررسی میزان تحمل جدایه‌ها به شوری از محیط کشت NA با غلظت‌های متفاوت نمک (۰/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) کلرید سدیم، استفاده شد. EC محلول‌های فوق به ترتیب (۱۵/۱، ۵۲/۱، ۶۷/۱ و ۷۸/۱dS/m) می‌باشد. بدین منظور ابتدا محیط‌های کشت حاوی نمک در شرایط سترون در ظروف پتری توزیع و سپس هر ظرف پتری به ۹ قسمت مساوی تقسیم و کشت تازه هر جدایه با روش

قطره‌گذاری به آنها تلقیح شد. کشت جدایه‌ها به نحوی بود که درون هر ظرف پتری ۹ جدایه مختلف قرار گرفت و برای هر جدایه سه تکرار در سه ظرف پتری، در نظر گرفته شد. ظروف پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و تغییرات قطر، حالت و ظاهر کلونی‌ها پس از ۲۴ ساعت و همچنین به‌منظور مطالعه دقیق‌تر رفتار و عکس العمل باکتری پس از ۱۲۰ ساعت مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. سرعت رشد با مشاهده کلونی جدایه‌ها و مقایسه میزان افزایش قطر کلونی هر جدایه در سطوح مختلف شوری و همچنین مقایسه با دیگر جدایه‌ها ثبت شد (Alippi *et al.* 2000).

بررسی تاثیر عوامل آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

قابلیت توان آنتاگونیستی جدایه های باکتری با استفاده از روش هاوول در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور در وسط تشتک‌های پتری نه سانتی متری حاوی محیط کشت لیمابین آگار (LBA) بلوک پنج میلیمتری از حاشیه پرگنه در حال رشد قارچ *P. drechsleri.* کشت شد و بعد از اینکه قطر کلونی عامل بیماری به حدود ۱/۵ سانتیمتر رسید در سه طرف از باکتری‌ها به فاصله حدود یک سانتی متر از لبه پتری کشت شد. در این روش نیز سه تکرار برای هر تیمار از باکتری‌ها و یک شاهد (که از کشت جدایه بیمارگر با بلوک پنج میلی‌متری از محیط کشت فاقد آنتاگونیست بود) وجود داشت پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس نگهداری شدند اندازه‌گیری رشد شعاعی قارچ مورد نظر پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت انجام شد . در این آزمایش درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ بیمارگر توسط باکتری‌های مورد بررسی نیز محاسبه شد (Howell 2003).

بررسی تولید برخی متابولیت‌های بیوکنترلی

در این آزمایش تاثیرات ضدقارچی متابولیت های فرآر ، تولید سیانید هیدروژن و تولید پروتئاز مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون تولید پروتئاز

این آزمون بر اساس روش چانتاکول و همکاران روی محیط کشت (Skim Milk Agar) در داخل تشتک پتری انجام گرفت. تشتک حاوی SAM به صورت لکه‌ای با جدایه‌های باکتری تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. میانگین شعاع هاله بازدارنده بی‌رنگ در اطراف پرگنه جدایه‌های مختلف باکتری برحسب میلی‌لیتر اندازه‌گیری و به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی قابلیت تولید پروتئاز استفاده شد (Chantawnnakul *et al.* 2002).

آزمون تولید ترکیبات فرآر ضد قارچی

این آزمون بر اساس روش فیدامن وروزال انجام گرفت. در ابتدا سوسپانسیونی به غلظت 10^7 سلول در هر میلی‌لیتر از کشت جوان هر یک ازجدایه‌های باکتری تهیه و به میزان دویست میکرولیتر از هر کدام از آنها روی محیط کشت آگار غذایی (NA) حاوی دو درصد گلوکز کشت گردید و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸-۲۶ درجه سلسیوس در داخل انکوباتور نگهداری شد. سپس به‌جای سرپوش تشتک‌ها یک تشتک دیگر دارای محیط کشت لیمابین اگار(LBA) حاوی قارچ بیمارگر قرار داده شدو فاصله بین آنها با پارافیلم کاملا مسدود شد، به‌طوری که تشتک حاوی باکتری، در قسمت پایین و تشتک حاوی قارچ بیمارگر در قسمت بالا قرار گرفت. در تیمار شاهد به جای باکتری، آب مقطر سترون قرار داده شد. پس از نگهداری تشتک‌ها در داخل انکوباتور به مدت سه شبانه روز در دمای ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس، درصد کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر نسبت به شاهد که فاقد باکتری بود اندازه-گیری شد و از طریق فرمول زیر تعیین گردید (Fiddaman and Rossall 1993).

درصد کاهش رشد پرگنه نسبت به شاهد =۱- {(قطر پرگنه در پتری تیمار/قطر پرگنه در پتری شاهد)}×۱۰۰

آزمون تولید سیانید هیدروژن

به‌منظور بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش آلستروم و همکاران استفاده گردید. در این روش روی محیط حاوی آگار غذایی یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲٪ کربنات سدیم و ۵٪ اسید پیکریک) در قسمت داخل درب پتری قرار داده شد و در پتری با نوار پارافیلم مسدود گردید. بعد از آن پتری‌ها به‌صورت وارونه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به‌مدت یک هفته نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی رنگ زرد به کرم نارنجی، نشانه تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری بود (Alstrom *et a*l. 1987).

بررسی صفات محرک رشد جدایه‌ها

اندازه گیری میزان تولید سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری

مقدار یکصد میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات (KH_2PO_4:3.0 g/l, K_2HPO_4:6.0 g/l, $MgSO_4.7H_2O$: 0.2 g/l, $(NH_4SO_4$:1.0 g/l, succinic acid :4.0 g/l به ارلن‌های یکصدمیلی‌لیتری حاوی چهل میلی‌لیتری محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به مدت چهل ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و ۱۲۰دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژ کردن در۱۰۰۰۰gبه مدت ده دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری میزان جذب مایع رویی در طول موج چهارصد نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (Castaneda *et al*. 2005).

اندازه‌گیری تولید اکسین جدایه‌ها

بدین منظور از روش بنت و همکاران با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB کشت داده شدند. سپس پنجاه میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها مجددا به بیست میلی‌لیتر محیط TSB منتقل و برای مدت ۷۲ ساعت در یکصد دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس تکان داده شدند. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون‌های مذکور در g ۱۰۰۰۰ به مدت پانزده دقیقه سانتریفیوژ شدند. آنگاه یک میلی‌لیتر از محلول روئی با چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی (شامل ۱۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی-لیتر $FeCl_3.6H_2O$, 0.5M) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت بیست دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه دانسیته نوری سوسپانسیون آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰و۳۰ میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید (IAA) محاسبه شد (Bent *et al*. 2001).

اندازه‌گیری توان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی روی محیط کشت PVK جامد

در این آزمون از محیط کشت (PVK) (۱درصد glucose، ۰/۵ درصد $(NH_4)_2SO_4$، ۰/۰۲ درصد NaCl، ۰/۰۲ درصد KCl، ۰/۰۱ درصد $CaCl_2$-$2H_2O$، ۰/۰۱ درصد $MgSO_4$-$7H_2O$، ۰/۰۵ درصد $MnSO_4$-$7H_2O$، ۰/۰۵ درصد $FeSO_4$-$7H_2O$، ۰/۰۵ درصد yeast extract، $Ca_3(PO_4)_2$ با (pH = ۷/۵) و ۱/۵ درصد Agar). استفاده شد. و در شرایط سترون در ظروف پتری توزیع گردید. هر ظرف پتری به چهار قسمت مساوی تقسیم و پس از علامت‌گذاری، کشت سوسپانسیون تازه جدایه‌ها با روش قطره‌گذاری روی آنها انجام شد. کشت جدایه‌ها به‌نحوی بود که درون هر ظرف پتری چهار جدایه مختلف قرار گرفت و برای هر جدایه نیز سه تکرار در سه ظرف در نظر گرفته شد. ظروف پتری درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و قطر پرگنه رشد یافته یا (Colony Diameter = CD) و نیز قطر هاله شفاف حاصل از انحلال فسفات (Halo Diameter= HD) که در

اطراف هر پرگنه تشکیل شده بود، در فواصل زمانی ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ روز اندازه‌گیری و سپس نسبت قطر هاله به قطر پرگنه برای هر جدایه محاسبه شد (Pikovskaya 1984).

آزمون میزان تحمل جدایه‌ها به خشکی

به‌منظور ارزیابی میزان تحمل جدایه‌ها به سطوح مختلف خشکی از توان رشد آن‌ها در محیط کشت NB حاوی غلظت‌های صفر ، ۳۶۲/ ۲۰۳ ، ۲۹۸/۵۸۷، ۴۳۸/۴۰، ۵۴۸/۸۳۸ گرم پلی‌اتیلن گلیکول شش هزار به ازای هر کیلوگرم محیط کشت NB استفاده شد. پتانسیل‌های آبی سطوح فوق به‌ترتیب . ، ۵- ، ۱۰- ، ۲۰- و ۳۰- بار می‌باشد. بر اساس معادله (Michel and Kaufman 1973)، محاسبه شده اند. میزان رشد جدایه‌ها با اندازه‌گیری چگالی نوری (Optical Density = OD محیط رشد آنها در ششصد نانومتر، توسط اسپکتروفوتومتر تعیین و درصد کاهش رشد هر جدایه در سطوح مختلف پلی‌اتیلن‌گلیکول در مقایسه با میزان رشد همان جدایه در محیط NB محاسبه گردید. سه تکرار از محیط NB تلقیح نشده حاوی مقادیر مختلف پلی اتیلن گلیکول نیز به عنوان شاهد جهت تعیین میزان چگالی نوری این محیط در شرایط فوق تهیه و OD آنها نیز قرائت شد (Michel and Kaufman 1973).

آزمون های افتراقی برای شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست در حد جنس

در ابتدا جدایه‌های انتخاب‌شده بر اساس دستورالعمل شاد (Schaad *et al.* 2001) و منبع پروکاریوت‌ها از طریق مشاهده شکل پرگنه، رنگ-آمیزی گرم، واکنش پتاس سه درصد، تولید رنگ فلورسنس در محیط کشت کینگ ب، برای تشخیص جنس ارزیابی شدند. سپس برای تشخیص گونه نیز از تست‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی (شکل پرگنه، رنگ‌آمیزی گرم، اکسیداز، کاتالاز، لوان، هیدرولیز نشاسته، رشد در نمک طعام ۷٪، تست اوره‌آز، مصرف منابع کربنی (قندهای گلوکز، ساکارز، مانیتول، مالتوز و ترهالوز) استفاده شد (جدول ۳) (Schaad *et al*. 2001).

نتایج

نمونه‌برداری، جداسازی و گروه‌بندی عوامل آنتاگونیست

در دو فصل پاییز و تابستان سال ۱۳۹۵-۱۳۹۶ از برخی مناطق شور و خشک استان کرمان شامل (شهرستان های کرمان، رفسنجان، سیرجان، زرند، شهداد و ارزوئیه) از ناحیه ریزوسفر و غیرریزوسفر باغات پسته و علف‌های هرز حاشیه باغات نمونه-برداری انجام شد. از این نمونه‌ها دویست باکتری جداسازی گردید. هر یک از جدایه‌ها با توجه به رنگ، شکل ظاهری، سرعت رشد و جمعیت تک پرگنه‌ها انتخاب و مجددا به منظور خالص سازی روی محیط آگار مغذی مخطط شدند. در ابتدای گروه‌بندی، جدایه‌های واجد توان القای واکنش فوق حساسیت روی گیاهان توتون و شمعدانی حذف شدند. جدایه‌هایی که نتیجه واکنش فوق حساسیت در آنها منفی بود، به‌عنوان عوامل آنتاگونیست انتخاب شدند. سرانجام از بین جدایه‌هایی که دارای قابلیت آنتاگونیستی بودند شانزده جدایه به نمایندگی انتخاب شدند. این جدایه‌ها از نظر توان تحمل به شوری و خشکی و ویژگی‌های موثر و مفید برای گیاه نیز جزء جدایه‌های خوب به‌شمار می‌آیند.

نتایج تست شوری

از دویست جدایه مورد بررسی در مرحله اول ۹۸/۵، ۶۳، ۳۴ و ۱۵ درصد جدایه‌ها بعد از ۲۴ ساعت و ۱۰۰، ۶۶، ۴۰ و بیست درصد جدایه‌ها بعد از ۱۲۰ ساعت توانستند به ترتیب در سطوح شوری ۰/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد رشد کنند. افزایش سطح شوری به بیش از پنج درصد باعث کاهش قطر پرگنه جدایه‌ها گردید. قطر پرگنه بعضی از جدایه‌ها در ۲۴ ساعت اولیه نامحسوس بود، اما پس از ۱۲۰ ساعت به خوبی افزایش یافت (جدول۱).

جدول ۱- خصوصیات محیط و تعداد جدایه‌های رشدیافته در سطوح مختلف شوری

Table 1- Environmental characteristics and number of isolates grown at different levels of salinity

Environmental characteristics and number of isolated grown	Salinity level (%)			
	0.5	5	7.5	10
Electrical conductivity (EC), ds/m	15.1	52.1	67.1	78.1
Number of isolates grown after 24 hours	197	126	68	30
Number of isolates grown after 120 hours	200	131	85	48

گروه‌بندی جدایه‌ها از نظر تحمل به شوری

جدایه‌های مورد مطالعه در آزمون تحمل به شوری با توجه به میزان رشد جدایه‌ها در سطوح مختلف شوری به پنج گروه حساس، نیمه حساس، نیمه-متحمل، متحمل، بسیار متحمل تفکیک شدند. گروه بندی بر مبنای میزان رشد جدایه‌ها در مقایسه با محیط غذایی بدون افزودن نمک که همه جدایه‌ها در آن رشد کردند و همچنین مقایسه جدایه‌ها با یکدیگر صورت گرفت. مبنای گروه‌بندی، تعداد جدایه‌های مربوط به هر گروه، تعدا جدایه‌های انتخاب شده از هر گروه در (جدول۲) آمده است.

جدول ۲- گروه بندی جدایه‌ها از نظر میزان تحمل به شوری

Table 2 - Grouping of isolates based on the amount of salinity tolerance

Tolerance degree	Growth status	Number of 200
Sensitive	Poor growth to a relatively low level of 0.5%	3
Semi sensitive	Moderate to severe growth at a level of 0.5 and a weak to relatively low level of 5%	71
Half tolerated	Moderate to severe growth at 5 and weak to relatively low at 7.5%	58
Tolerated	Moderate to severe growth at a level of 7.5 and weak to relatively low at 10%	38
Very tolerant	Moderate to severe growth at a level of 10% up	30
Total		200

بررسی اثر باکتری های آنتاگونیست بر *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاه

جدایه‌های F47، G3، F2، A71، A30، G24، F55، E2 ، G44، A19، C16، G44 و A88 در آزمون چهار نقطه‌ای روی محیط کشت لیمابین آگار (LBA) هاله بازدارندگی بیشتری در قیاس با بقیه جدایه‌ها در برابر قارچ بیمارگر ایجاد کردند. از بین آنها جدایه‌های E2، G44، C16 و F55 بیشترین میزان بازدارندگی که به ترتیب با ۱۵، ۱۴، ۱۱ و ۸ میلی-متر و جدایه F2 با دو میلی‌متر کمترین بازدارندگی علیه بیمارگر نشان دادند. (شکل۱). نتایج بررسی کاهش رشد میسلیوم در اثر تولید ترکیبات فرّار توسط باکتری‌ها نشان داد که جدایه‌های F47، C16 ، A30 و E2 با میانگین هشتاد درصد بیشترین بازدارندگی و جدایه G24 با میانگین ده درصدکمترین بازدارندگی را داشتند و جدایه F32 قادر به کنترل عامل بیمارگر نبود (شکل ۲). نتایج نشان داد که جدایه‌های A19، C16، G44، F55 و A88پروتئاز تولید کردند (شکل ۳). هیچکدام از جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند (شکل ۴). ناحیه بازدارنده برای جدایه‌های فوق علیه *P. drechsleri* در (جدول۳) ذکر شده است. جدایه‌هایی که از قابلیت بیوکنترلی مناسبی علیه بیمارگر برخوردار بودند، برای شناسایی اولیه مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (جدول ۴).

ارزیابی کمی تولید سیدروفور با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

در اندازه‌گیری توان تولید سیدروفور باکتری‌های سودوموناس بصورت کمّی که بصورت اختصاصی مقدار سیدروفور نوع پایووردین قابل ارزیابی است مشخص شد که بیشتر جدایه‌ها قادر به تولید سیدروفور در مقادیر مختلف بودند. تولید پیگمانت فلورسنت در محیط کشت سوکسینات به وسیله رنگ زرد- سبز و فلورسنت قوی آن مشخص می‌شود که به‌عنوان یک نشانگر مشخص برای شناسایی

باکتری‌های سودوموناس استفاده می‌شود. از این محیط کشت برای جداسازی و خالص‌سازی پیگمانت فلورسنت نیز استفاده می‌شود (Meyer and Abdallah 1978). در این آزمایش میزان تولید سیدروفور جدایه‌ها متغییر بود. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که جدایه‌های F4 و E2 بیشترین میزان تولید سیدروفور را به خود اختصاص دادند. جدایه‌های G31، F32،و A85 قادر به تولید سیدروفور نبودند (شکل۶).

جدول ۳- بررسی قدرت بازدارندگی جدایه‌های برتر باکتریایی بر قارچ *P. drechsleri* درون تشتک پتری

Table 3- Investigation of the inhibitory potential of superior bacterial isolates on *P. drechsleri* fungus in petri dishe

The row number	Isolates code	Sampling site	Host	Inhibition radius (cm)
1	A77	Shahdad	Weed	4
2	G44	Orzuyeh	Weed	13
3	F2	Rafsanjan	Pistachia tree	3
4	F55	Rafsanjan	Pistachia tree	2
5	F47	Rafsanjan	Pistachia tree	6
6	A30	Shahdad-Wheat bran	Asparagus tree	5
7	A97	Shahdad- Wheat bran	Non-rhizosphere	4
8	A19	Shahdad	Weed	9
9	A71	Shahdad	Weed	5
10	G31	Orzuyeh	Weed	11
11	G3	Orzuyeh	Weed	11
12	G11	Orzuyeh	Pistachia tree	5
13	D32	Kerman	Pistachia tree	3
14	E2	Zarand	Pistachia tree	15
15	C16	Sirjan-Zaid abad	Pistachia tree	11

جدول ۴- نتایج آزمون‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های برتر انتخابی

Table 4- Results of morphological and biochemical tests for superior selective isolates.

Isolates code	F47	F55	A30	E2	A19	A88	G44	C16
Gram reaction	+	+	+	-	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Starch	+	+	+	+	+	+	-	+
Levan	+	-	+	+	+	+	-	+
Fluorescent	-	-	-	+	+	-	-	-
Urea	+	+	+	+	-	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+
Maltose	+	+	-	+	-	-	+	+
Mannitol	+	+	+	-	+	-	-	-
Di¬Try¬Haloz	+	-	+	+	-	+	+	-
Tryptophan	+	+	+	-	-	-	-	-
Arginine	+	+	+	+	+	+	-	+
Indol acetic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
5%-salt tolerance	+	+	+	+	+	+	+	+
7.5%-salt tolerance	+	+	+	+	+	+	+	+
10%-salt tolerance	+	+	+	+	+	+	+	+
hypersensitivity reaction (HR)	-	-	-	-	-	-	-	-
Protease	+	+	+	+	+	+	+	+

negative result = (-), Positive result(+) (+)نتیجه مثبت، (-)نتیجه منفی

جدول ۵- نتایج حاصل از توان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی توسط جدایه‌های برتر

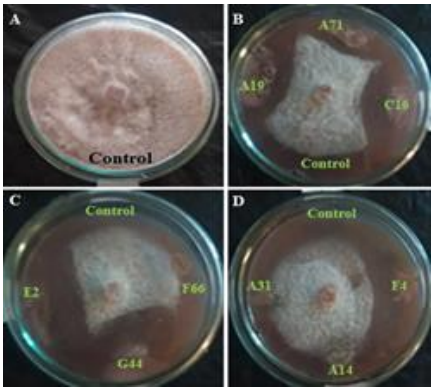
Table 5- Results of the solubility of mineral phosphates by superior isolates

Isolates code	Colony Diameter (mm)	Transparent Halo Diameter (mm)
A47	5.2	20
A88	5.3	19.2
F47	5	18.6
F55	5.2	15.5
C16	5	14
A14	5	9

جدول۶- وضعیت رشد (OD 600nm) و میزان کاهش رشد جدایه‌ها در سطوح مختلف PEG

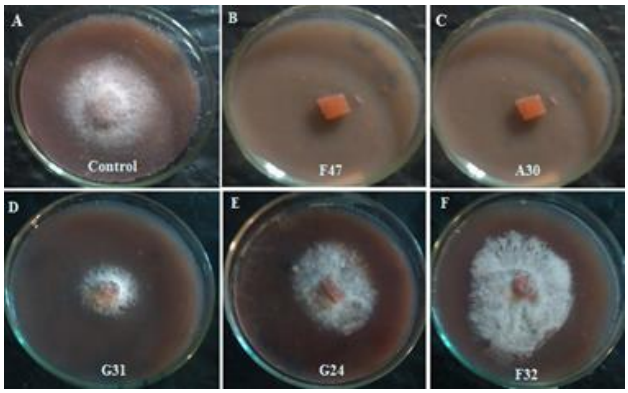
Table 6 - Growth status (OD 600nm) and growth rate (RP) of isolates at different levels of PEG

The amount of PEG (gr)	Isolates code						
	F55	G31	A14	F41	E2	D40	A30
0 (0 bar)	OD=2.131 n RP=0v	2.148 n 0v	2.116 n 0v	2.243 n 0v	2.104 n 0v	2.107n 0v	1.901n 0v
203.362 (-5bar)	OD=1.379 Lmn RP=35.2b-f	1.625Lmn 24.3 ab	1.601 Lmn 24.3 a	1.678Lmn 25.1 ab	1.078Lmn 48.7 a	1.408Lmn 33.1ab	1.324klm 30.3a-d
298.587 (-10bar)	OD=1.253 h-m RP=41.1 f-i	0.961 e-i 55.2 h-l	1.146 j-m 45.8abc	1.411 g-i 37 c-g	0.764g-l 63.6d-g	0.818j-m 61.1b-f	1.038h-m 45.3b-f
438.40 (-20bar)	OD=0.679 a-e RP=68.1 p-u	0.490 a-f 77.1 n-r	0.596 c-h 71.8 j-n	0.692 b-g 69.1 I-p	0.519d-h 75.3i-m	0.012a-f 99.4n-s	0.322c-h 83j-n
548.838 (-30bar)	OD=0.462 ab RP= 78.3 Tuv	0.031 ab 98.5 tuv	0.109 a 94.8 tuv	0.012 abc 99.4 tuv	0.041a 98uv	0.007a-d 99.6r-v	0.059a-f 96.8m-r



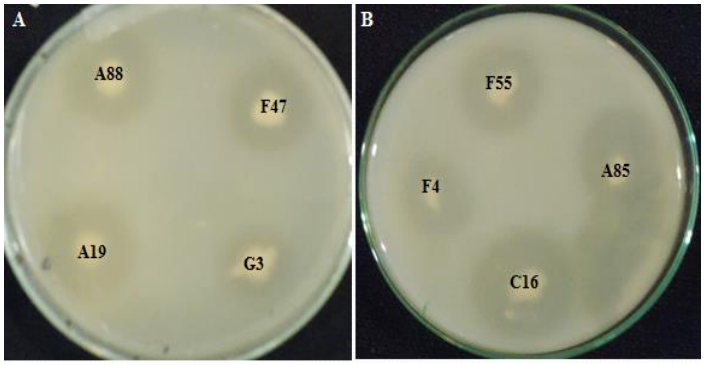
شکل ۱- قابلیت بیوکنترلی جدایه‌های باکتری جداسازی شده از مناطق شور و خشک در کنترل *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاه. تیمار شاهد قارچ *P. drechsleri* (A)، جدایه‌های F55, F4, C16 , A19 , E2 و G44 به عنوان جدایه‌های موفق در کنترل عامل بیماری(B), (C), (D).

Figure1- Biocontrol ability of some bacteria isolates obtain from salty and dry areas in control of *P. drechsleri* fungus in vitro. The *P. drechsleri* fungus as the control sample (A). The isolates of E2, A19, FC16, F4, F55 and G44 as successful isolates at control of fungi agent disease (B), (C), (D).



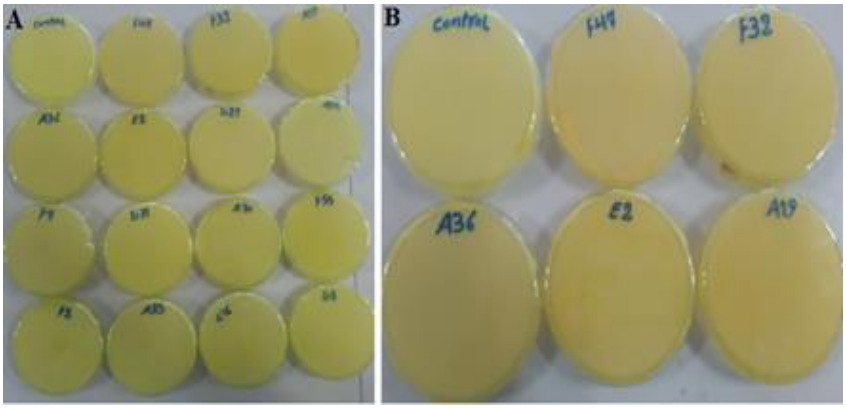
شکل۲- تولید ترکیبات فرآر ضد قارچی توسط باکتری‌های آنتاگونیست. تیمار شاهد *P. drechsleri* (A کنترل ۱۰۰درصدی بیمارگر توسط جدایه‌های F47 و A30 (B, C). کنترل چهل درصدی عامل بیماری توسط جدایه G31 (D). کنترل ۱۰ درصدی عامل بیماری توسط جدایه G24 (E). جدایهF32 قادر به کنترل عامل بیماری نبود(F)

Figure2- The production of antifungal escape compounds by antagonistic bacteria. *P. drechsleri* as a control sample (A). 80% control of pathogenic fungi by isolates of F47 and A30 (B, C). 40% control of pathogenic fungi by isolate G31 (D). 10% control of pathogenic fungi by isolate G24 (E). The F32 isolate was unable to control the pathogen fungus (F).



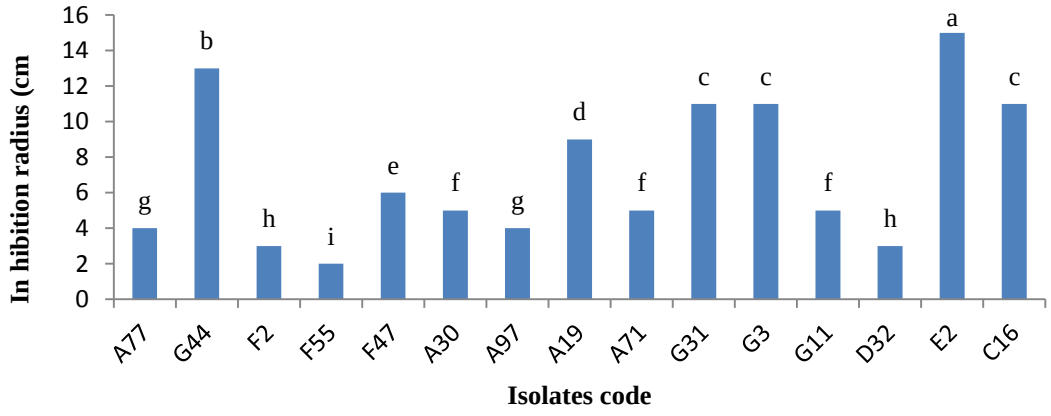
شکل ۳- تولید پروتئاز توسط برخی از جدایه‌ها. شعاع هاله بازدارنده شفاف در اطراف پرگنه باکتری نشان دهنده تولید پروتئاز است (A, B).

Figure3- Production of protease by some isolates. The radius of a continuous inhibitor zone of a colony around the bacteria indicates the production of protease, measured in millimeters (A, B)



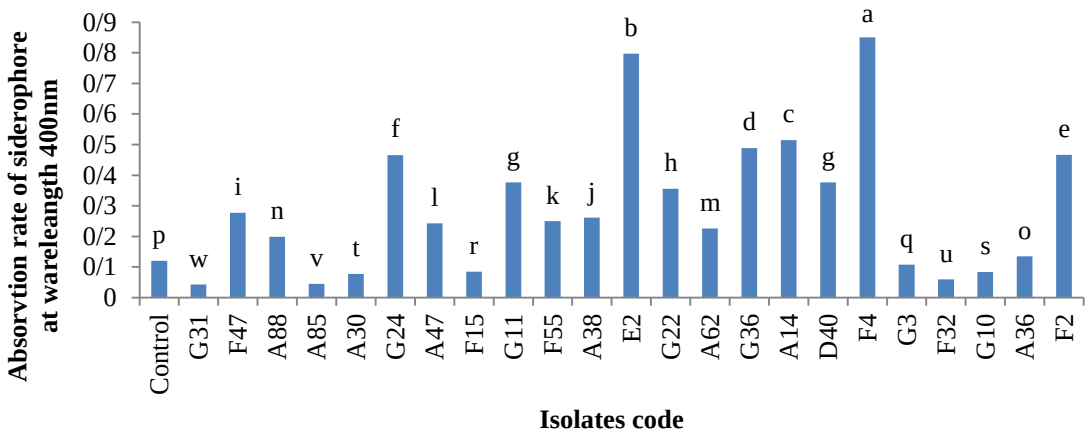
شکل ۴- بررسی میزان تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه‌ها. هیچکدام از جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند (A, B).

Figure 4- Hydrogen cyanide production by isolates. None of the isolates were able to produce hydrogen cyanide (A, B).



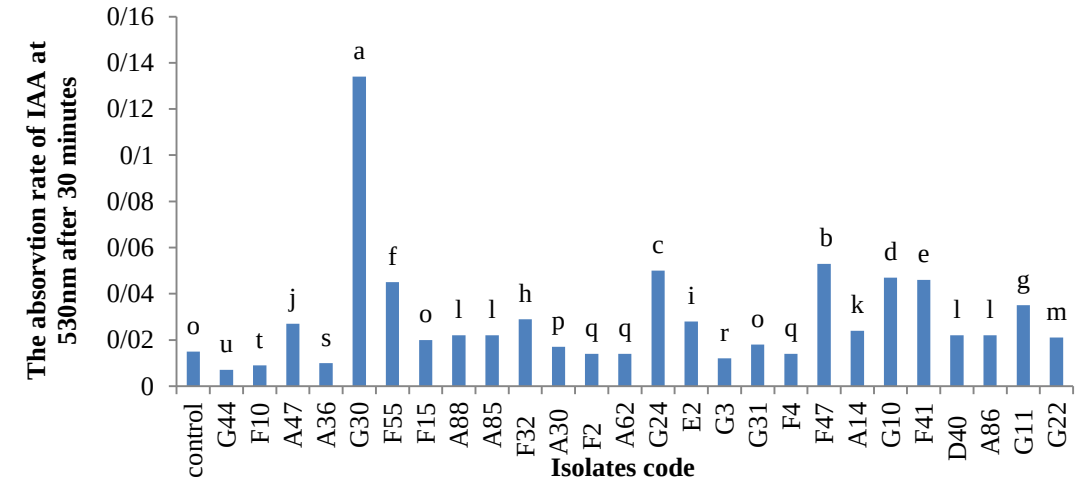
شکل۵- جدایه‌های برتر در بررسی قدرت بازدارندگی قارچ بیمارگر درون تشتک پتری. داده‌ها میانگین سه تکرار برای هر جدایه می‌باشند. ستون‌هایی که با حروف مختلف نمایش داده شده‌اند. دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند.

Figure 5- Superior isolates to investigate the inhibitory power of the fungi diseases in the petri dish. The data are three replicates for each isolate. Columns displayed in different letters. Have a significant difference at the level of 1%



شکل۶- بررسی تولید سیدروفور با روش اسپکتروفتومتری در طول موج چهارصد نانومتر در محیط کشت سوکسینات. داده‌ها میانگین سه تکرار برای هر جدایه می‌باشند. ستون‌هایی که با حروف مختلف نمایش داده شده‌اند. دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند.

Figure 6- Determination of siderophore production by spectrophotometric method at 400 nm wavelength in succinate culture media. The data are three replicates for each isolate. Columns displayed in different letters. Have a significant difference at the level of 1%.



شکل ۷- بررسی تولید اندول در طول موج ۵۳۰ نانومتر بعداز سی دقیقه . داده‌ها میانگین سه تکرار برای هر جدایه می‌باشند. ستون‌هایی که با حروف مختلف نمایش داده شده‌اند. دارای اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد می‌باشند

Figure 7- Survey on the production of I AA 530 nm wavelength after 30 minutes. The data are three replicates for each isolate. Columns displayed in different letters. Have a significant difference at the level of 1%.

ارزیابی توان تولید اندول با استفاده از روش اسپکتروفتومتری

در اندازه‌گیری توان تولید اندول، از ۲۶ جدایه مورد مطالعه اکثر جدایه‌ها قادر به تولید اندول در مقادیر مختلف بودند. نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که جدایه‌های G30، F55، F47، G10، G24 و F41 نسبت به جدایه‌های دیگر عملکرد بهتری داشتند و در نهایت جدایه‌ای که میزان تولید اندول آنها از

بقیه بیشتر بود به‌عنوان جدایه‌های برتر نهایی انتخاب شدند (شکل۷).

نتایج اندازه‌گیری توان حل‌کنندگی فسفات‌های معدنی

چهل درصد جدایه‌های مورد مطالعه قادر به حل فسفر معدنی نامحلول بودند. جدایه‌های F47، A14،C16، F55،A47 و A88 به عنوان جدایه‌های برتر نهایی انتخاب شدند. نسبت قطر هاله به قطر پرگنه این جدایه‌ها قابل توجه است (جدول ۵).

میزان تحمل جدایه‌ها به خشکی

در این مرحله تعداد جدایه‌هایی که در آزمون شوری و آزمون‌های تعیین صفات محرک رشدی به عنوان جدایه برتر انتخاب شدند از نظر میزان تحمل به خشکی مورد ارزیابی قرار گرفتند. با افزایش پلی-اتیلن‌گلیکول مصرفی میزان رشد جدایه‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. جدایه D40 در سطح ۳۰- بار قادر به رشد نبود (جدول۶).

بحث

در سال‌های اخیر به دلیل مشکلات اقتصادی ناشی از افزایش رو به‌رشد کودهای شیمیایی از یک‌سو و مسائل زیست‌محیطی مرتبط با مصرف غیراصولی این کودها، محققان را بر آن داشته تا در پی شناسایی و استفاده از راهکارهای بیولوژیک با استفاده از بیوتکنولوژی میکروبی در جهت حل این معضلات باشند. به‌منظور کنترل بیماری از روش‌هایی چون مبارزه زراعی، شیمیایی، کنترل بیولوژیک و پایه‌های مقاوم استفاده می‌شود.

در این پژوهش جدایه‌های C16، A30 و E2 در قیاس با بقیه جدایه‌ها در برابر بیمارگر، هاله بازدارندگی بیشتری ایجاد کردند. ایجاد هاله بازدارندگی مشخص به‌وسیله این باکتری‌ها می‌توان به تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، متابولیت‌های سمی نسبت داد که به عنوان مکانیسم‌های بیوکنترلی به حساب می‌آیند (Swadling and Jeffries 1996). نتایج حاصل از تولید متابولیت‌ها نشان می‌دهد که این جدایه‌ها مقادیر مختلفی از ترکیبات فرآر ضد قارچی تولید می‌کنند، به گونه‌ای که جدایه‌های A30 و C16 با میانگین هشتاد درصد بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری از خود نشان دادند. یکی از متابولیت‌هایی که در توانایی کلنیزه کردن و به دنبال آن قابلیت بیوکنترل باکتری‌ها نقش مهمی بازی می‌کند، پروتئاز است O'Sullivan (*et al*. 1991). در این بررسی حدود پنجاه درصد جدایه‌ها قادر به تولید پروتئاز بودند. پروتئاز تولید شده به وسیله این جدایه‌ها ممکن است موجب غیرفعال‌شدن آنزیم‌های هیدرولاز و فیتوتوکسین-های تولیدشده به وسیله قارچ‌های بیمارگر شده، به این ترتیب سبب کاهش بیماری‌زایی آنها می‌شود. این موضوع در مورد قارچ *F. oxysporum* به اثبات رسیده است (O'Sullivan *et al*. 1991). جدایه A47، A88، F55 و A19 با ایجاد هاله شفاف به-ترتیب با قطر ۲، ۱/۹۲، ۱/۸۶ و ۱/۵۰ سانتی متر به عنوان جدایه‌های برتر از نظر قابلیت تولید آنزیم پروتئاز به شمار می‌روند. هیچکدام از جدایه‌ها قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند. باکتری‌های باسیلوس آنزیم‌هایی مانند پروتئاز و آنتی بیوتیک-هایی از قبیل فنجامایسین، سورفکتین، باسیلیسین، سیانید هیدروژن و توکسی‌مایسین با توان آنتاگونیستی علیه عوامل بیماری‌زا تولید می‌کنند که بر رشد بیمارگرها در شرایط آزمایشگاه و مزرعه تاثیر دارند (Li *et al*. 2009, Panjehkeh *et al*. 2011, Asaka and Shoda 1996). همچنین تحقیقات نشان داده است که جدایه‌های باکتری باسیلوس از طریق تولید آنتی‌بیوتیک باعث کنترل بیماری می‌شود (Liu *et al*. 2007). باکتری‌های جنس سودوموناس از سری باکتری‌های محرک رشد هستند که به‌طور وسیعی گسترش پیدا کرده-اند و می‌توانند از بیشتر محیط‌ها شامل خاک، ریزوسفر و فیلوسفر جداسازی شوند و به عنوان یک کنترل‌کننده بیولوژیکی نیز عمل می-کنند (Alexander and Zuberer 1993). باکتری-

های جنس سودوموناس به دلیل توزیع گسترده در خاک، توانایی کلنیزاسیون ریزوسفری بسیاری از گیاهان و تولید طیف متنوعی از متابولیت‌های محرک رشد گیاهی از جمله تولید سیدروفور، اکسین و حل‌کنندگی فسفات از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Rashid *et al*. 2004).

با توجه به نتایج به‌دست آمده، بیش از پانزده درصد از دویست باکتری جدا شده از ناحیه ریزوسفر و غیرریزوسفر درختان پسته و علف های هرز مناطق شور و خشک، کم و بیش توانستند حداکثر سطح شوری استفاده شده ده درصد، (EC=78 dS/m) را تحمل کنند. افزایش سطح شوری باعث کاهش توده کلونی جدایه‌ها گردید، به‌طوری که در مورد بعضی از جدایه‌ها در سطوح بالای شوری میزان رشد در ۲۴ ساعت اولیه نامحسوس بود. در مجموع تحمل قابل توجه جدایه‌ها می‌تواند احتمالا ناشی از شرایط حاکم بر باغ‌های پسته استان باشد. سویه‌های برتر PGPR جداشده از ریزوسفر ذرت در کشور هندوستان توانستند در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، در حضور هفت درصد کلرید سدیم و در محدوده pH ۵/۷-۹/۹ به‌خوبی رشد کنند (Tilack and Reddy 2006). طی پژوهشی که توسط کاتلان و همکاران صورت گرفت ۱۱۶ جدایه را از ریزوسفر سویا جداسازی و مورد مطالعه قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد ۲۲ جدایه حداقل یک صفت مثبت را داشتند. هفت جدایه مولد سیدروفور، پنج جدایه حل‌کننده فسفات، چهار جدایه مولد IAA بودند (Kattelan *et al*. 1999). در تحقیقی از ۱۰۴ جدایه انتخاب‌شده برای تعیین صفات محرک رشدی، هشتاد درصد دارای یکی از صفات مثبت بودند. ۴۶ درصد از جدایه‌ها مولد سیدروفور، ۴۷ درصد مولد IAA، ۳۳ درصد دارای توانایی حل فسفات‌های نامحلول و ۲۲ درصد مولد آنزیم ACC- دآمیناز بودند (*et al*. 2010 Sarcheshmepour). در ارزیابی تولید سیدروفور، میزان تولید سیدروفور پایووردین به صورت اختصاصی اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان تولید پایووردین مربوط به جدایه‌های F4 و E2 به ترتیب با میزان جذب نوری حاصل از آنها در طول موج چهارصد نانومتر برابر با ۰/۸۵۱ و ۰/۷۹۷ بود. قابلیت بیوکنترلی جدایه‌هایE2 ، F47 و F4 علیه فیتوفتورا را می‌توان به تولید سیدروفور نوع پایووردین که توسط این جدایه‌ها تولید می‌شود نیز نسبت داد. مشخصه عمومی سودوموناس‌های فلورسنت تولید پیگمان‌هایی است که در برابر نور فرابنفش با طول موج کوتاه (۲۵۴ نانومتر) به ویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت پرتوافشانی دارند. این پیگمان‌های فلورسنس و محلول در آب از جمله انواع مهم سیدروفورها هستند (Leoni *et al*. 2002). سیدروفورها ترکیباتی با وزن ملکولی کم هستند که در شرایط کمبود آهن توسط برخی ریزجانداران خاک ترشح شده، میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای کمپلکس شدن با آهن فریک دارند و آن را به صورت محلول و قابل دسترس درمی‌آورند (Milagers *et al*. 1999). تولید پیگمانت فلورسنت در محیط کشت سوکسینات به وسیله رنگ زرد– سبز و فلورسنت قوی آن مشخص می‌شود که به‌عنوان یک نشانگر مشخص برای شناسایی باکتری‌های سودوموناس استفاده می‌شود. همان‌طور که در (شکل- ۶) این تغییر رنگ در برخی جدایه‌ها مشاهده می‌شود می‌توان دلیلی بر سودوموناس بودن این جدایه‌ها دانست. نتایج پژوهش زایااو و کیسالیتا که بر روی باکتری سودوموناس آریژینوزا انجام شد، نشان داد که حداکثر جذب در چهارصد نانومتر نشانگر وجود سیدروفورها در محلول رویی است (Xiao and Kisaalita 1997). کاستاندا و همکاران نیز نتایج مشابهی را ارائه دادند (*et al*. Castaneda 2005). سودوموناس‌های فلورسنت خاک‌زی بواسطه داشتن خصوصیاتی چون تنوع کاتابولیکی، توانایی بالا در کلنیزاسیون ریشه و قابلیت آنها در تولید محدوده وسیعی از آنزیم‌ها و مواد متابولیک از اهمیت خاصی برخوردارند و از مهمترین و پرشمارترین اعضای جمعیت باکتریایی ریزوسفر محسوب می‌شوند (Saravanakumar and

Samiyappan 2007). سیدروفور می‌تواند در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های روی سطح گیاه، نقش اکولوژیکی داشته باشد (Bultreys and Kaluzna 2010). همچنین سیدروفور پایووردین در توسعه بیوفیلم نیز موثر می‌باشد (Visca *et al*. 2007).

فیتوهورمون‌ها نقش اساسی در رشد و توسعه گیاهان ایفا می‌کند، ایندول استیک اسید(IAA) جزء مهمترین و فراوان‌ترین هورمون‌های اکسینی می‌باشدکه توسط طیف وسیعی از باکتری‌های ریزوسفری از جمله باکتری‌های ریزوبیومی و سودوموناس فلورسنت تولید می‌شود، استفاده از زادومایه‌ی این باکتری‌ها می‌تواند در جهت افزایش تولیدات کشاورزی مفید واقع شود. نقش اساسی اکسین، در القای ریشه زایی و تشکیل ریشه اثبات شده است (Mangang *et al*. 2015). در بررسی میزان تولید IAA درصد بالایی از جدایه‌ها قادر به تولید IAA بودند. جدایه‌های F55،G24 ، F47 و G30 به ترتیب با میزان جذب نوری حاصل از آنها در طول موج ۵۳۵ نانومتر برابر با ۰/۲۰۹، ۰/۱۸۶، ۰/۱۲۷ و ۰/۱۰۲ بهترین عملکرد را داشتند. در شرایط تنش شوری و خشکی مقدار اتیلن افزایش پیدا می‌کند، بالارفتن میزان اتیلن درگیاه خاصیت بازدارندگی دارد و از رشد گیاه ممانعت بعمل می-آورد یکی از استراتژیهایی که می‌تواند میزان اتیلن را پایین بیاورد و به رشد گیاه کمک کند استفاده از باکتری‌های PGPR است که دارای آنزیم ACC-دآمیناز و IAA می‌باشند. تنظیم باکتریایی تولید اتیلن در گیاه، از یک سو تحت تاثیر فعالیت آنزیم ۱-آمینو سیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات دآمیناز (ACC دآمیناز) باکتریایی و از سوی دیگر متاثر از هورمون گیاهی IAA است (Glick *et al*. 1998).

همانطور که اشاره شد درصد بالایی از باکتریای مورد آزمایش قادر به تولید IAA بودند. جهت اطمینان بیشتر و عملکرد بهتر، بعد از تحقیقات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای، می‌توان از وجود این جدایه‌ها در مزارع و باغاتی که در شرایط تنش شوری و خشکی قرار دارند، استفاده کرد و عملکرد بهتری را شاهد بود. در همین زمینه پژوهشی توسط موهت انجام گرفت، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد ۱۰ جدایه از ریزوسفر گندم و ذرت با توانایی تولید هورمون IAA گزارش کرد که چهار باکتری شامل *Bacillus megaterium*، *Lactobacillus acidophilus*، *B. subtilis* و *B.cereus* کارایی بیشتری داشتند که از ناحیه ریزوسفر جداسازی شده بودند (Mohote 2013).

فسفر یکی از عناصر ضروری برای رشد و تکثیر گیاهان می‌باشد و برای ذخیره‌سازی و انتقال انرژی، حفاظت و انتقال کدهای ژنتیکی به‌کار می‌رود و جزء ترکیبات ساختمانی سلول‌ها و بسیاری از ترکیبات شیمیایی می‌باشد (Hopkins and Ellsworth 2003). فسفر بعد از نیتروژن، مهمترین عنصر غذایی ضروری و پر مصرف مورد نیاز گیاه است و به دو شکل آلی (اسیدهای نوکلوئیک، فسفولیپیدها، فسفو پروتئین‌ها، فسفات‌های اینوزیتول و قندهای مصرفی) و معدنی (عمدتا فسفات‌های کلسیم، منیزیم، آهن و آلمینیوم) در خاک‌ها یافت می‌شود. فسفر عنصر ضروری است که به شکل فسفات از خاک جذب می‌شود. ترکیب فسفر با مواد موجود در خاک موجب محدود شدن انتشار فسفر به سیستم ریشه می‌شود. بنابراین حتی زمانی که غلظت فسفر خاک بالاست امکان دارد که در دسترس گیاه نباشد. برای سازگاری با این شرایط گیاهان از روش‌های مختلف برای آزادسازی و جذب فسفر از خاک استفاده می‌کنند (Vance *et al*. 2003). شوری خاک به عنوان یکی از تنش‌های مهم محدود کننده کارایی تولید محصول گیاه، جذب مواد غذایی مخصوصا جذب فسفر به وسیله گیاه را به‌طور معنی‌داری کاهش می‌دهد. زیرا در خاک‌های تحت تنش شوری، یون‌های فسفات به سرعت با یون کلسیم رسوب می‌کنند (Bano and Mussara 2009). بنابراین برای استفاده از باکتری‌های حل-کننده فسفات در خاک‌های شور، توانایی آنها در تحمل شوری محیط نیز باید بررسی شود. در بررسی انحلال فسفات معدنی، چهل درصد

جدایه‌ها در محیط کشت جامد توان انحلال فسفات معدنی را داشتند و بیشترین میزان تولید هاله حل کنندگی فسفات ۱۸/۵، ۱۸/۳، ۱۷/۶، ۱۵/۵ و ۱۴ میلی‌متر و به‌ترتیب متعلق به جدایه‌های A47، A88، F47، F55 و C16 بود. تحقیقات زیادی در زمینه باکتری‌های حل کننده فسفات و تثبیت کننده نیتروژن انجام شده است. بسیاری از این مطالعات نشان می‌دهد که استفاده از این باکتری‌ها می‌تواند سبب افزایش کارایی محصولات مختلف گردند (Chen *et al*. 2008;). نتایج بدست آمده از این پژوهش حاکی از آن است که ریزوباکترهای درختان پسته وعلف‌های هرز این باغات از توانایی زیادی در انحلال فسفات معدنی برخوردارند. مواد ترشح شده بوسیله باکتری‌ها و قارچ‌های حل کننده فسفات مانند اگزالات، لاکتات، سیترات، سوکسینات، آنیون‌های کربوکسیلیک و پروتون‌ها که منجر به کاهش pH محیط می‌شوند، در افزایش حلالیت ترکیبات فسفات کلسیم نقش دارند (Deubel and Merbach 2005). بنابراین انجام پژوهش‌های بیشتر در مزرعه و باغ برای بررسی تاثیر باکتری‌های حل کننده فسفات در خاک‌های شور توصیه می‌شود. در بررسی تاثیر تنش خشکی، گر چه افزایش سطح پلی اتیلن گلیکول در محیط NB باعث کاهش معنی دار میزان رشد جدایه‌های انتخابی گردید. اما تمامی جدایه‌ها توانستند در سطح ۲۰- بار رشد کنند. در سطح ۳۰- بار یک جدایه قادر به رشد نبود. شرایط دشوار حاکم بر باغهای پسته، مانند آب و هوای گرم وخشک، خاک‌های آهکی با pH بالا، ماده آلی کم، شوری آب آبیاری و خاک می‌تواند تا حدودی مقاومت بالای باکتری‌های ریزوسفری و غیرریزوسفری را در مقابل تنش خشکی توجیه کند. در بررسی تاثیر تنش خشکی، با افزایش سطح پلی‌اتیلن‌گلیکول در محیط NB باعث کاهش معنی‌دار میزان رشد جدایه‌های انتخابی گردید، اما تمامی جدایه‌ها توانستند در سطح ۱۰- بار رشد کنند در سطح ۲۰- بار یک جدایه و در سطح ۳۰- بار سه جدایه از یازده جدایه قادر به رشد نبودند که با نتایج ما مطابقت دارد (*et* Sarcheshmepour *al*. 2010). سلیمانی و همکاران نشان دادند در باب سنجش تنش خشکی، با حل کردن مقادیر مختلف ماده PEG 6000 در محیط کشت باکتری، قابلیت استفاده مولکول‌های آب کاهش یافته و پتانسیل اسمزی متفاوتی ایجاد شد. با افزایش غلظت PEG 6000 در محیط کشت، چگالی نوری (OD_{600}) به عنوان معیاری از رشد باکتری روند کاهشی نشان داد که با نتایج ما مطابقت دارد (Soleimani *et al*. 2015).

REFERENCES

Alexander DB, Zuberer DA (1993) Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareous soil. Biology and Fertility of Soils 16(2): 118-124.

Alippi AM, Perello AE, Sisterna MN, Greco NM, Codo CA (2000) Potential of spore-forming bacteria as biocontrol agent of wheat foliar disease under laboratory and greenhouse condition. Journal of Plant Diseases and Protection 107: 155-169.

Alström S (1987) Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. Plant and Soil 102(1): .3-9.

Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R (1998) Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). Plant and Soil 204: 57-67.

Asaka O, Shoda M (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis RB14*. Applied and Environmental Microbiology 62(11): .4081-4085.

Bano A, Fatima M (2009) Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. Biology and Fertility of Soils 45(4): .405-413.

Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology 47(9): 793-800.

Boesewinkel HJ (1976) Storage of fungal culture in water. Transactions of the British Mycological Society 66: 183- 185.

Bultreys A, Kaluzna M (2010) Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars syringae and morsprunorum race 1 and race 2. Journal of Plant Pathology S21-S33.

Castaneda GC, MunozTJJ, Videa JRP (2005) A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of *fluorescent Pseudomonas* in the presence of copper and iron Microchemical Journal 81:35-40.

Cattelan AJ, Hartel PG, Fuhrmann JJ (1999) Screening for plant growth–promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. Soil Science Society of America Journal 63(6): 1670-1680.

Chantawannakul P, Oncharoen A, Klanbut K, Chukeatirote E, Lumyong S (2002) Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. Science Asia 28(4): 241-245.

Chen Z, Ma S, Liu LL (2008) Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. Bioresource Technology 99(14): 6702-6707.

Ershad D (1971) Contribultion of phytophthora specios in Iran and their pathogensity. BBA. Belin-Dahlem. 140-87.

Fiddaman PJ, Rossall S (1993) The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology 74: 119-126.

Glick BR, Penrose DM, Li J (1998) A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology 190(1): 63-68.

Holmes B, Owen R, McMeekin T (1984) Bergeys Manual of Systematic Bacteriology.

Howell CR, Stipanovic RD (1979) Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69: 480- 482.

Keel C, Défago G (1997) Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: AC, Gange VK. Brown (Ed.): Multitrophic interaction in terrestrial system. Oxford. Blackwell Science: 24-47.

Leong J (1986) Siderophore their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. Annual Review Journal of Phytopathology 24: 187-209.

Leoni L, Ambrosi C, Petrucca A, Visca P (2002) Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth-promothing *Pseudomonas B10*. FEMS Microbiology Letters 208: 219-225.

Li J, Yang Q, Zhao LH, Zhang SM, Wang YX, Zhao XY (2009) Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29. Journal of Zhejiang University Science *Biologia* 10(4): 264-272.

Liu H, He Y, Jiang H, Peng H, Huang X, Zhang X, Thomashow LS, Xu Y (2007) Characterization of a Phenazine- Producing Strain *Pseudomonas chlororaphis GP72* with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere. Current Microbiology 54:302−306

Liu Y, Chen Z, Ng TB, Zhang J, Zhou M, Song F, Lu F, Liu Y (2007) Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis strain* B-916. Peptides 28(3): 553-559.

Mangmang JS, Deaker R, Rogers G (2015) Early seedling growth response of lettuce, tomato and cucumber to *Azospirillum brasilense* inoculated by soaking and drenching. Horticultural Science 42(1): 37-46.

Meyer JA, Abdallah MA (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis. purification and physicochemical properties. Microbiology 107(2): .319-328.

Michel BE, Kaufmann MR (1973) The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiology 51(5): 914-916.

Milagres AM, Machuca A, Napoleao D (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. Journal of Microbiological Methods 37(1): 1-6.

Mirabal Fattahi M (1366) Evaluation of crown and root rot disease of pistachio trees. Master's thesis. Department of Plant Protection. Faculty of Agriculture. University of Tehran.

Mohite B (2013) Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. Journal of Soil Science and plant Nutrition 13(3): 638-649.

Ogawa JM, English H (1991) Diseases of temperate zone tree fruit and nut crop. University of

California. Division of Agriculture and Natural Resources. 461.

O'Sullivan M, Stephens PM, O'Gara F (1991) Extracellular protease production by *fluorescent Pseudomonas* SPP and the colonization of sugarbeet roots and soil. Soil Biology and Biochemistry 23(7): 623-627.

Panjehkeh N, Saberyan A, Azad HA, Salari M (2011) Biological control of *Phoma lingam*. the causal agent of rapeseed blackleg by *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* isolates. Iranian Journal of Plant Pathology, 47(1).

Picard C, Cello I, Ventura M, Fani R, Guckert A (2000) Frequency and biodiversity of 2,4-diacetyphloroglucinol production bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. Applied and Environmental Microbiology 66:948-955.

Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Journal Biologi Science 7(2): 187-196.

Saravanakumar D, samiyappan R (2007) ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (Arechis hypogea). Journal of Applied Microbiology 102: 1283-1292.

Sarcheshmehpour M, Sovaghibi G, Saleh Rastin N, AliKhani H, Pourbaba'i A (2009). Isolation, Screening, Relative Detection and Tolerance Determination to Salinity and Drought stress in the Superior isolates of plant growth promoting rhizobacter (PGPR) of Pistachio Trees. Iranian Journal of Soil and Water Research, Volume 40, Issue 2, Pages 177-190. (In persion).

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).

Soleimani R, Tofighi H, Alikhani H (2015) The effect of drought and salinity tensions on IAA production in isolated bacteria from saline and saline-sodic soils. Soil Biology and Biochemistry, 37: 186-198.

Swadling IR, Jeffries P (1996) Isolation of microbial antagonists for biocontrol of grey mould disease of strawberries. Biocontrol Science and Technology 6(1): 125-136.

Tilak KVBR, Reddy BS (2006) *Bacillus cereus* and *B. circulans–novel* inoculants for crops. Current science, 90(5): 642-644.

Vanc CP, Uhde-Stone C, Allan DL (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. New Phytologist 157(3): 423-447.

Visca P, Imperi F, Lamont IL (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends in Microbiology 15(1): 22-30.

Weller DM (1988) Biological Control of Soilborne Plant Pathogens in the Rhizosphere with Bacteria. Annual Review of Phytopathology 26: 379-407.

Xiao R, Kisaalita WS (1998) fluorescent *Pseudomonas* pyoverdines bind and oxidize ferrous ion. Applied and Environmental Microbiology 64(4): 1472-1476.