

جداسازی و شناسایی باکتری های محرک رشد از ریزوسفر گندم و ارزیابی ویژگی های محرک رشد و مهار زیستی آنها

Isolation and identification of plant growth-promoting bacteria from the rhizosphere of wheat and evaluation of their growth-promoting and biocontrol properties

احسان حسنونند، مصطفی درویش نیا، حسین میرزایی نجفقلی*، سمیرا پاکباز

Ehsan Hasanvand, Mostafa Darvishnia, Hossein Mirzaei Najafgholi* and
Samira Pakbaz

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources,
Lorestan University, Khorramabad, Iran

*Corresponding Author, Email : پست الکترونیکی : mirzaei.h@lu.ac.ir

mirzaei.h@lu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۵/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۴)

چکیده

واژه های کلیدی

مهار زیستی،

F. graminearum

Pseudomonas

PGPR

تلقیح بذور با ریزوباکتری های بومی افزایش دهنده رشد گیاه (PGPR)، رویکردی مناسب در مدیریت سلامت، بهبود تولید و کیفیت محصولات کشاورزی می باشد. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری های افزایش دهنده رشد گیاه از ریزوسفر گیاهان گندم در شهرستان سلسله و ارزیابی ویژگی های مفید جدایه های باکتریایی می باشد. از بین ۱۰۰ جدایه باکتریایی جدا شده از خاک اطراف ریزوسفر گندم، چهار جدایه توسط غربالگری با استفاده از آزمون حلالیت فسفات انتخاب شدند. سپس توانایی چهار جدایه برتر از نظر تولید ایندول استیک اسید، سیدروفور، پروتئاز، حرکت توده ای باکتریایی، تشکیل بیوفیلم و اثر آن ها بر روی جوانه زنی بذور گندم در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. این چهار جدایه از نظر ویژگی های فنوتیپی-بیوشیمیایی بررسی و بر اساس تعیین ترادف نوکلئوتیدی ناحیه 16s rDNA با عنوان *Pseudomonas sp.*، *Acinetobacter calcoaceticus* و *Exiguobacterium sp.* شناسایی شدند. در این تحقیق، در بین چهار جدایه باکتریایی استرینی از *Pseudomonas* بیشترین میزان تولید IAA ($5/59 \mu\text{g ml}^{-1}$)، سیدروفور ($2/35 \text{ cm}$)، پروتئاز ($1/7 \text{ cm}$) و انحلال فسفات ($\mu\text{g ml}^{-1}$) را از خود نشان داد. بیشترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر *Fusarium graminearum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم مربوط به جدایه *P. brassicacearum* بود که به میزان $49/33$ درصد ارزیابی شد.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 11, Number 2, 2023

Abstract

Seed inoculation with endemic plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) is a suitable approach in health management, improving the production and quality of agricultural products. The purpose of this research is to isolate and identify plant growth enhancing bacteria from the rhizosphere of wheat plants in Selseleh city (Iran) and to evaluate the beneficial characteristics of bacterial isolates. The screening of PGPR isolates was done using tests of the ability to produce indole acetic acid (IAA), siderophore, protease, bacterial swarming motility, biofilm formation, phosphate solubility and investigating the effect of bacterial isolates on wheat seeds germination in laboratory conditions. Among the 100 bacterial isolates extracted from the soil around the rhizosphere of wheat, the best four isolates were selected. The superior isolates were identified based on their morphological and biochemical characteristics as well as the nucleotide sequence of the 16sDNA region as *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas brassicacearum*, *Exiguobacterium* sp and *Acinetobacter calcoaceticus*. In this research, *Pseudomonas* sp. strain has the highest IAA production ($5.59 \mu\text{g ml}^{-1}$), siderophore production (2.35 cm), protease production (1.7 cm) and phosphate dissolution ($390 \mu\text{g ml}^{-1}$) among four bacterial isolates. The highest percentage of inhibiting the growth of pathogenic fungus *Fusarium graminearum*, the cause of Fusarium blight disease of wheat spike, was related to *P. brassicacearum* isolate, which was evaluated as 49.33%.

Key words: Biocontrol, *F. graminearum*, *Pseudomonas* and PGPR.

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهم ترین گیاهان زراعی است که با سطح زیر کشت ۲۱۶ میلیون هکتار و تولید بیش از ۷۵۰ میلیون تن در سال ۲۰۲۰، در سطح وسیعی از زمین های کشاورزی دنیا و از جمله در ایران کشت می شود (CGIAR, 2021). سطح زیر کشت گندم در ایران حدود شش میلیون هکتار با تولید سالانه حدود ۱۳/۵ میلیون تن است. از طرفی نیاز سالانه کشور به گندم حدود ۱۴ میلیون تن است (Ahmadi et al. 2021). تامین امنیت غذایی جمعیت در حال رشد و خطرات زیست محیطی ناشی از استفاده از سموم شیمیایی، تنش های شوری، خشکی، آفات و بیماری ها از مهم ترین مسایل و چالش های پیش روی بشر می باشد (Glick, 2012). عوامل بیماری زای قارچی در صورت عدم مدیریت مناسب می توانند عملکرد سالانه کشاورزی را تا ۳۰ درصد کاهش دهند (Goswami et al. 2016). در مواجهه با مشکلات فوق، استفاده از پتانسیل زیستی خاک یا جامعه میکروبی مفید خاک اعم از باکتری ها و قارچ ها در جهت حفظ سلامت خاک های کشاورزی و کاهش مسائل زیست محیطی مفید و امید بخش می باشد. استفاده از این تکنولوژی از نظر زیستی امکان پذیر، از نظر

اکولوژیکی پایدار، از نظر اقتصادی بادوام و از نظر اجتماعی قابل پذیرش می باشد (Zortea et al. 2018). تنوع و شمار جمعیت میکروبی باکتری ها به عنوان فراوان ترین و متنوع ترین میکروارگانیسم ها در ریزوسفر گیاهان بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از خاک های غیرریزوسفری می باشد (Glick, 2012). حدود دو تا پنج درصد باکتری ها به عنوان باکتری های محرک رشد گیاه (PGPR Plant growth promoting bacteria) شناخته شده اند (Goswami et al. 2016). از نظر تکاملی به نظر می رسد که این باکتری ها حد واسط باکتری های ساپروفیت و بیماری زای گیاهی باشند. در واقع این باکتری ها، ساپروفیت هایی هستند که بدون ایجاد آسیب در میزبان، توانسته اند خود را در گیاه حفظ کنند (Vocciante et al. 2022). این میکروارگانیسم ها باعث افزایش رشد، باروری گیاه و بالا بردن تحمل گیاه در برابر تنش های محیطی و بیمارگرها می شوند (Haggag, 2010). سازوکارهای مستقیم PGPR شامل فراهم ساختن فسفر قابل جذب برای گیاه، تثبیت نیتروژن اتمسفری، جداسازی و مهیا نمودن عناصر نادر مانند آهن با استفاده از حامل های سیدروفوری و تولید هورمون های گیاهی نظیر

محیط آگار غذایی (NA) استفاده شد. پس از رشد پرگنه های باکتریایی روی محیط کشت، تک پرگنه ها براساس رنگ، اندازه و شکل ظاهری، انتخاب شدند (Schaad, 2001; Ahmadi et al., 2021).

غربالگری جدایه های باکتریایی براساس میزان انحلال فسفات: در خاک های آهکی ایران، علی رغم بالا بودن فسفر کل در خاک، به دلیل کاربرد بلندمدت کودهای فسفره و کارایی پایین آنها، وجود PH بالا، درصد زیاد کربنات کلسیم، کمی مواد آلی و خشکی خاک باعث شده است که مقدار جذب فسفر کمتر از مقدار لازم برای تامین رشد بهینه اکثر محصولات کشاورزی باشد. از این رو یکی از مهم ترین ویژگی های مورد نظر برای غربالگری جدایه های باکتریایی، بررسی میزان انحلال فسفات توسط آنها می باشد. به منظور غربالگری اولیه جدایه های باکتریایی، از محیط کشت اسپربر-آگار (Sperber Agar) استفاده شد. جدایه های باکتریایی روی محیط کشت اسپربر آگار کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. هاله شفاف اطراف کلنی باکتری ها به عنوان فعالیت مثبت باکتری در حل فسفات معدنی محسوب می شود. قطر این هاله پس از یک هفته اندازه گیری گردید. این آزمون در سه تکرار برای هر جدایه باکتریایی انجام شد (Sperber, 1985). همچنین به منظور تخمین کمی توانایی انحلال فسفات با کشت گونه های باکتری از محیط اسپربر مایع استفاده شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری ها با غلظت CFU/ml 10^9 به محیط اسپربر مایع اضافه گردید. پنج روز پس از مایه زنی و رشد باکتری ها، سوسپانسیون های باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. یک میلی لیتر از محلول رویی با سه میلی لیتر آب مقطر و یک میلی لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط گردید. پس از ۲۰ دقیقه، شدت جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه شد (Sperber, 1985).

شناسایی جدایه های باکتریایی با استفاده از روش های فنوتیپی- بیوشیمیایی و مولکولی با استفاده از ژن 16s rDNA: چهار جدایه باکتریایی که دارای بیشترین مقدار انحلال فسفات بودند، انتخاب و

جیبرلین، سیتوکین و اکسین می باشند. اثر غیرمستقیم باکتری های افزایش دهنده رشد گیاه از طریق افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش های زیستی و غیر زیستی با تشکیل ساختارهایی مانند بیوفیلم صورت می پذیرد. همچنین بسیاری از ریزجانداران خاک قادر به انحلال شکل های غیرقابل جذب کانی های معدنی فلزدار از طریق ترشح اسیدهای آلی هستند (Idris et al. 2004; Van Hamet et al., 2003). ریزوسفر خاستگاه اغلب باکتری های اندوفیت است. تشکیل بیوفیلم در باکتری ها راهکاری جهت حفظ و بقا در شرایط تنش های محیطی و حضور بیمارگرهای گیاهی می باشد. باکتری های ساکن ریزوسفر از طریق شیمی آرای به میزبان نزدیک می شوند و پس از ورود اغلب در فضای بین سلولی ریشه تکثیر می شوند (Hallmann et al. 1998). عواملی نظیر صفات ذاتی میکروارگانیسم ها، ژنوتیپ گیاه، مرحله ی رشد، وضعیت فیزیولوژیکی، نوع بافت گیاهی، شرایط محیطی و شیوه های کشاورزی، تعیین کننده ی کلونیزاسیون میکروارگانیسم ها می باشند (Brader et al. 2014). این میکروارگانیسم ها پتانسیل بالقوه ای جهت بهره مندی در صنعت کشاورزی و ارتقای کیفیت محصولات زراعی را دارند (Rosenblueth et al. 2006; Rokni et al. 2021).

با توجه به محدودیت ها از جمله تهیه نهاده های شیمیایی، آلودگی های زیست محیطی و مدیریت بیماری های خاکزی در بهبود کیفی و کمی محصولات مهمی مانند گندم، شناسایی و بررسی باکتری های بومی افزایش دهنده رشد گیاه و اختصاصی محصول گندم امری ضروری و مهم می باشد. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری های بومی ریزوسفر گندم، غربالگری جدایه های باکتریایی براساس آزمون های تولید سیدروفور، انحلال فسفات، تولید بیوفیلم، تولید هورمون ایندول استیک اسید، تولید پروتئاز، حرکت توده ای، خاصیت آنتاگونیستی و تحمل شوری می باشد.

مواد و روش ها

جداسازی پرگنه های باکتریایی از نمونه های خاک: نمونه های ریشه گندم به همراه خاک ریزوسفر از مناطق مختلف شهرستان سلسله استان لرستان در فصل بهار سال ۱۴۰۰ جمع آوری شد. به منظور جداسازی باکتری از روش کشت سری رقت متوالی بر روی

تولید ترکیبات سیدروفور توسط جدایه های باکتریایی: تشخیص نیمه کمی توان تولید سیدروفور توسط جدایه ها با استفاده از محیط Cas-Agar، به روش الکساندر و زوبر (۱۹۹۱) انجام شد (Alexander and Zuberer, 1991). جدایه هایی که قادر به تولید سیدروفور بودند، بر پایه ی تشکیل هاله نارنجی رنگ، تشخیص داده شدند. تشک های پتری حاوی جدایه های باکتریایی در سه تکرار و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

توانایی تولید پروتئاز: سنجش فعالیت پروتئازی با تلقیح ۲۰ میکرولیتر از جمعیت 10^8 CFU/ml هر جدایه باکتری به صورت لکه ای در سه تکرار بر روی محیط کشت SMA (Skim Milk Agar) با استفاده از روش انتشار در آگار انجام شد. تشک های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. فعالیت پروتئاز با ایجاد یک ناحیه شفاف در اطراف کلنی در سطح محیط کشت SMA نشان داده می شود (Jones et al. 2007).

بررسی توانایی جدایه های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم: جهت بررسی کمی و کیفی تشکیل بیوفیلم از میکروپلیت الیزا استفاده گردید (George, 2011). در این آزمون از جمعیت 10^8 CFU/ml جدایه های باکتریایی در محیط کشت LB درون چاهک های پلیت الیزا استفاده شد. سپس پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت روی شیکرانکوباتور با سرعت ۶۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس پلیت ها با محلول کریستال ویوله یک درصد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و پس از شست و شو، ساختارهای بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعد با استفاده از محلول استیک اسید ۳۰ درصد و اندازه گیری میزان جذب نوری در طول موج ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر میزان تشکیل بیوفیلم از نظر کمی مورد بررسی قرار گرفت. این آزمون در سه تکرار انجام شد (Narimani et al. 2017).

آزمون حرکت توده ای باکتری: برای انجام آزمون حرکت توده ای از محیط کشت NB استفاده گردید. پس از تهیه سوسپانسیون 1×10^8 CFU/ml از هر جدایه باکتریایی، با شست و شوی سلول های باکتریایی با بافر PBS در سه مرحله پلی ساکاریدهای خارج سلولی حذف گردید. سپس میزان ۲۰ میکرولیتر از هر جدایه باکتریایی

براساس آزمون های فنوتیپی - بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. آزمون های گرم، اکسیداز، کاتالاز، هوازی/بی هوازی، هیدرولیز نشاسته، رشد در NaCl ۵، ۷، ۱۰ و ۱۵ درصد، تولید سیانید هیدروژن، تولید آمونیاک، رشد در دمای ۴، ۲۸، ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی گراد، احیای نیتрат، هیدرولیز ژلاتین و آرژنین هیدرولاز براساس روش های استاندارد باکتری شناسی انجام شدند (Schaad et al. 2001). به منظور صحت شناسایی جدایه های باکتریایی، ابتدا DNA جدایه ها براساس کیت استخراج دی ان ای شرکت سیناژن، استخراج گردید. سپس به منظور تکثیر ناحیه ژن rDNA 16s از آغازگرهای عمومی (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و 16sF و (5'ACGGCTACCTTGTACGACT3') 16sR استفاده شد (Weisburg, 1991). واکنش زنجیره ای پلی مرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل، ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر آغازگر رفت و برگشت، ۰/۲ میلی مولار dNTP، ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ چرخه با دمای واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، سنتز در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت دو دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. پس از تکثیر ژن مورد نظر و ارزیابی کیفیت آن روی ژل آگارز یک درصد، محصول PCR برای توالی یابی به شرکت پیشگام ارسال گردید. نتیجه توالی یابی در پایگاه داده ای NCBI ارزیابی شد (Ahmadi et al. 2021).

تولید ایندول استیک اسید (IAA) توسط جدایه های باکتریایی: اندازه گیری کیفی توان جدایه ها در تولید هورمون IAA با استفاده از محیط DF صورت گرفت (Bric et al. 1991). اندازه گیری کمی توان تولید هورمون IAA با استفاده از روش رنگ آمیزی سالکوفسکی انجام شد (Glickmann and Dessaux, 1995).

میکرولیتر از ۴ جدایه باکتریایی با غلظت 1×10^6 CFU/ml با سه تکرار در چهار طرف دیسک قارچی به فاصله ۲/۵ سانتی متر به صورت خطی کشت شد. تشک های پتری در انکوباتور با دمای ۲۸ سانتی گراد نگهداری شدند و پس از گذشت هفت روز قطر پرگنه قارچ اندازه گیری و با شاهد مقایسه گردید. درصد بازدارندگی هر سویه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Moreira et al. 2014).

$$100 \times \frac{\text{پانگین رشد قارچ در تیمار - پانگین رشد قارچ در شاهد}}{\text{پانگین رشد قارچ در شاهد}} = \text{درصد بازدارندگی}$$

تجزیه و تحلیل آماری: داده های اولیه در نرم افزار Excel وارد و تجزیه های آماری با استفاده از نرم افزار SAS ver.9.2 انجام شد. مقایسه میانگین ها بر اساس روش چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی جدایه ها براساس آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی

در جداسازی اولیه تعداد ۱۰۰ باکتری از نمونه های خاک جداسازی گردید. در نهایت تعداد چهار جدایه برتر از نظر میزان انحلال فسفات، انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج آزمون های فنوتیپی-بیوشیمیایی صورت گرفته به منظور شناسایی باکتری های استخراج شده از خاک به اختصار در جدول ۱ ارائه گردیده است. به منظور تشخیص جدایه های باکتریایی علاوه بر آزمون های فنوتیپی-بیوشیمیایی، یک قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگرهای 16S-R و 16S-F طراحی شده براساس ناحیه 16S rDNA تکثیر شد (شکل ۱). پس از تکثیر، توالی یابی و بلاست کردن ناحیه تکثیر شده در پایگاه داده ای NCBI و هم چنین با توجه به نتایج آزمون های فنوتیپی-بیوشیمیایی جدایه ها شناسایی شدند. براساس خصوصیات فنوتیپی-بیوشیمیایی و توالی یابی بخشی از ناحیه ژن 16S rDNA، جدایه های باکتریایی *Pseudomonas sp.*، *A. calcoaceticus* و *P. brassicacearum*، *Exiguobacterium sp.* شناسایی شدند (جدول ۱). بعد از بلاست در پایگاه داده ای NCBI جدایه باکتریایی *Pseudomonas sp.* با شماره دسترسی OP765892 بیشترین شباهت را با جدایه های *P. koreensis* و *Pseudomonas*

روی دیسک های کاغذی شش میلی متری بر روی محیط کشت NA حاوی آگار ۰/۶ درصد قرار داده شد (Narimani et al. 2017). آزمون در سه تکرار انجام و میزان تحرک باکتری به مدت یک هفته اندازه گیری شد.

تعیین میزان تحمل جدایه های باکتریایی به نمک طعام: این آزمون با توجه به اهمیت تحمل فشار اسمزی و میزان شوری بالای زمین های کشاورزی در اکثر مناطق کشور انجام شد. بدین منظور چهار سطح شوری شامل پنج، هفت، ۱۰ و ۱۵ درصد از سدیم کلرید (NaCl) در شرایط آزمایشگاه روی جدایه های باکتریایی آزمایش شد. رشد باکتری ها پس از ۴۸ ساعت در غلظت های مختلف نمک مورد بررسی قرار گرفت (Bano and Mussarat, 2009).

آزمون جوانه زنی و کشت بذرها در شرایط آزمایشگاه: از محیط کشت NB برای تهیه مایه تلقیح جدایه های باکتریایی استفاده شد. از هر جدایه جمعیت 1×10^6 CFU/ml تهیه گردید. پس از ضد عفونی بذور توسط اتانول ۷۰ درصد و شست و شو با آب مقطر سترون، بذرها به مدت ۳۰ دقیقه درون سوسپانسیون باکتریایی تلقیح شدند. بذرها در پتری مرطوب درون اتاقک رشد در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و دوره روشنایی ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای اندازه گیری سرعت جوانه زنی، هر دوازده ساعت بذرها جوانه زده شمارش شد. تنها زمانی که طول ریشه چه به ۲ میلی متر برسد، بذر به عنوان جوانه زده به شمار می آید. در پایان روز دهم درصد جوانه زنی و شاخص بنیه اندازه گیری شدند. همه اندازه گیری ها بر پایه ی دستور کارهای ISTA انجام شد. سرعت جوانه زنی (Abdul Baki and Anderson, 1973) و شاخص بنیه (Magurie, 1962) با استفاده از معادله های زیر محاسبه شدند:

$$\text{بذرها ی جوانه زده در هر بار شمارش} \sum$$

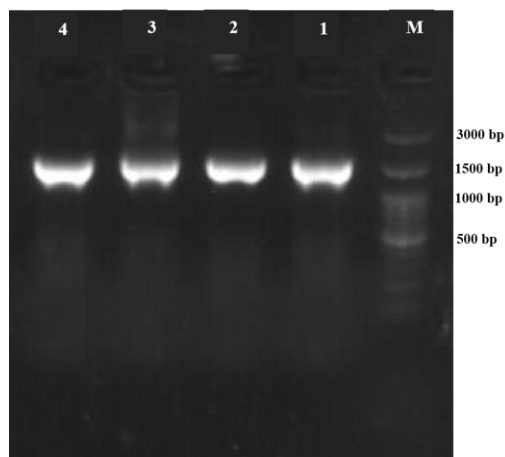
زمان شمارش

$$= \text{سرعت جوانه زنی}$$

$$\text{درصد جوانه زنی} \times (\text{میانگین طول ساقه چه} + \text{میانگین طول ریشه چه}) = \text{شاخص بنیه}$$

آزمون مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه: جهت سنجش فعالیت ضد قارچی جدایه ها، پس از کشت قارچ *F. graminearum* عامل بیماری بلایت فوزاریومی سنبله گندم در محیط کشت PDA، یک بلوک از قارچ به مرکز محیط کشت PDA اضافه گردید و ۱۰

کشت اسپربر مایع، جدایه های *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum* با $359/6 \pm 17$ و 390 ± 25 میکروگرم بر میلی لیتر فسفر بیشترین میزان حل کنندگی فسفات را نشان دادند (شکل ۴) و (جدول ۳ و ۲).



شکل ۱- محصول PCR حاصل از استفاده از جفت آغازگر 16s-F/16s-R در جدایه های نماینده. M مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی، ۱) *Pseudomonas sp.* ۲) *P. brassicacearum* ۳) *A. calcoaceticus* ۴) *Exiguobacterium sp.*

Fig 1. PCR product from using primer pairs 16s-R/16s-F in representative isolates. M 3000 bp markers, 1) *Pseudomonas sp.* 2) *P. brassicacearum* 3) *A. calcoaceticus* 4) *Exiguobacterium sp.*

sp. با شماره های دسترسی MT629852.1 و FJ786057.1 داشت. همچنین جدایه *P. brassicacearum* با شماره دسترسی OP769216 بیشترین شباهت را با جدایه های *P. brassicacearum* با شماره های دسترسی MK267297.1، OK135820.1، MT634394.1 و MT634395.1 داشت. جدایه *Exiguobacterium sp.* با شماره دسترسی OP766420، بیشترین شباهت را با جدایه های *Exiguobacterium sp.* با شماره های دسترسی MK414904.1، DQ019168.1، HF562461.1، KY962736.1 و MG758045.1 داشت. جدایه *A. calcoaceticus* با شماره دسترسی OP770352 بیشترین شباهت را با جدایه های *A. calcoaceticus* با شماره های دسترسی MN250321.1، KY753249.1، MW632034.1 و KP137409.1 داشت (شکل ۲).

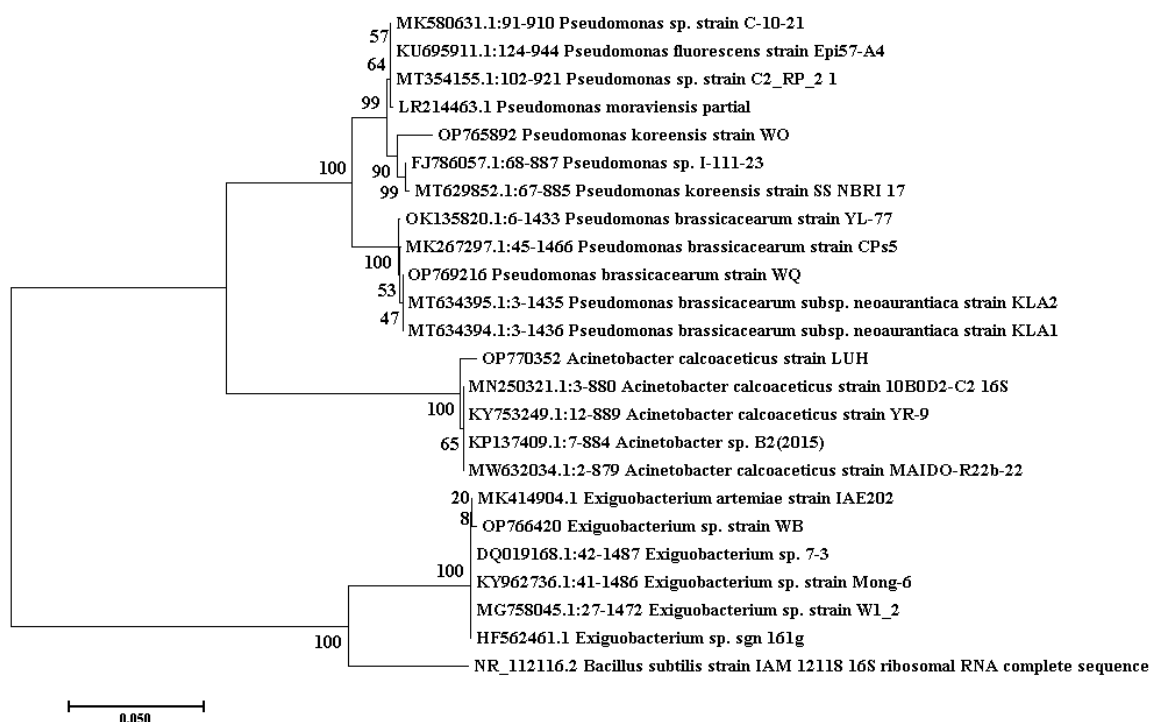
بررسی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول در جدایه ها

نتایج آزمون توانایی انحلال فسفات توسط جدایه های باکتریایی نشان داد که چهار جدایه در محیط کشت جامد توان انحلال فسفات معدنی بیشتر از سه میلی متر را داشتند. بیشترین و کمترین میزان تولید هاله حل کننده فسفات به مقدار $1/61 \pm 0/16$ و $0/0 \pm 35/06$ سانتی متر به ترتیب متعلق به جدایه های *Pseudomonas sp.* و *A. calcoaceticus* بود. همچنین روی محیط

جدول ۱- ویژگی های فنوتیپی-بیوشیمیایی باکتری های جداسازی شده از خاک ریزوسفر گندم

Table 1. Phenotypic-biochemical characteristics of bacteria isolated from wheat rhizosphere soil.

Characteristic	Isolates			
	<i>Pseudomonas sp.</i>	<i>P. brassicacearum</i>	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>Exiguobacterium sp.</i>
Gram stain	-	-	-	+
Type of metabolism	O	O	O	F
Oxidase	+	+	-	+
Catalase	+	+	+	+
starch hydrolysis	-	-	-	+
growth in NaCl (%)				
5	+	+	-	+
7	+	+	-	+
10	+	-	-	+
15	-	-	-	+
HCN production	-	+	-	-
casein hydrolysis	+	+	+	+
ammonia production	+	+	+	+
growth at				
4 °C	-	-	-	+
28	+	+	+	+
37	+	+	+	+
45	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	-	+
Gelatin hydrolysis	+	-	-	+
Arginine dihydrolase	+	+	-	+



شکل ۲- درخت تبارزایی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از خاک ریزوسفر گندم براساس تجزیه و تحلیل توالی ژن 16S rRNA توسط نرم‌افزار MEGA7 به روش Neighbor-joining با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap ساخته شد.

Fig 2. Phylogeny tree of bacterial isolates isolated from wheat rhizosphere soil based on 16S rRNA gene sequence analysis constructed by MEGA7 software using Neighbor-joining method with 1000 replicates of bootstrap test.

کمی نیز با هم مقایسه شدند. در این بررسی گونه *Pseudomonas* sp. با میانگین ۰/۲۵ بیشترین میزان جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر را نشان داد.

توانایی جدایه‌ها در تولید پروتئاز

در بررسی کیفی آزمون تولید پروتئاز، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه در محیط کشت جامد اختصاصی کازئین آگار کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بیشترین هاله شفاف ایجاد شده به ترتیب مربوط به جدایه *Pseudomonas* sp. و *P. brassicacearum* با میانگین 0.22 ± 0.14 و 0.16 ± 0.11 سانتی‌متر بود (شکل ۳).

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در تشکیل بیوفیلم

نتایج میزان تشکیل بیوفیلم توسط جدایه‌ها از روش میکروپلیت الیزا استفاده شد. بعد از رنگ‌آمیزی با استفاده از میکروسکوپ نوری ساختار بیوفیلم مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). رنگ آبی در شکل نشان‌دهنده تشکیل و اتصال ساختار بیوفیلم به چاهک

آزمون تولید ایندول استیک اسید

مقدار تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها، از ۱/۳۷ (A. *calcoaceticus*) تا ۵/۵۹ (جدایه *Pseudomonas* sp.) میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. مقدار IAA تولید شده توسط هر جدایه در جدول ۲ بیان شده است.

ارزیابی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های باکتریایی

نتایج آزمون کیفی روی محیط کشت CAS-آگار نشان داد که چهار گونه *Pseudomonas*، *P. brassicacearum*، *Exiguobacterium* sp. و *A. calcoaceticus* توانایی تولید سیدروفور را دارند. ظهور هاله‌ی نارنجی رنگ در اطراف پرگنه‌های باکتریایی نشان‌دهنده‌ی تولید سیدروفور می‌باشد (شکل ۳). در این آزمون نسبت قطر هاله به قطر کلنی در جدایه‌ها متغیر بوده و بیشترین توانایی تولید سیدروفور (بیشترین نسبت به ناحیه‌ی قطر هاله) پس از هفت روز متعلق به جدایه *Pseudomonas* sp. با نسبت 0.35 ± 0.03 سانتی‌متر بود. چهار گونه‌ای که توانایی تولید سیدروفور را دارا بودند، از نظر

با هم متفاوت و اشکال مختلفی از تحرک را نشان دادند (شکل ۴). بیشترین میزان تحرک در بین جدایه ها به ترتیب مربوط به گونه های *Pseudomonas* sp. و *P. brassicacearum* با میانگین مقادیر $36/2 \pm 3/0$ و $33/1 \pm 0/1$ سانتی متر بود (جدول ۳ و ۲).

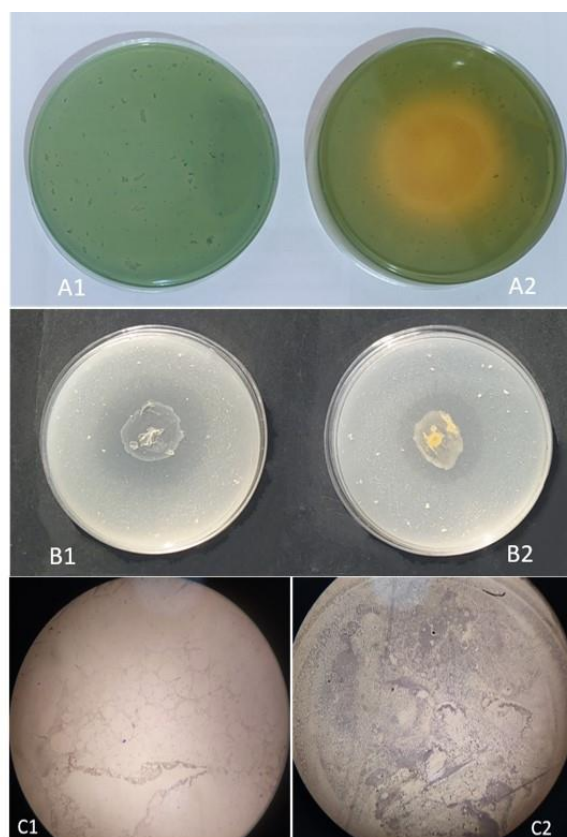
آزمون مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه

بررسی توانایی جدایه های باکتریایی در آزمون کشت متقابل حاکی از آن است که هر چهار جدایه باکتریایی قادر به جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بوده و تفاوت معنی داری با شاهد نشان دادند. میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر به ترتیب در جدایه *P. brassicacearum* با مقدار ۴۹/۳۳ درصد و کمترین متعلق به جدایه *A. calcoaceticus* با مقدار ۳۲/۳۳ درصد ارزیابی شد (جدول ۳ و ۲).

می باشد. ساختار بیوفیلم در باکتری *P. brassicacearum* دارای بیشترین میزان تراکم و گسترش بود. هم چنین کمترین میزان تراکم و گسترش بیوفیلم در بین گونه ها مربوط به گونه *A. calcoaceticus* بود. به منظور ارزیابی کمی میزان توانایی جدایه ها در تشکیل بیوفیلم از اسید استیک ۳۰ درصد در طول موج ۵۵۰ نانومتر استفاده شد. با مقایسه میانگین ها در بین گونه های مورد استفاده، گونه های *P. brassicacearum* و *Pseudomonas* sp. به ترتیب با میانگین ضریب جذب $0/139$ و $0/109$ در طول موج ۵۵۰ نانومتر بیشترین میزان تولید بیوفیلم را نشان دادند. هم چنین باکتری های *Exiguobacterium* sp. و *A. calcoaceticus* به ترتیب دارای میانگین ضریب جذب $0/069$ و $0/061$ بودند (جدول ۳ و ۲).

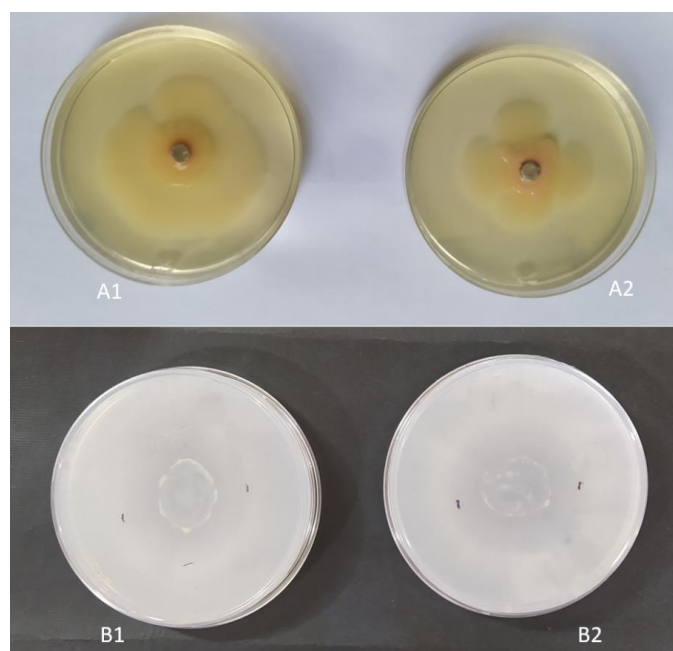
بررسی حرکت توده ای جدایه های باکتری

بررسی میزان حرکت توده ای جدایه ها روی محیط کشت NA $0/6$ درصد نشان داد که جدایه ها از نظر سرعت تحرک و نحوه حرکت



شکل ۳- تولید سیدروفور (ظهور هاله نارنجی رنگ) توسط جدایه منتخب باکتریایی بر روی محیط کشت CAS-آگار. A1) شاهد، A2) جدایه *Pseudomonas* sp. B1) تولید پروتئاز (ظهور هاله شفاف) به ترتیب در جدایه *Pseudomonas* sp. و *P. brassicacearum* (بررسی تشکیل و ساختار بیوفیلم باکتریایی در روش میکروپلیت الایزا). C1) باکتری *A. calcoaceticus* و C2) باکتری *P. brassicacearum*.

Fig 3. Production of siderophore (appearance of orange halo) by selected bacterial isolate on CAS-agar medium. A1) Control, A2) *Pseudomonas* sp. isolate. B1) Protease production (appearance of clear halo). C) Investigation of formation and the structure of bacterial biofilm by microplate ELISA method C1) *A. calcoaceticus* and C2) *P. brassicacearum*.



شکل ۴- A) حرکت توده‌ای باکتریایی روی محیط کشت NA ۰/۶ درصد. A1) *Pseudomonas sp.* A2) *Pseudomonas brassicacearum* B1) توانایی

انحلال فسفات (هاله شفاف اطراف پرگنه باکتری) بر روی محیط کشت Sperber agar توسط *Pseudomonas sp.* و *P. brassicacearum*.

Fig 4. Bacterial swarming movement on NA 0.6 percent culture medium. A1) *Pseudomonas sp.* A2) *P. brassicacearum*. B1) The ability of phosphate solubilization (clear halo around the bacterial colony) on the Sperber agar medium by *Pseudomonas sp.* and *P. brassicacearum*.

جدول ۲- تجزیه واریانس ساده فاکتورهای موثر در رشد گیاه و بازدارنده از بیمارگر قارچی.

Table 2. Simple variance analysis of effective factors in plant growth and inhibition of fungal pathogens.(average of squares)

Sources of changes	Degrees of freedom	IAA	Siderophore	Protease	Biofilm	swarming	Quantitative dissolution of phosphate	Qualitative dissolution of phosphate	Colony growth	Growth inhibition
treatment	4	15.90**	0.02**	1.03**	0.008**	5.82**	0.50**	0.54**	2.15**	1112.16**
Rep	2	0.02 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.00005 ^{ns}	0.008 ^{ns}	0.00008 ^{ns}	0.01 ^{ns}	0.008 ^{ns}	8.26 ^{ns}
C.V.	***	3.53	18.14	15.12	16.11	12.62	1.31	27.29	4.45	13.43

*** و ** به ترتیب معنی داری در سطوح ۵ و ۱ درصد، ns: سطوح غیر معنی داری

* and ** are significant at 5 and 1% levels respectively, ns: non-significant level.

جدول ۳- مقایسه میانگین فاکتورهای موثر در رشد گیاه و بازدارنده از بیمارگر قارچی *F. graminearum*

Table 3. Comparison of average effective factors in plant growth and inhibition of fungal pathogen *F. graminearum* (average)

Sources of changes	IAA	Siderophore	Protease	Biofilm	swarming	Quantitative dissolution of phosphate	Qualitative dissolution of phosphate	Colony growth	Growth inhibition
<i>Pseudomonas sp.</i>	5.59a	0.25a	1.73a	0.109b	3.36a	0.042a	1.61a	2.36c	42.33ab
<i>P. brassicacearum</i>	3.36c	0.19b	1.1b	0.139a	3.33a	0.035b	0.41b	1.83d	49.33a
<i>A. calcoaceticus</i>	1.37d	0.07c	0.50c	0.061c	1.63c	0.019c	0.35b	2.30c	39.33bc
<i>Exiguobacterium sp.</i>	3.81b	0.11c	0.30d	0.069c	2.23b	0.034b	0.56b	2.80b	32.33c
Control	0e	0d	0e	0c	0d	0d	0d	4.10a	0d

میانگین‌های با حروف مشترک در یک ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.

The average with common letters in the same column do not have a significant difference at the 5% probability level.

جدول ۴- بررسی تجزیه واریانس جدایه های باکتریایی در شاخص بنیه، سرعت جوانه زنی، درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه گندم در اتاقک رشد.

Table 4. Investigating the variance analysis of bacterial isolates in vigor index, seed germination rate, seed germination percentage, root length and stem length wheat in growth chamber. (average of squares)

Sources of changes	degrees of freedom	root length	stem length	root fresh weight	stem fresh weight	root dry weight	stem dry weight	germination percentage	germination rate	vigor index
treatment	4	2.55**	0.43**	0.03**	0.002**	0.0002**	0.00001**	19.26**	5.68**	32712**
Rep	2	0.09 ^{ns}	0.10 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.0001 ^{ns}	0.000001 ^{ns}	0.000001 ^{ns}	1.66 ^{ns}	0.01 ^{ns}	2009 ^{ns}
C.V.	***	8.40	5.37	3.85	2.77	4.83	4.01	0.42	1.1	1.34

* به ترتیب معنی داری در سطوح ۵ و ۱ درصد، ^{ns}: سطوح غیرمعنی دار

* and ** are significant at 5 and 1% levels respectively, ns: non-significant level.

جدول ۵- بررسی مقایسه میانگین اثر جدایه های باکتریایی در شاخص بنیه، سرعت جوانه زنی، درصد جوانه زنی، طول ریشه چه و ساقه چه گندم در اتاقک رشد

Table 5. Comparing the average effect of bacterial isolates in vigor index, seed germination rate, seed germination percentage, root length and stem length wheat in Growth chamber. (average)

Sources of changes	root length (cm)	stem length (cm)	root fresh weight (gr)	stem fresh weight (gr)	root dry weight (gr)	stem dry weight (gr)	germination percentage (%)	germination rate	vigor index
<i>Pseudomonas sp.</i>	5.76a	3.90b	0.66b	0.69a	0.07a	0.074a	98a	16.43a	898.87b
<i>P. brassicacearum</i>	4.26b	4.50a	0.76a	0.70a	0.063b	0.076a	96.66b	15.81b	927.44a
<i>A. calcoaceticus</i>	3.56c	3.96b	0.57c	0.67ab	0.056c	0.064bc	95.33c	13.95d	730.59c
<i>Exiguobacterium sp.</i>	4.60b	4.43a	0.56c	0.66ab	0.065ab	0.067b	94.33d	14.69c	830.81c
Control	3.5c	3.60c	0.50d	0.63b	0.046d	0.061c	91.33e	13.02e	686.31e

میانگین های با حروف مشترک در یک ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی داری با هم ندارند.

The average with common letters in the same column do not have a significant difference at the 5% probability level.

تحمل شوری

نتایج میزان تحمل جدایه ها به شوری نشان داد از بین چهار جدایه، بجز *A. calcoaceticus* مابقی جدایه ها قادر به تحمل سطوح مختلف شوری بودند. به شکلی که جدایه *Exiguobacterium sp.* شوری ۲۰ درصد، جدایه *Pseudomonas sp.* شوری ۱۰ درصد و جدایه *P. brassicacearum* شوری ۷ درصد را تحمل کردند.

توانایی جوانه زنی و قوه نامیه ی بذر

همه جدایه ها سرعت جوانه زنی بالاتر از شاهد را داشتند. بر پایه ی جدول ۵، تفاوت معنی داری بین تیمارهای حاوی باکتری و شاهد از نظر درصد جوانه زنی بذر وجود داشت. بین جدایه ها از نظر شاخص بنیه تفاوت معنی داری وجود داشت، به طوری که این شاخص از $927/44 \pm 27/40$ در جدایه *P. brassicacearum* تا $898/87 \pm 27/30$ متغیر بود (جدول ۴ و ۵).

بحث

امروزه با توجه به کاربرد بیش از اندازه کودهای شیمیایی و آلودگی های زیست محیطی ناشی از مصرف بی رویه نهاده ها در مدیریت مزارع، هدف اصلی پژوهش حاضر یافتن روش های جایگزین مناسب، کارآمد و سازگار با محیط زیست می باشد (Khosravi et al. 2015). از این رو کاربرد PGPR در افزایش رشد کمی و کیفی محصول و مبارزه با عوامل بیماری زا به دلیل داشتن خصوصیات نظیر در دسترس گیاه قرار دادن عناصر غذایی مانند فسفر، آهن، نیتروژن و گوگرد، تولید هورمون های گیاهی، کلونیزاسیون بافت های گیاهی، رقابت با بیمارگر بر سر غذا و مکان، تولید آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی، ترشح ترکیبات ضدقارچی و القا مقاومت سیستمیک به عنوان روش جایگزین و موثر، مطرح می باشد (Bhattacharyya and Jha, 2012; Mirzaei Najafgholi et al. 2018; Ashrafi et al. 2020; Aeini et al. 2015). در تحقیق حاضر ۱۰۰ جدایه بومی باکتریایی از خاک ریزوسفر گیاه گندم جداسازی

تحرك فسفر پیوند شده با عناصر آهن و آلومینیوم، آزادسازی فسفر از منابع آلی و معدنی و نیز افزایش پخشیدگی فسفر از راهکارهای دیگری است که در حضور باکتری های حل کننده فسفر در محیط منجر به افزایش حلالیت و قابلیت جذب این عنصر می گردند (Chen et al. 2008). استفاده از باکتری های حل کننده فسفات در خاک های شور از اهمیت خاصی برخوردار است. بدین منظور میزان تحمل باکتری های جدا شده نسبت به شوری بررسی گردید. چن و همکاران گزارش کردند که بیشترین میزان تحمل شوری باکتری های جدا شده از ریزوسفر چند گیاه زراعی، سه درصد کلرید سدیم بوده است. در تحقیق حاضر، جدایه های *Pseudomonas sp.*، *Exiguobacterium sp.* و *Pseudomonas brassicacearum* قادر به تحمل میزان شوری ۷ تا ۲۰ درصد بودند. در بررسی های انجام شده گونه های *Pseudomonas brassicacearum* و *Pseudomonas sp.* بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم را داشتند. شواهد زیادی دال بر اثربخشی بهتر باکتری های PGPR با میزان تشکیل بیوفیلم بالا در مقایسه با باکتری های دیگر وجود دارد. هم چنین تشکیل بیوفیلم توسط باکتری های PGPR یک استراتژی مهم در سازگاری برای بقا و توانایی کلنیزاسیون در ریزوسفر گیاهان می باشد (Ansari and Ahmad, 2018; Kasim et al. 2016). نتایج آزمایش های کشت متقابل بر رشد میسلیم قارچ بیمارگر *F. graminearum* در شرایط آزمایشگاه نشان داد که چهار جدایه باکتریایی اثر بازدارندگی بر رشد قارچ بیمارگر را دارند و قطر کلونی در مقایسه با شاهد کاهش یافته است. تحقیقات نشان می دهد که این اثرات می تواند به دلیل ترشح آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی، تولید سیدروفور و ترکیبات فرار و غیرفرار ضد قارچی باشد (Ben Abdallah et al. 2016). نتایج نشان داد که چهار سویه باکتریایی قادر به تولید آنزیم پروتئاز بودند. این آنزیم دارای توانایی مهار زیستی در برابر قارچ های بیمارگر بوده و در تجزیه دیواره سلولی قارچ های بیمارگر دخیل می باشد (Ben Abdallah et al. 2016). همچنین جدایه های مورد آزمایش در این تحقیق توانایی تولید سیدروفور را داشتند. سیدروفور در تعاملات میکروبی ریزوسفر دارای اهمیت بوده و در شرایط کمبود آهن تولید شده و با جذب آهن سبب تقویت گیاه میزبان و محدود کردن عامل بیمارگر می گردد (Eisendle et al. 2004). هورمون های گیاهی با منشا

شد که از بین آن ها چهار جدایه که دارای بیشترین میزان انحلال فسفات بودند، انتخاب و ویژگی های فنوتیپی-بیوشیمیایی و توالی ژن 16s rRNA و هم چنین اثر آن ها بر جوانه زنی گندم بررسی شد. در این بررسی استرین های باکتریایی *Pseudomonas sp.*، *Exiguobacterium sp.*، *Pseudomonas brassicacearum* و *Acinetobacter calcoaceticus* به عنوان جدایه های برتر معرفی شدند. در بررسی های پژوهشگران دیگر نیز جدایه های *Pseudomonas brassicacearum*، *Acinetobacter calcoaceticus* و *Pseudomonas sp.* به عنوان PGPR معرفی گردیده اند (Alsharif et al. 2020; Presta et al. 2016; Vanissa et al. 2020; Belimov et al. 2007). کلنیزاسیون مؤثر ریشه توسط باکتری های جنس سودموناس و تولید آنتی بیوتیک های مختلف در منطقه ریزوسفر می تواند عامل مهمی در رشد گیاه میزبان و کنترل بیماری های گیاهی به خصوص بیمارگرهای خاک زاد باشد (Weller 2007). یکی از مهم ترین راهکارهای افزایش عملکرد محصولات کشاورزی، به ویژه گیاهان گلخانه ای، فراهم کردن عناصر غذایی مورد نیاز گیاه به شکل قابل جذب در محیط رشد گیاه می باشد. فسفر یکی از عناصر غذایی ضروری برای رشد و توسعه گیاه محسوب می شود که به صورت فسفات معدنی به خاک اضافه می شود. متأسفانه بخش بزرگی از آن به صورت نامحلول در می آید و از دسترس گیاه خارج می شود. افزایش انحلال فسفر به وسیله برخی باکتری های محیط ریزوسفر می تواند سبب افزایش رشد گیاه گردد. باکتری های حل کننده فسفات نقش عمده ای در انحلال شکل غیرقابل دسترس فسفر در خاک ایفا می کنند (Richardson and Simpson, 2011). پژوهش های زیادی در زمینه باکتری های حل کننده فسفات و تثبیت کننده نیتروژن انجام شده است. بسیاری از این مطالعات نشان می دهند که استفاده از این باکتری ها می تواند سبب افزایش کارایی محصولات مختلف گردد (Vanissa et al. 2020). جدایه های جنس *Pseudomonas* در پژوهش حاضر تاثیر بسزایی بر ارتفاع ساقه چه و رشد ریشه چه در مقایسه با شاهد داشتند. براساس نتایج پژوهشی، مواد ترشح شده به وسیله باکتری های حل کننده فسفات مانند اگزالات، لاکتات، سترات، سوکسینات، آنیون های کربوکسیلیک و پروتون ها که منجر به کاهش PH محیط می شوند، در افزایش حلالیت ترکیبات فسفات کلسیم نقش دارند. افزایش رشد و ترشحات ریشه گیاه، افزایش

نتیجه گیری کلی

در بررسی حاضر استرین های باکتریایی *Acinetobacter calcoaceticus* *Pseudomonas brassicacearum* و *Pseudomonas sp.* به عنوان جدایه های برتر معرفی شدند. درک نحوه عمل، تنوع و توزیع اکولوژیکی و تعامل آن ها با محیط، به منظور بررسی سازگاری این عوامل و موفقیت آن ها در افزایش رشد گیاهان در جهت تولیدات گیاهی سالم دارای اهمیت می باشد. با توجه به اینکه سویه های باکتریایی حاضر کارایی بالای در تولید فاکتورهای موثر در رشد گیاه و هم-چنین فعالیت ضدقارچی دارند بنابراین می توان آن ها را به عنوان یک گزینه مناسب در تولید گیاهان سالم، تحت بررسی بیشتری قرار داد.

منابع

- Abdul Baki AA, Anderson JD. 1973.** Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Science* 13: 630-633.
- Aeini M, Khodakaramian G, Mirzaei Najafgholi H. 2018.** Sugar beet leaf culturable endophytic bacterial composition from the major sugar beet growing areas in the west of Iran. *Journal of Genetic Resources* 4: 105-113.
- Ahmadi A, Mirzaei Najafgholi H, Aeini M, Kakolvand K. 2021.** Isolation and identification of othello, atlantis, and puma super herbicide-resistant bacteria isolated from the soil of wheat farms. *Biological Journal of Microorganism* 10: 67-77. (In Farsi with English abstract).
- Ahmadi E, Gholamzadeh Chitgar M, Hagh Ghadam M, Heidari A. 2021.** Effectiveness of metaldehyde Lumakidin® against snails and slugs in the greenhouse of *Spathiphyllum* and lettuce field and its comparison with the efficiency of Ferricol® and Sabzarang® in ornamental flower greenhouse. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)* 44: 107-122.
- Alexander D, Zuberer D. 1991.** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of soils* 12(1): 39-45.
- Alsharif W, Saad MM, Hirt H. 2020.** Desert microbes for boosting sustainable agriculture in extreme environments. *Frontiers in Microbiology* 11: 16-26.
- Ansari FA, Ahmad I. 2018.** Biofilm development, plant growth promoting traits and rhizosphere colonization by *Pseudomonas entomophila* FAP1: a promising PGPR. *Advances in Microbiology* 8: 235.
- Ashrafi A, Salehzadeh M, Khezzinezhad N. 2020.** Detection and identification of tomato wilt disease in east Azerbaijan Province and controlling it using antagonist bacteria. *Genetic Engineering and Biosafety Journal* 9: 28-39. (In Farsi with English abstract).

میکروبی ترکیبات مهم در افزایش رشد و تحمل تنش های محیطی گیاه بوده و سبب ایجاد مقاومت نسبت به بیمارگر می شوند (Yasmin et al. 2017). هورمون ایندول استیک اسید باعث افزایش تکثیر و توسعه ریشه گیاه شده و در نتیجه موجبات افزایش مقاومت میزبان را به آلودگی بیمارگر فراهم می سازد (González-Lamothe et al. 2012). توانایی تولید هورمون ایندول استیک اسید و انحلال فسفات در هر چهار جدایه مشاهده شد. با توجه به تولید فاکتورهایی بهبوددهنده رشد گیاه مانند انحلال فسفات، تشکیل بیوفیلم، تولید سیدرفور و تولید هورمون IAA توسط جدایه های مورد بررسی، هر چهار جدایه باکتریایی در مقایسه با شاهد سبب رشد بیشتر گیاهچه های گندم در شرایط آزمایشگاه شدند. نتایج این تحقیق با نتایج Khan و همکاران (۲۰۱۹) Patel و همکاران (۲۰۲۲) و Díez-Méndez and Rivas (۲۰۱۷) مشابهت دارد.

- Bano A, Mussarat F. 2009.** Salt tolerance in *Zea mays* (L.) following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils* 45: 405-413.
- Belimov AA, Dodd IC, Safronova IV, Hontzeas N, Davies J. 2007.** *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany* 58(6): 1485-1495.
- Ben-Abdallah RA, Mejdoub-Trabelsi B, Nefzi A, Jabnoun-Khiareddin H, Daami-Remadi M. 2016.** Isolation of endophytic bacteria from *Withania somnifera* and assessment of their ability to suppress *Fusarium* wilt disease in tomato and to promote plant growth. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 7(352): 1-11.
- Bhattacharyya PN, Jha DK. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 4: 1327-1350.
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trogenitz F, Sessitsch A. 2014.** Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology* 27: 30-37.
- Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. 1991.** Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 535-538.
- Chandrashekara C, Bhatt JC, Kumar R, Chandrashekara KN. 2012.** Suppressive soils in plant disease management. pp. 241-256. In: Singh, V.K., Singh, y. & Singh, A. (eds.). *Eco-Friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management*. International Book Distributors, 682 P.
- Chen Z, Liu Sh. 2008.** Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. *Bioresource Technology* 99: 6702-6707.
- Díez-Méndez A, Rivas R. 2017.** Improvement of saffron production using *Curtobacterium herbarum* as a bioinoculant under greenhouse conditions. *AIMS microbiology* 3(3): 354-364.
- Eisendle M, Oberegger H, Buttinger R, Illmer P, Hass H. 2004.** Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-

- mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*. Eukaryotic Cells 2: 561-563.
- Glick BP. 2012.** Plant growth-promoting bacteria: Mechanisms and applications. Scientifica: 963401.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995.** A Critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology 61: 793-796.
- González-Lamothe R, Oirdi M, Brisson N, Bouarab K. 2012.** The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. Plant Cell 24: 762-777.
- Goswami D, Thakker JN, Dhandhukia PC. 2016.** Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. Cogent Food and Agriculture 2: 1-19
- Haggag WM. 2010.** Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases. Life Science Journal 7(2): 57-62.
- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Rodriguez-Kbana R, Kloepper JW. 1998.** Interaction between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. Soil Biology and Biochemistry 30(1): 925-37.
- Idris R, Trifonova R, Puschenreiter M, Wenzel WW, Sessitsch A. 2004.** Bacterial communities associated with flowering plants of the Ni hyperaccumulator *Thaspi goesingense*. Applied and Environmental Microbiology 70: 2667-2677.
- Jones B, Sun F, Marchesi JR. 2007.** Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. Letters in applied microbiology 45: 418-420.
- Kasim WA, Gaafar RM, Abou-Ali RM, Omar MN, Hewait HM. 2016.** Effect of biofilm forming plant growth promoting rhizobacteria on salinity tolerance in barley. Annals of Agricultural Sciences 61: 217-227.
- Khan MA, Asaf S, Khan AL, Ullah I, Ali S, Kang SM, Lee IJ. 2019.** Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. Annals of Microbiology 69: 797-808.
- Khosravi S, Tohidfar M. 2015.** Reduction of applied pesticides and cancer with the cultivation of transgenic crops. Genetic Engineering and Biosafety Journal 4: 1-10.
- Mirzaei Najafgholi H, Narimani S, Aeni M, Taghavi SM, Tarighi S, Javaheri M. 2015.** Investigation the performance and biological control of the various tomato cultivars against the bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*). Biocontrol in Plant Protection 2: 47-57. (In Farsi with English abstract).
- Moreira RR, Nesi CN, De-Mio LLM. 2014.** *Bacillus* spp. and *pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control glomerella leaf spot. Biological Control 72: 30- 37.
- Narimani S, Bazgir E, Mirzaei Najafgholi H. 2017.** Evaluation of effective factors on survival and activity of petroleum degradation bacteria in bioremediation process. Cellular and Molecular Researches 30: 91-99. (In Farsi with English abstract).
- O'Toole GA. 2011.** Microtiter dish biofilm formation assay. Journal of Visualized Experiments: (47): 2437
- Patel M, Patel K, Al-Keridis LA, Alshammari N, Badraoui R, Elaslali AM, Al-Soud WA, Hassan MI, Yadav DK, Adnan M. 2022.** Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria *Curtobacterium oceanosedimentum* improves growth attributes and strengthens antioxidant system in chili (*Capsicum frutescens*). Sustainability 14(7): 4335.
- Presta L, Fondi M, Perrin E, Maida I, Miceli E, Chiellini C, Maggini V, Bogani P, Di-Pilato V, Rossolini GM. 2016.** *Arthrobacter* sp. EpRS66 and *Arthrobacter* sp. EpRS71: draft genome sequences from two bacteria isolated from *Echinacea purpurea* rhizospheric soil. Frontiers in Microbiology 7: 1417.
- Richardson AE, Simpson RJ. 2011.** Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Plant physiology 156: 989-996.
- Rokni N, Alizadeh HS, Bazgir E, Darvishnia M, Mirzaei Najafgholi H. 2021.** The tripartite consortium of *Serendipita indica*, *Trichoderma simmonsii*, and bell pepper (*Capsicum annum*). Biological Control 158: 104608.
- Rosenblueth M, Martinez-Romero E. 2006.** Bacterial endophytes and interactions with hosts. Molecular Plant Microbe Interactions 19(8): 827-37.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001.** Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd edit. New York: American Phytopathology Society Press. 65-180.
- Sperber, JI. 1958.** The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9: 778-781.
- Van Hammet JD, Singh A, Ward OP. 2003.** Recent advances in petroleum microbiology. Microbiology and Molecular Biology Reviews 67(4): 503-549.
- Vanissa TTG, Berger B, Patz S, Becker M, Turečková V, Novák O, Tarkowská D, Henri F, Ruppel S. 2020.** The response of maize to inoculation with *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. in phosphorus-deficient, salinity-affected soil. Microorganisms 8(7): 1005.
- Voccianti M, Grifoni M, Fusini D, Petruzzelli G, Franchi E. 2022.** The role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in mitigating plants environmental stresses. Applied Sciences 12(3): 1231.
- Waller F, Achatz B, Kogel KH. 2007.** Analysis of the plant protective potential of the root endopytic fungus *Piriformospora indica* in cereals. Berlin Heidelberg: Spriger-Verlag 45: 343-354.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Bacteriology Research 173(2): 697-703.
- Yasmin S, Hafeez FY, Mirza MS, Rasul M, Hafiz MI, Arshad HMI, Zubair M, Iqbal M. 2017.** Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. Frontiers in Microbiology 8: 1-23.
- Zortea RB, Maciel VG, Passuello A. 2018.** Sustainability assessment of soybean production in Southern Brazil: A life cycle approach. Sustainable Production and Consumption 13: 102-112.