

جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر خیار و ارزیابی توان آنتاگونیستی آن‌ها به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک

صمد رفیعی، غلام‌خدا کرمان

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

مسئول مکاتبات: غلام‌خدا کرمان، پست الکترونیک: Khodakaramian@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۹/۲۲

۷۵-۵۹ (۲) ۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۳/۲۷

چکیده

سودوموناس‌های فلورسنت گروه مهمی از باکتری‌های محرک رشد به‌شمار می‌آیند که می‌توانند به‌صورت مستقیم و یا غیرمستقیم رشد گیاهان را بهبود بخشیده و یا عوامل بیماری‌زای گیاهی را محدود و یا سرکوب نمایند. هدف از این پژوهش دستیابی به جدایه‌های فلورسنت آنتاگونیست مؤثر علیه بیماری لکه زاویه‌ای در ریزوسفر خیار بود. برای انجام این تحقیق، طی سال‌های ۹۲-۱۳۹۱، ۱۲۰ جدایه‌ی باکتریایی از ریزوسفر خیار در مناطق مختلف استان همدان جداسازی شد که در این میان ۲۵ جدایه به‌لحاظ فنوتیپی به دو گونه‌ی *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* تعلق داشت. سپس، در شرایط آزمایشگاه، علاوه بر تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌ها در مقابل *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (عامل بیماری لکه زاویه‌ای خیار)، برخی ویژگی‌های تحریک‌کنندگی این جدایه‌ها نیز بررسی شد. براساس بررسی‌های آزمایشگاهی، پنج جدایه‌ی (BSU630، BSU390، BSU205، BSU161 و BSU391) با قطر هاله بازدارندگی بیشتر از هفت میلی‌متر، برای بررسی‌های بعدی در شرایط گلخانه‌ای انتخاب شد. محدوده‌ی قطر هاله بازدارندگی برای این پنج جدایه از ۷/۶۶ تا ۲۲ میلی‌متر مشخص شد. همچنین در این ارزیابی، اثر جدایه‌های باکتریایی در کنترل توسعه‌ی بیماری از طریق تعیین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری و افزایش بیوماس گیاه خیار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی گلخانه‌ای نشان داد که جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 کارایی بیوکنترلی بالایی دارند. در شرایط گلخانه‌ای این جدایه‌ها به‌تنهایی در مقایسه با گیاه شاهد، در سطح احتمال ۵٪ باعث افزایش ارتفاع گیاه و وزن خشک گیاه شدند. از این‌رو، جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 در کنترل بیماری لکه زاویه‌ای خیار و افزایش رشد به‌عنوان ریزوباکتری‌های محرک رشد یا در مدیریت تلفیقی بیماری پتانسیل استفاده را دارند و لازم است کارایی این جدایه‌ها در شرایط مختلف مزرعه نیز مورد بررسی قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: لکه زاویه‌ای خیار، کنترل بیولوژیک، خیار، ریزوباکتری

مقدمه

جایگزینی سموم و کودهای شیمیایی با موادی که بتوانند در عملیات کشاورزی پایدار مورد استفاده قرار گیرند، بدون این‌که محیط‌زیست را تحت تأثیر قرار دهند، ضروری به نظر می‌رسد (Prabhat et al., 2013). از این‌رو، استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاهان و عوامل بیوکنترل می‌تواند پتانسیل قابل توجهی برای افزایش رشد و کنترل بیماری در گیاهان داشته باشد. بر این اساس، آن دسته از باکتری‌هایی که از یک طرف از طرق مختلف از قبیل تولید تنظیم‌کننده‌های رشد، حل فسفات، افزایش قابلیت جذب برخی از

امروزه، افزون بر کمبود مواد غذایی و عدم دسترسی بخشی از جمعیت جهان به حداقل کالری مورد نیاز در جیره متعارف، اگر غذای روزانه عامه مردم به مواد شیمیایی زائد در خاک و آب آلوده باشد، به‌روشنی می‌توان گفت که سلامت انسان‌ها در معرض آسیب‌های جدی قرار گرفته است. با توجه به وجود باقیمانده‌های سموم شیمیایی در فرآورده‌های کشاورزی و به دنبال آن، بروز آسیب‌های فراگیر در تندرستی مصرف‌کنندگان آن فرآورده‌ها،

به‌خصوص نسبت کربن به ازت نشان می‌دهند (Haas & Defago, 2005).

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، همان باکتری‌های آزادی و مفید خاک هستند که می‌توانند از طریق مکانسیم‌های مختلف باعث افزایش رشد گیاه شوند (Saharan & Nehra, 2011). این باکتری‌ها از جمله سودوموناس‌های فلورسنت می‌توانند به‌طور غیرمستقیم و یا مستقیم، رشد گیاه را افزایش دهند. مکانسیم‌های غیرمستقیم شامل تولید آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتری‌های پاتوژن، کاهش یا ممانعت از دسترسی پاتوژن‌های گیاهی به آهن از طریق تولید سیدروفورها در ریزوسفر، تولید و ترشح آنزیم‌های لیزکننده دیواره سلولی قارچ‌ها و رقابت با میکروارگانسیم‌های مضر برای کلونیزه کردن ریشه گیاهان می‌باشند. مکانسیم‌های مستقیم شامل افزایش فسفر قابل دسترس، تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی از جمله اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها و در نتیجه، افزایش تحمل گیاه به تنش‌هایی مانند شوری، خشکی، عناصر سنگین و آفت‌کش‌ها در گیاه است (Glick, 2012). همچنین، ریزوباکتری‌ها می‌توانند با تولید اسیدهای آلی باعث هوادیدگی سنگ‌ها و کانی‌ها شوند و عناصر معدنی موردنیاز گیاهان از جمله روی، آهن، منگنز و غیره را آزاد کنند و در اختیار آن‌ها قرار دهند (Illmer *et al.*, 1995; Ahemad & Khan, 2012).

به‌دلیل خاک‌زی بودن اکثر بیمارگرهای گیاهی، سودوموناس‌های فلورسنت گزینه مناسب و مهم در کنترل بیولوژیک این بیماری‌ها به‌شمار می‌آیند. این موضوع در مورد ریزوسفر خیار کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. در یک مطالعه باکتری‌های اندوفیت ریشه و اندام‌های هوایی خیار مورد بررسی قرار گرفت که طی آن باکتری‌های اندوفیت متعددی معرفی شدند. اما در خصوص این که آیا اندوفیت‌های جدا شده قابلیت تحریک رشد خیار را دارند یا نه، مطالعه‌ای انجام نشد (McInroy & Kloepper, 1995) در بررسی دیگری، ملکی و همکاران استرین *Pseudomonas fluorescens strain CV6* را از ریزوسفر خیار استخراج کردند که به ۱۱ عامل بیماری‌زای گیاهی

ریزمغذی‌ها و غیره، موجب افزایش رشد گیاه شوند و از طرفی، به‌طور هم‌زمان بتوانند بیش از یک بیماری را در یک میزبان گیاهی کنترل نمایند، در برنامه‌های کنترل بیولوژیک از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (Prabhat *et al.*, 2013).

از طرف دیگر، موضوع مهم و اساسی در کنترل بیولوژیک، قدرت استقرار و کلنیزاسیون عوامل بیوکنترل می‌باشد. چراکه اغلب محققین، کلنیزاسیون را یکی از فرآیندهای بیوکنترل محسوب کرده‌اند و حتی از دیدگاه برخی دیگر، کلنیزاسیون شرط لازم و اساسی برای بیولوژیک است (Beneduzi *et al.*, 2012). به عبارت دیگر، برای این که یک عامل بیولوژیک بتواند خصوصیات بیوکنترلی خود را بروز دهد، حتماً بایستی قادر به کلنیزاسیون باشد. اگر یک باکتری، آنتی‌بیوتیک فراوان، سیدروفور زیاد، تنظیم‌کننده‌های رشدی مناسب و ... تولید کند اما نتواند کلنیزاسیون موفقی انجام دهد، نمی‌تواند جزو عوامل بیولوژیک تلقی شود (Glick, 2012).

رشد گیاهان در خاک‌های کشاورزی توسط عوامل زنده و غیرزنده زیادی تحت تأثیر قرار می‌گیرد. به‌عبارت دیگر، گیاهان زیستگاه‌هایی وسیعی می‌باشند که رشد جامعه میکروبی را فراهم می‌کنند. این زیستگاه‌ها شامل گیاهانی هستند که به‌لحاظ رطوبت و مواد غذایی غنی بوده و برای رشد باکتری‌ها ایده‌آل می‌باشند. برعکس، بخش‌هایی از گیاهان از لحاظ مواد غذایی فقیر بوده و همیشه در معرض تنش‌های محیطی قرار گرفته و زیستگاه‌های مناسبی برای باکتری‌ها به‌شمار نمی‌آیند (Bhattacharjee & Jha, 2012).

براساس برآوردهای انجام شده جمعیت میکروبی منطقه‌ی ریزوسفر ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از سایر بخش‌های خاک است (Glick, 2012). در این میان، سودوموناس‌های فلورسنت از فراوان‌ترین باکتری‌ها در ریزوسفر می‌باشند. ریزوسفر محیطی دینامیک بوده و به‌طور مداوم در حال تغییر است. سودوموناس‌های فلورسنت به‌دلیل برخورداری از سیستم‌های مختلف و متعدد تنظیم‌کننده‌های ژنتیکی پاسخ‌های مناسبی به تغییرات شرایط محیطی

تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت آگار غذایی منتقل و کشت داده شدند. تشتک‌های کشت داده شده در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از رشد مناسب باکتری‌ها، براساس رنگ و شکل ظاهری، سه کلنی از کلنی‌های متفاوت انتخاب و در تشتک‌های پتری محتوی محیط کشت آگار غذایی منتقل و خالص‌سازی شدند. جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت نیز با استفاده از محیط کشت افتراقی King's B انجام شد (King et al., 1954). برای بررسی‌های بعدی، جدایه‌های انتخاب شده به‌صورت سوسپانسیون در آب مقطر سترون و مخلوط آب مقطر سترون و گلیسرین به ترتیب در یخچال و فریزر نگهداری شدند. خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استرین‌ها مطابق روش‌های استاندارد شناسایی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Klement et al., 1990; Schaad et al., 2001). همچنین شناسایی مولکولی جدایه‌ها براساس جفت آغازگر طراحی شده (5'-TTGATCCTGGCTCAGATT-3') PFSSF و (5'-AAAGTTCATTGGATGTC AA-3') PFSSR برای ژن 16S rDNA انجام شد. باکتری عامل بیماری لکه زاویه‌ای خیار نیز (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) از آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه شیراز تهیه شد.

ارزیابی قابلیت تولید متابولیت‌های میکروبی

به‌منظور بررسی دقیق‌تر قابلیت تحریک رشد خیار توسط جدایه‌های انتخاب شده، تولید برخی از متابولیت‌های میکروبی این جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی تولید هورمون اکسین توسط جدایه‌ها از روش بنت و همکاران با کمی تغییرات (۲۰۰۰) استفاده شد (Bent et al., 2000). به‌این ترتیب که پس از ۲۴ ساعت از کشت باکتری محیط کشت TSB (Tryptone Soybean Broth) در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و یک میلی‌لیتر از محلول رویی به چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی (Salkowski reagent) (۱۵۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ ۹۸ درصد، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن نیم مولار (FeCl₃·6H₂O))،

اثرات آنتاگونیستی قابل توجهی نشان داد (Maleki et al., 2010).

استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت در تولیدات کشاورزی، بستگی به دانش و آگاهی ما از روابط بین آن‌ها و گیاهان و همچنین توانایی ما در حفظ، تکثیر و تغییر جمعیت باکتری‌های مفید در شرایط مزرعه‌ای دارد (Hallmann et al., 1997). پر واضح است که بیشتر سودوموناس‌های فلورسنت، حتی آن‌هایی که بخش کوچکی از جامعه‌ی میکروبی گیاه را تشکیل می‌دهند، می‌توانند عملکردهایی داشته باشند که به لحاظ زیست‌محیطی و کشاورزی حائز اهمیت باشد.

باتوجه به سطح زیر کشت قابل توج خیار در استان همدان و همچنین نظر به اهمیت شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست و به‌کارگیری آن‌ها در کنترل بیماری‌های باکتریایی، مطالعه حاضر باهدف جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت مرتبط با ریزوسفر خیار و ارزیابی اثرات آنتاگونیستی آن‌ها به‌منظور کنترل بیماری لکه زاویه‌ای خیار در شرایط گلخانه‌ای انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

به‌منظور استخراج و جداسازی ریزوباکتری‌های محرک رشد، طی بازدیدهای به‌عمل آمده از مزارع و گلخانه‌های زیر کشت خیار در استان همدان، بوته‌های شاداب و دارای رشد مطلوب به‌همراه ریشه و خاک اطراف ریشه نمونه‌برداری و برای بررسی‌های بعدی و استخراج ریزوباکتری‌ها به آزمایشگاه منتقل شد. استرین‌های باکتریایی با استفاده از روش سری رقت و محیط‌های کشت King's B و آگار غذایی (Nutrient Agar) استخراج و جداسازی شدند. به این منظور، ابتدا خاک نمونه‌های جمع‌آوری شده از منطقه ریزوسفر بوته‌های خیار جمع‌آوری شده و سپس از نمونه خاک هر بوته یک گرم برداشته و در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حل شده و رقت‌های مختلف آن‌ها به‌طور سریال تهیه شد. یک میلی‌لیتر از هر رقت با استفاده از پیت‌پاستور سترون به درون

درون انکوباتور نگهداری شدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌ها، کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ اولیه زرد به رنگ کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و آجری تغییر می‌کند. بر این اساس توانایی تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌های مورد نظر در چهار سطح تولید خیلی کم (کرم رنگ)، کم (قهوه‌ای روشن)، زیاد (قهوه‌ای تیره) و خیلی زیاد (آجری رنگ) مورد ارزیابی قرار گرفت (Alstrom & Burns, 1989).

برای بررسی توان تولید سیدروفور جدایه‌ها از محیط کشت CAS-Agar (Universal Chrome Azurol S) حاوی یک درصد آهن از نوع $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ بود، استفاده شد. بدین منظور محیط CAS-Agar به مقدار ۳۰ میلی‌لیتر در تشتک‌های پتری سترون پخش و پس از بستن کامل محیط، با تیغ استریل به چهار قسمت مساوی تقسیم شد. سپس سوسپانسیون تازه هر جدایه به مقدار ۱۰ میکرولیتر در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری تلقیح شد. از جدایه PGPR به‌عنوان شاهد مثبت در همان محیط کشت استفاده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۹۶-۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ اولیه آبی محیط به نارنجی و با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی‌رنگ تشکیل شده، ارزیابی شد (Alexander & Zuberer, 1991).

به‌منظور بررسی توانایی تولید آمونیوم، از روش کاپوچینو و شرمن (Cappuccino & Sherman, 1992) استفاده شد. تمامی جدایه‌ها در لوله‌های آزمایش حاوی محیط پپتون واتر (peptone water) کشت شده و به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۳۶ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. سپس در هر لوله آزمایش ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف نسلر (Nessler's reagent) ریخته شد. تغییر رنگ محیط از قهوه‌ای تا زرد نشان‌گر تولید آمونیوم توسط باکتری مورد نظر بود.

ارزیابی فعالیت‌های آنزیمی

به‌منظور تعیین توانایی جدایه‌ها در تولید پروتازاز از روش پیشنهادی کریم و همکاران (۲۰۰۶) با کمی تغییرات استفاده شد. برای انجام این آزمون به محیط کشت آگار

مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید هورمون ایندول استیک اسید توسط استرین‌ها از مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد IAA محاسبه شد.

برای بررسی توان جدایه‌ها در انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول از محیط کشت پیکوسکایا (Pikovskaya, 1948) استفاده شد. بدین منظور باکتری‌های مورد نظر در محیط کشت پیکوسکایا (PVK) (شامل عصاره مخمر (۰/۵ گرم)، گلوکز (۱۰ گرم)، فسفات کلسیم (۵ گرم)، سولفات آمونیوم (۰/۵ گرم)، کلرید پتاسیم (۰/۲ گرم)، سولفات منیزیم (۰/۱ گرم)، سولفات منگنز (۰/۰۰۱ گرم)، سولفات آهن (۰/۰۰۱ گرم)، کلرید سدیم (۰/۲ گرم)، آگار (۱۵ گرم) و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) به‌صورت نقطه‌ای کشت شدند. تشتک‌های پتری به مدت ۷-۳ روز در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. توانایی حل فسفات توسط باکتری با اندازه‌گیری هاله روشن در اطراف کلنی باکتری‌ها ارزیابی شد (Illmer et al., 1995).

تعیین توانایی جدایه‌ها در تولید سیانید هیدروژن از روش پیشنهادی لورک، اصلاح شده توسط آلستروم و بورنر (۱۹۸۹) با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا جدایه‌های مورد نظر در محیط کشت King's B کشت شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری و سوسپانسیون باکتری‌ها تهیه شد. سپس برای هر جدایه سه تشتک پتری حاوی محیط کشت King's B که دارای ۰/۵ درصد گلابسین بود، تهیه شد. هر پتری با ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری مورد نظر تلقیح شد. یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد در قسمت درب پتری قرار داده شد. تشتک بدون باکتری نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای جلوگیری از خروج متابولیت‌های فرار و سیانید هیدروژن، تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلیم به‌طور کامل مسدود شدند. تشتک‌های پتری به‌صورت وارونه به مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس در

به‌میزان ۱۵ گرم در لیتر بود، کشت شدند. تشک‌های پتری چند روز در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. تشکیل هاله شفاف در اطراف محل رشد باکتری‌ها نشانگر تولید سلولاز بود. آزمون‌های تولید آنزیم اوره‌آز و ژلاتیناز نیز به روش شاد و همکاران انجام شد (Schaad *et al.*, 2001).

ارزیابی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه

به‌منظور ارزیابی میزان بازدارندگی ریزوباکتری‌های خیار علیه باکتری عامل لکه زایه‌ای خیار در شرایط آزمایشگاهی، از روش کشت متقابل (Dual culture) و بخار کلروفرم با کمی تغییر استفاده شد (Ryan *et al.*, 2004). به این صورت که باکتری‌های جداشده از ریزوسفر خیار به‌صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشک‌های پتری و به فاصله یک سانتی‌متر از حاشیه آن‌ها از چهار طرف تشک‌های پتری حاوی محیط کشت King's B، مایه‌زنی شدند. در نمونه شاهد، به‌جای کشت باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. نمونه‌ها به‌مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد کامل، لکه‌های باکتریایی به کمک پنبه آغشته به الکل ۹۶ درصد به‌طور کامل پاک شدند. برای اطمینان از پاک شدن و از بین رفتن کامل باکتری‌ها، از بخار کلروفرم استفاده شد. دو قطره کلروفرم به درب تشک‌ها ریخته شد و تشک‌های پتری به‌صورت وارونه در زیر هود قرار داده شدند. پس از ۳۰ دقیقه، درب تشک‌ها برداشته شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه زیر هود هوادهی شدند تا اثر کلروفرم از بین برود. سپس سوسپانسیون باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شده و دو میلی‌لیتر از آن به تشک‌های هوادهی شده اضافه و به‌صورت چمنی پخش شد. تشک‌ها به‌مدت ۷۲-۴۸ ساعت در دمای ۲۵-۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. اثر استرین‌های ریزوسفر علیه باکتری بیمارگر از طریق اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده ایجاد شده در پیرامون باکتری آنتاگونیست ارزیابی شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای انتخاب

غذایی مقدار ۰/۲ گرم در لیتر کازئین اضافه و باکتری‌ها به‌صورت لکه‌ای در این محیط، کشت شدند. پس از نگهداری در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۴۸-۲۴ ساعت، به تشک‌های پتری مقداری محلول اسیدی کلرور جیوه اضافه شد. تشکیل هاله روشن در اطراف کلنی باکتری‌ها دلیل بر تولید پروتئاز و هیدرولیز کازئین توسط باکتری‌های مورد بررسی بود (Carrim *et al.*, 2006).

برای بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید لیپاز از روش سیرا (Sierra 1957) استفاده شد. برای این منظور به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت پایه (NA) مقدار ۰/۰۱ گرم کلرور کلسیم اضافه شد و پس از اتوکلاو مقدار یک درصد توئین ۸۰ استریل به آن افزوده شد. پس از خشک شدن سطح محیط کشت در هر پتری جدایه‌های باکتریایی به‌صورت نقطه‌ای کشت شدند. پیدایش هاله‌ای تیره توأم با رسوب ذرات متراکم کریستال در اطراف کلنی‌ها مؤید واکنش مثبت باکتری‌ها به آزمون لیپاز و هیدرولیز توئین بود.

برای بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آمیلاز مطابق روش شاد و همکاران (Schaad *et al.*, 2001) با کمی تغییر عمل شد. به این صورت که به محیط پایه آگار غذایی ۰/۲ درصد نشاسته اضافه شد. باکتری‌ها به‌صورت خطی در این محیط، کشت شدند. پس از ۹۶-۷۲ ساعت، تشکیل هاله روشن در اطراف محل رشد باکتری‌ها در اثر ریختن محلول لوگول دلیل بر تولید آمیلاز توسط باکتری مورد بررسی بود. توانایی جدایه‌ها در تولید کیتیناز طبق روش کوپن و همکاران (Kopen *et al.*, 1996) با کمی تغییر بررسی شد. به محیط پایه آگار غذایی ۰/۱ درصد کیتین کلونیدی اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه باکتری مورد نظر به روش لکه‌ای در تشک‌های حاوی این محیط کشت شد. تشک‌ها به‌مدت حدود ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید پکتیناز با تشکیل هاله‌ی شفاف در اطراف کلنی ارزیابی شد.

بررسی توان تولید سلولاز جدایه‌ها به روش پیشنهادی میلر (Miller, 1974) انجام شد. باکتری‌های مورد نظر به‌صورت لکه‌ای در محیط کشت M9 که شامل عصاره مخمر به‌میزان ۱/۲ گرم، سلولز به‌میزان ۱۰ گرم و آگار

خشک شوند. برای آماده‌سازی مایع تلقیح عامل بیمارگر، سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا با جذب نوری ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر (10^8 cfu/ml) تهیه شد.

آماده‌سازی گلدان‌ها و کاشت بذور

برای آماده کردن خاک گلدان از مخلوط خاک باغچه، ماسه و کود حیوانی پوسیده به نسبت ۱:۲:۲ استفاده شد. ابتدا خاک و کود حیوانی غربال و سپس هر سه جزء کاملاً مخلوط شد و اجزاء به نسبت مساوی در گلدان‌ها قرار گیرند. در مرحله‌ی بعد، مخلوط حاصل در داخل دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس به مدت دو ساعت استریل شد. سپس حدود دو کیلوگرم از خاک استریل شده در داخل گلدان‌هایی به قطر ۲۰ سانتی‌متر ریخته شد. بعد از آماده شدن گلدان‌ها، بذور آغشته شده به باکتری‌های آنتاگونیست با سوسپانسیون باکتری بیمارگر اسپری شده و در هر گلدان یک بذر در عمق سه سانتی‌متری خاک گلدان کشت شد. بعد از کاشت بذور، ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر به خاک گلدان در اطراف محل کاشت بذور، اضافه گردید. برای اطمینان از آلودگی گیاهچه‌های خیار و تجدید قدرت بیماری‌گری عامل بیماری‌زا، در مرحله‌ی سه برگی چند میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر توسط سرنگ به ساقه گیاهچه‌های خیار تزریق شد. گلدان کشت شده با بذر بدون باکتری به عنوان شاهد مثبت و گلدان کشت شده با بذر آغشته به باکتری بیمارگر به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. گلدان‌های کشت شده به مدت حدود ۵۵ روز در دمای ۲۵-۲۰ درجه‌ی سلسیوس در گلخانه نگهداری شدند. بعد از رشد کامل بوته‌ها، نتایج فاکتورهای مورد بررسی ثبت و بوته‌های خیار برداشت شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از اندازه‌گیری وزن تر و طول ریشه و ساقه، بوته‌های خیار به مدت سه روز در دمای ۶۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند تا به طور کامل خشک شوند. سپس وزن خشک ساقه و ریشه بوته‌ها اندازه‌گیری شد و تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده انجام شد.

به منظور مشاهده اثر باکتری‌های آنتاگونیست روی رشد گیاه خیار در زمان تیمار شدن گیاهان با باکتری

جدایه‌های مناسب جهت به‌کارگیری در شرایط گلخانه، میانگین داده‌ها از طریق آزمون حداقل دامنه‌ی معنی - دار (Least Significant Range, LSR) مورد مقایسه قرار گرفت و نماینده‌های مناسب انتخاب شدند (Aliye et al., 2008).

بررسی‌های گلخانه‌ای

آغشته‌سازی بذر با باکتری‌های آنتاگونیست

بذرهای خیار گلخانه‌ای رقم هدیه که از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان تهیه شده بود، به مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ضد عفونی سطحی شدند. سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو انجام شد تا هیپوکلریت آن به طور کامل زدوده گردید. به منظور آغشته‌سازی بذور به باکتری‌های آنتاگونیست از روش ولر و کوک (Weller & Cook, 1983) با کمی تغییر استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا یک لوپ کامل از کشت تازه هر جدایه آنتاگونیست روی محیط آگار غذایی به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع غذایی (Nutrient broth) منتقل شد و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. سپس سلول‌های باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ و برای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی، چند بار با محلول نمک فیزیولوژیک (۱۴ مول NaCl) شستشو شدند. سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ مجدد از این محلول جداسازی شده و سوسپانسیون 1×10^9 آن‌ها با استفاده از منحنی استاندارد با روش اسپکتروفتومتری در محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز (CMC) تهیه شد. بذور خیار گلخانه‌ای درون سوسپانسیون باکتریایی ریخته شدند و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با ۷۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. در تیمار شاهد مثبت بذور درون کربوکسی متیل سلولز یک درصد فاقد باکتری و در تیمار شاهد منفی، بذور در سوسپانسیون باکتری بیمارگر حاوی کربوکسی متیل سلولز یک درصد غوطه‌ور شدند. بذور آغشته شده به باکتری‌های آنتاگونیست به مدت حدود شش ساعت در معرض هوای استریل هود قرار داده شد تا به طور کامل

با نرم‌افزار SAS، با استفاده از نرم‌افزار minitab به روش Arc Sin مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

به‌منظور دستیابی به جدایه‌های مفید بیولوژیک و تحریک‌کننده رشد گیاه، حدود ۱۲۰ جدایه باکتری از مزارع و گلخانه‌های زیرکشت خیار در مناطق مختلف استان همدان جداسازی و خالص‌سازی شد. از باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر خیار، تعداد ۳۶ جدایه گرم مثبت و ۸۴ جدایه گرم منفی بودند. از باکتری‌های گرم منفی ۲۵ جدایه سودوموناس فلورسنت تشخیص داده شدند. براساس آزمون‌های غربالگری اولیه، پنج جدایه از بین سودوموناس‌های فلورسنت انتخاب و خصوصیات آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های انتخاب شده بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استاندارد تعیین شد (جدول ۱). به‌منظور تشخیص دقیق، شناسایی مولکولی جدایه‌های انتخاب شده بر اساس ژن 16S rDNA نیز انجام شد (جدول ۲). بر این اساس، پنج جدایه انتخاب شده با عنوان *Pseudomonas fluorescens* BSU390، *P. fluorescens* BSU630، *P. putida* BSU205 و *P. putida* BSU161 و *chlororaphis* BSU391 تشخیص داده شدند (شکل ۱).

تولید متابولیت‌های میکروبی

به‌منظور بررسی دقیق‌تر خصوصیات آنتاگونیستی جدایه‌های انتخاب شده، فعالیت‌های آنزیمی و تولید برخی از متابولیت‌های ثانوی توسط این جدایه‌ها مورد ارزیابی واقع شد (جدول ۳). نتایج حاصل از ارزیابی میزان تولید هورمون اکسین توسط جدایه‌های انتخاب شده نشان داد که جدایه‌های BSU390 و BSU205 به‌ترتیب با تولید ۱۹۱/۸۷ و ۱۷۹/۵۳ میکروگرم در میلی‌لیتر اکسین به‌عنوان جدایه‌های برتر از نظر تولید اکسین در نظر گرفته شدند. همچنین نتایج حاصل نشان داد که میزان تولید اکسین با طول ساقه، ریشه و وزن تر گیاه خیار دارای هم‌بستگی مثبت است. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این بررسی، مشخص شد که تمامی جدایه‌های مورد بررسی توانایی تولید سیدروفور و آمونوم را داشتند که در بین جدایه‌های مورد بررسی، جدایه‌های

آنتاگونیست به‌تنهایی و همچنین در حالت تیمار گیاه با باکتری آنتاگونیست به همراه باکتری بیمارگر، شاخص محرک رشد (Growth Promotion Efficacy) از طریق فرمول $GPE = [(G_T - G_C)/G_C] \times 100$ محاسبه شد که در آن G_T میزان رشد در گیاه تیمار شده و G_C میزان رشد در گیاه کنترل است (Aliye et al., 2008).

ارزیابی بیماری

میزان بیماری گیاهان خیار در زمان‌های مختلف بر اساس علائم ظاهر شده در روی بوته‌ها به‌صورت درصد میزان بیماری ثبت گردید و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (Area Under Disease Progress Curve, AUDPC) بر اساس روش گرت و ماندت (Garrett & Mundt, 2000) با فرمول زیر محاسبه شد:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^{n-1} (0.5(x_i + x_{i+1}))(t_{i+1} - t_i)$$

در این فرمول t_i فاصله اولین یادداشت برداری با دومین یادداشت برداری به صورت روز، x_i درصد میزان بیماری در ارزیابی i ام و n نیز تعداد کل روزهایی است که بیماری مورد ارزیابی واقع شده است. با توجه به این که در این فرمول میزان بیماری به درصد و زمان نیز به‌صورت روز مورد استفاده قرار گرفته است، واحد AUDPC به‌صورت درصد روز (%-day) بیان شده است (Garrett & Mundt, 2000).

کارایی کنترل بیولوژیک مطابق روش گو و همکاران (۲۰۰۴) از طریق فرمول $BCE = [(D_C - D_T)/D_C] \times 100$ محاسبه شد (Guo et al., 2004). در این فرمول D_C میزان بیماری در گیاه کنترل منفی و D_T میزان بیماری در گیاهان تیمار شده با باکتری‌های آنتاگونیست می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SAS 9.1 SAS institute و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون حداقل دامنه‌ی معنی‌دار (LSR, $P < 0.05$) انجام شد. نرمال بودن پراکنش داده‌ها قبل از آنالیز آماری

درحالی است که جدایه BSU391 قادر به حل فسفات در محیط کشت PVK نبود. جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 توانایی قابل توجهی را در حل فسفات نشان دادند. در آزمون تعیین مقاومت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین، جدایه‌های BSU390 و BSU630 نسبت به این آنتی‌بیوتیک مقاومت نشان دادند، درحالی که بقیه جدایه‌ها حساس به این آنتی‌بیوتیک بودند.

BSU390 و BSU205 بیشترین میزان سیدروفور را نسبت به سایر جدایه‌ها تولید کردند. در مورد آزمون تولید سیانید هیدروژن نتایج به دست آمده مشخص کرد که جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 بیشترین و جدایه BSU391 کمترین میزان تولید سیانید هیدروژن را داشتند. از نظر میزان تولید سیانید هیدروژن جدایه BSU161 در حد متوسط تعیین شد.

نتایج حاصل از آزمون حل فسفات نشان داد که جدایه BSU161 بیشترین توانایی را در حل فسفات داشت. این

جدول ۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سودوموناس‌های فلورسنت.

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of fluorescent pseudomonads.

Character	Isolates				
	BSU161	BSU205	BSU390	BSU630	BSU391
Levan production	-	-	-	-	-
Gram reaction	-	-	-	-	-
Fluorescent on King's B	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+
Aerobic growth	+	+	+	+	+
Growth at 40°C	-	-	-	-	-
Growth at 4°C	+	+	+	+	+
Hypersensitive reaction	+	-	-	-	+
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Growth in 5% NaCl	+	+	+	+	+
Potato soft rot	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	+	+	+
Gelatin hydrolysis	-	-	+	+	+
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	+	+	+
Utilization of:					
Sorbitol	-	-	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+
Trehalose	-	-	+	+	+
Manitol	-	-	+	+	+
Sodium tartrate	-	-	+	+	+

+ واکنش مثبت؛ - واکنش منفی

+; Positive reaction, -: Negative reaction

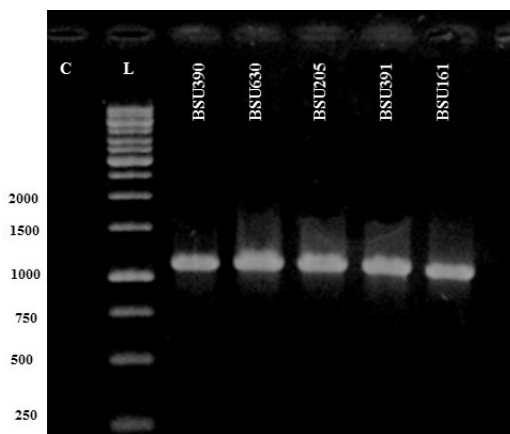
خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه

در بررسی کشت متقابل، همه سودوموناس‌های فلورسنت (۲۵ جدایه) روی باکتری عامل بیماری لکه زاویه‌ای خیار (*Pseudomonas syringae* pv.

براساس نتایج حاصل از بررسی فعالیت‌های آنزیمی جدایه‌های مورد نظر، مشخص شد که جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 فعالیت‌های آنزیمی تقریباً مشابهی را دارند. به عبارت دیگر این جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز بودند، درحالی که قابلیت تولید آنزیم‌های پکتیناز، کیتیناز و سلولاز را نداشتند.

P. chlororaphis KR864900 BASU391
 شکل ۱- قطعه ۱۲۰۰ بازوی تکثیر شده از ژن 16S rRNA جدایه‌های آنتاگونیست به‌دست آمده از ریزوسفر خیار در ژل آگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. C شاهد منفی و L نشانگر جرم مولکولی.

Fig. 1. The 1200 bp fragment from the 16S rRNA gene of isolated strains from cucumber rhizosphere in 1.5 % agarose gel stained with etidium bromide. C: Negative control, L: 1kb DNA ladder.



(*lachrymans*) مورد بررسی قرار گرفتند. براین اساس،

جدایه‌های BSU161، BSU630، BSU205، BSU390 و BSU391 به ترتیب با داشتن متوسط هاله بازدارندگی ۲۲، ۲۱/۳، ۲۰/۳، ۱۱/۶ و ۷/۶ میلی‌متر در مقابل باکتری بیمارگر، مؤثرترین جدایه‌ها از این نظر انتخاب شدند. سایر جدایه‌ها یا قادر به ایجاد هاله‌ی شفاف نبودند و یا هاله‌ی نامشخصی را ایجاد کردند. بنابراین، در این آزمون مشخص شد که جدایه‌های BSU390، BSU630، BSU205 و BSU161 کتترل بیماری لکه زاویه‌ای خیار را دارند (جدول ۴).

جدول ۲- مشخصات استرین‌های باکتریایی مفید تحرک کننده رشد گیاه خیار.

Table 2. Characteristics of the cucumber plant growth promoting bacterial strains.

Bacterial species	NCBI accession number	Strain
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	KP412237	BASU390
<i>P. protegens</i>	KP676935	BASU630
<i>P. putida</i>	KP676933	BASU205
<i>P. putida</i>	KR864899	BASU161

جدول ۳- ویژگی‌های تحریک کننده رشد و فعالیت‌های آنزیمی باکتری‌های انتخاب شده آن‌ها.

Table 3. Plant growth promoting features and enzymatic activities of selected bacteria.

Character	Isolates				
	BSU391	BSU205	BSU390	BSU630	BSU161
HCN production	+++	+++	+++	+++	++
IAA production (µg/ml)	139.84	179.53	191.87	153.26	145.65
P-Solubilization activity	++	++	++	++	+++
Motility	+	+	+	+	-
Resistance to streptomycine	-	-	+	+	-
Ammonia production	+	+	+	+	+
Siderophore production	+	+	+	+	+
Cellulase	-	-	+	-	-
Lipase	+	-	-	+	-
Protease	+	+	+	+	-
Chitinase	+	-	-	-	+
Amylase	+	+	-	+	+
Urease	-	+	+	+	+
Pectinase	+	-	-	-	-
Gelatinase	+	+	+	+	-

- منفی؛ + مثبت؛ ++ تولید کننده متوسط؛ +++ تولید کننده خوب

- Negative; + positive; ++ medium producer; +++ good producer

جدول ۴- بازدارندگی رشد *P. syringae* pv. *lachrymans* در محیط King's B، میانگین هاله‌ی بازدارندگی و میزان آنتاگونیستی باکتری‌های آنتاگونیست.

Table 4. Inhibition of *P. syringae* pv. *lachrymans* colony growth on KB medium, mean diameter of inhibition zone and degree of antagonism of the bacterial antagonists.

Strain	Bacterial species	Mean diameter of inhibition zone (mm) ^x	Degree of antagonism ^y
BSU390	<i>P. fluorescens</i>	22.000 ^a	++++
BSU205	<i>P. putida</i>	21.333 ^{ab}	+++
BSU630	<i>P. fluorescens</i>	20.333 ^b	+++
BSU161	<i>P. putida</i>	11.667 ^c	++
BSU391	<i>P. chlororaphis</i>	7.667 ^d	+
<i>Psl</i> + DSW ^z	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	00.000	-
CV (%)		4.39	

^x میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شدند، در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

^y ضعیف "+" (قطر هاله بازدارندگی ۱۰-۱ میلی‌متر)، متوسط "++" (قطر هاله بازدارندگی ۲۰-۱۱ میلی‌متر)، قوی "+++ (قطر هاله بازدارندگی ۳۰-۲۱ میلی‌متر) و خیلی قوی "++++" (قطر هاله بازدارندگی بیشتر از ۳۰ میلی‌متر) (Arsenijevic et al., 1998).
^z کنترل (آب مقطر استریل).

^x Values of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

^y Weak '+' (width of inhibited growth area 1–10 mm), medium '+ +' (11–20 mm), strong '+ + +' (21–30 mm), very strong '+ + + +' (over 30 mm) (Arsenijevic et al., 1998).

^z The control (distilled sterile water).

بررسی‌های گلخانه‌ای

بسیار خوب عمل می‌کند. در طول ارزیابی توانایی باکتری‌های آنتاگونیست در کنترل بیولوژیک لکه زاویه‌ای خیار در شرایط گلخانه، از زمان تیمار گیاهان با باکتری‌های آنتاگونیست تا ۴۵ روز پس از تیمار، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در ۴۵ روز پس از تیمار، باکتری‌های BSU390، BSU205، BSU630 و BSU161 به‌طور معنی‌داری ($P < 0.0001$) میزان بیماری را به ترتیب ۷۵، ۶۷ و ۳۶٪ کاهش دادند. در ۵۵ روز پس از تیمار، جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 به‌صورت معنی‌داری میزان بیماری را به ترتیب ۸۱، ۷۲ و ۶۵٪ نسبت به تیمار شاهد کاهش دادند ($P < 0.0001$). جدایه BSU391 تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد (شکل ۳).

در بررسی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها روی بیماری لکه زاویه‌ای خیار در شرایط گلخانه، بر اساس نتایج کشت متقابل و میزان هاله بازدارندگی ایجاد شده، پنج جدایه انتخاب و خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها در مقابل باکتری *P. syringae* pv. *lachrymans* و اثر تحریک‌کنندگی رشد آن‌ها روی خیار مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). ارزیابی‌های اولیه مؤید این بود که همه جدایه‌ها به جز جدایه BSU391 به‌طور معنی‌داری باعث افزایش رشد در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های مورد بررسی شد (جدول ۵). نتایج حاصل از بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که باکتری آنتاگونیست BSU390 به‌صورت بسیار معنی‌داری چه در کنترل بیماری لکه زاویه‌ای خیار و چه در افزایش رشد گیاه،

جدول ۵- اثر افزایش رشد (GPE) باکتری‌های آنتاگونیست به کار برده شده به تنهایی و همراه با باکتری بیمارگر *P. syringae* pv. *lachrymans* روی بیوماس گیاه خیار در شرایط گلخانه‌ای.

Table 5. Growth promotion effect (GPE) of applying bacterial antagonists alone, and in the presence of *P. syringae* pv. *lachrymans* on biomass of cucumber plant grown under greenhouse conditions.

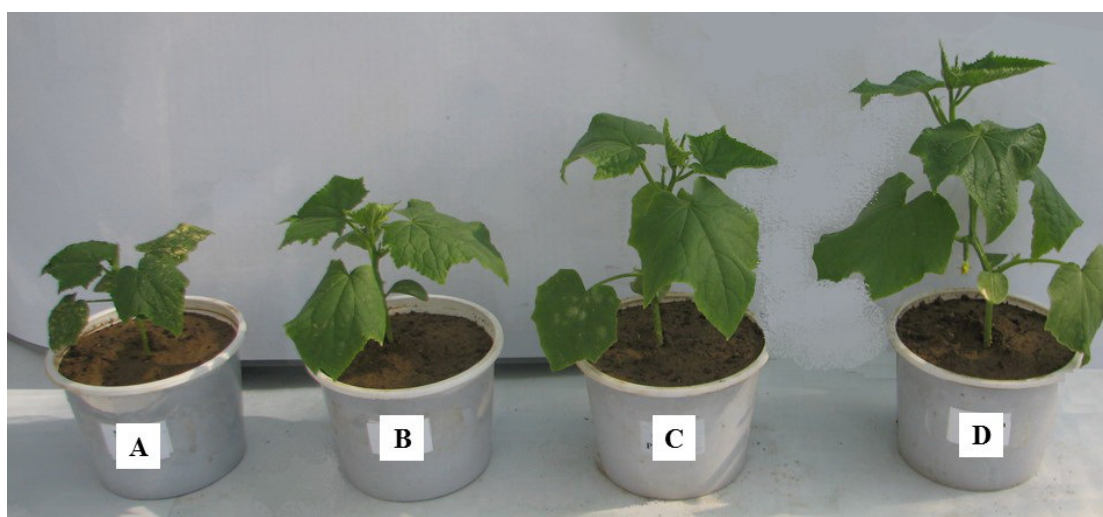
Treatment	Bacterial species	Plant height (cm) ^y	GPE (%) ^x	Fresh weight (g) ^y	GPE (%)	Dry matter (g) ^y	GPE (%)
Bacterial antagonist alone							
BSU390	<i>P. fluorescens</i>	65.3 ± 0.6 ^{a*}	52.0	46.6 ± 1.1 ^a	68.8	6.8 ± 0.1	74.3
BSU205	<i>P. putida</i>	64.3 ± 2.0 ^a	49.5	44.3 ± 2.1 ^{ab}	60.5	6.5 ± 0.6	66.6
BSU630	<i>P. fluorescens</i>	62.3 ± 1.5 ^a	44.9	44.2 ± 2.0 ^{ab}	60.1	6.4 ± 0.2	64.1
BSU161	<i>P. putida</i>	52.7 ± 2.5 ^c	22.5	35.7 ± 2.2 ^d	29.3	5.3 ± 0.9 ^e	35.9
BSU391	<i>P. chlororaphis</i>	43.7 ± 1.5 ^d	1.6	29.0 ± 0.6 ^c	5.0	4.1 ± 0.2 ^g	5.1
Bacterial antagonist + <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>							
<i>Psl</i> +BSU390		58.7 ± 1.5 ^b	36.5	42.4 ± 1.0 ^{bc}	53.6	6.1 ± 0.3 ^b	56.4
<i>Psl</i> +BSU205		58.0 ± 2.0 ^b	34.9	40.0 ± 2.0 ^c	44.9	5.7 ± 0.3 ^c	46.1
<i>Psl</i> +BSU630		56.0 ± 1.7 ^b	30.2	40.7 ± 2.1 ^{bc}	47.4	5.9 ± 0.8 ^d	51.3
<i>Psl</i> +BSU161		51.0 ± 1.7 ^c	18.6	32.5 ± 1.8 ^d	17.7	4.4 ± 0.9 ^f	12.8
<i>Psl</i> +BSU391		41.0 ± 1.0 ^d	-	28.1 ± 0.5 ^c	1.8	3.9 ± 0.5 ^g	-
The controls							
negative control	<i>Psl</i>	25.3 ± 0.7 ^e	-	10.5 ± 0.4 ^f	-	1.6 ± 0.2 ^h	-
positive control	-	43.0 ± 1.0 ^d	-	27.6 ± 0.4 ^e	-	3.9 ± 0.1 ^g	-
CV (%)		3.6		7.0		2.9	

^x شاخص محرک رشد (Growth Promotion Efficacy) با فرمول $GPE = [(G_T - G_C)/G_C] \times 100$ محاسبه شده است که در آن G_T میزان رشد در گیاه تیمار شده و G_C میزان رشد در گیاه کنترل است.
^y میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شدند، در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.
 * اعداد شامل میانگین داده‌ها ± انحراف معیار

^xGPE was calculated based on 'GPE = [(GT - GC)/GC] × 100'; where, GPE is growth promotion efficacy, GT is growth promotion by the treatment group, and GC is growth by the control.

^yValues of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

*Values are the mean ± SD



شکل ۲- بررسی اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر شاخص‌های رشد خیار و قابلیت بیوکنترل *A P. syringae* pv. *lachrymans* = گیاه بیمار (کنترل منفی)، B= شاهد (کنترل مثبت)، C = تیمار آنتاگونیست و بیمارگر، D = تیمار آنتاگونیست.

Fig. 2. Effect of antagonistic isolates on growth promoting efficacy and biocontrol of *P. syringae* pv. *lachrymans* A; negative control, B; positive control, C; antagonist and pathogen treatment, D; ; antagonist treatment.

جدول ۶- اثر باکتری‌های آنتاگونیست مورد بررسی بر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری ناشی از *P. syringae* pv. *lachrymans* و کارایی بیوکنترلی باکتری‌های آنتاگونیست.

Table 6. Effect of antagonistic bacterial strains on *P. syringae* pv. *lachrymans* disease incidence expressed as area under disease progress curves (AUDPC) in cucumber plant and biocontrol efficacy.

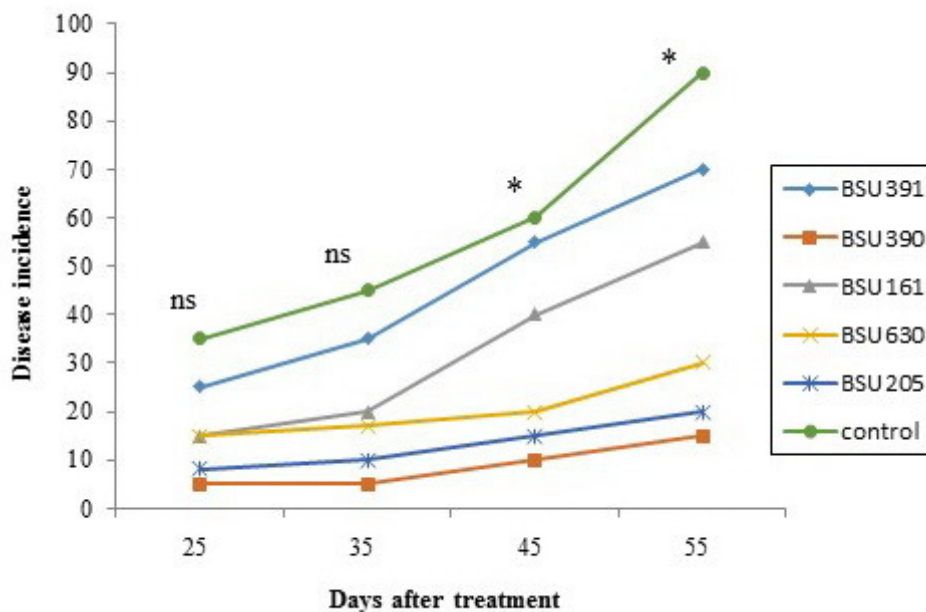
Strain	Bacterial species	AUDPC (%-day) ^x	Biocontrol efficacy(%) ^y
BSU390	<i>P. fluorescens</i>	220 ^f	86/9
BSU205	<i>P. putida</i>	350 ^e	79/1
BSU630	<i>P. fluorescens</i>	558 ^d	66/7
BSU161	<i>P. putida</i>	920 ^c	45/1
BSU391	<i>P. chlororaphis</i>	1335 ^b	20/2
<i>PsI</i>	<i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	1675 ^a	-

^x میانگین‌هایی که با حروف مشابه نشان داده شدند، در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی‌داری ندارند.

^y کارایی بیوکنترلی (Biological Control Efficiency) با فرمول $BCE = [(D_C - D_T)/D_C] \times 100$ محاسبه شده است که در آن D_C میزان رشد در گیاه کنترل منفی و D_T میزان بیماری در گیاه تیمار شده است (Guo et al., 2004).

^xValues of each column followed by the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$).

^yBiological control efficacy was calculated according to $BCE = [(D_C - D_T)/D_C] \times 100$ where D_C is disease of control and D_T is disease of the treatment group (Guo et al., 2004).



شکل ۳- پیشرفت بیماری لکه‌ی زاویه‌ای خیار (توسعه‌ی علائم) و میزان بیماری بذرهای تیمار شده خیار (رقم هدیه) با باکتری‌های آنتاگونیست مختلف (*Pseudomonas fluorescens* BSU390, *P. fluorescens* BSU630, *P. putida* BSU205, *P. putida* BSU161 and *P. chlororaphis* BSU391) در خاک تلقیح شده با باکتری پاتوژن *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. باکتری‌های آنتاگونیست از طریق آغشته شدن بذرهای خیار در سوسپانسیون آن‌ها (10^8 cfu/ml) به کار برده شدند. بذرهای کنترل با آب مقطر استریل تیمار شدند. ns و * به ترتیب معنی‌دار نبودن و معنی‌دار بودن تفاوت‌ها ($\alpha=0.05$) میان تیمارها در مدت زمان بعد از تیمار را نشان می‌دهد.

Fig. 3. Bacterial angular leaf spot disease progress (symptom development) expressed as disease incidence on cucumber cultivar 'Hedieh' treated by different antagonistic bacterial strains (*Pseudomonas fluorescens* BSU390, *P. fluorescens* BSU630, *P. putida* BSU205, *P. putida* BSU161 and *P. chlororaphis* BSU391) in inoculated soil with the *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. Antagonists were applied by dipping seeds in aqueous suspensions (10^8 cfu/ml). Control seeds were treated with water only. ns and * indicate absence and presence of significant differences (Least Significant Range Test, $\alpha = 0.05$) among treatments at a particular day after treatment, respectively.

هاله‌ی با‌ذارندگی بزرگ‌تری را علیه *Ralstonia solanacearum* ایجاد کردند.

با این وجود، فعالیت‌های آنتاگونیستی جدایه‌های *P. fluorescens* و *P. putida* علیه پاتوژن‌های بیمارگر خیار کمتر مورد بررسی واقع شده است. در این بررسی تفاوت کمتری بین هاله‌ی با‌ذارندگی تولید شده توسط جدایه‌ی BSU390 باکتری *P. fluorescens* و جدایه‌ی BSU205 باکتری *P. putida* وجود داشت. با این وجود اختلاف معنی‌دار نبود.

با وجود این که اثرات آنتاگونیستی باکتری‌های آنتاگونیست بر علیه باکتری عامل لکه زاویه‌ای خیار تاکنون مورد مطالعه واقع نشده است، اما اثرات این باکتری‌ها علیه سایر پاتوژن‌ها در مطالعات متعددی مورد بررسی واقع شده است. بر این اساس، نتایج حاصل از این بررسی در خصوص اثرات آنتاگونیستی باکتری‌های مورد بررسی، با نتایج بیشتر مطالعات انجام شده مطابقت داشت و این مطالعات مشخص کردند که جدایه‌های سودوموناس فلورسنت به‌طور معنی‌داری از رشد باکتری پاتوژن جلوگیری می‌کند (Ran *et al.*, 2005; Henok *et al.*, 2007; Lemessa & Zeller, 2007; Maleki *et al.*, 2010). گزارش کردند که تولید سیدروفور و ایندول استیک اسید توسط *P. fluorescens* نقش اصلی و مهم را در با‌ذارندگی از رشد باکتری پاتوژن بازی می‌کنند.

در بین پنج باکتری فلورسنت بررسی شده در شرایط گلخانه‌ای، بیشترین میزان افزایش در بیوماس گیاهی (ارتفاع و وزن خشک گیاه)، کاهش میزان بیماری و بیشترین کاهش AUDPC توسط جدایه‌های BSU390 *P. fluorescens*، BSU205 *P. putida* و BSU630 *P. fluorescens* ثبت شد. علاوه بر این، جدایه‌های مذکور رشد باکتری پاتوژن را سرکوب کرده و باعث افزایش ارتفاع و وزن خشک گیاه در هر دو حالت حضور و عدم حضور باکتری پاتوژن شد. به‌نظر می‌رسد کنترل بیماری توسط این جدایه‌ها علاوه بر خصوصیات تحریک‌کنندگی رشد، به تولید ترکیب اسید سالیسیلیک هم مرتبط باشد. به احتمال زیاد، سالیسیلیک اسید تولید شده به‌وسیله این جدایه‌ها در ریزوسفر

میزان بیماری در قالب AUDPC نیز به‌طور معنی‌داری توسط باکتری‌های آنتاگونیست مورد بررسی تحت تأثیر قرار گرفت. گیاهان تیمار شده با جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 می‌میزان AUDPC ($P < 0.0003$) کمتری را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند. این بررسی نشان داد که هم‌بستگی خوبی بین نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی و نتایج گلخانه‌ای وجود داشت ($r=0.8999$). کارایی بیوکنترلی که توسط AUDPC محاسبه گردید، از ۲۰/۲ تا ۸۶/۹ متغیر بود و بالاترین کارایی بیوکنترلی به ترتیب متعلق به جدایه‌های BSU390، BSU205 و BSU630 بود (جدول ۶).

بحث

پنج جدایه‌ی باکتریایی آنتاگونیست که در مطالعه‌ی حاضر برای ارزیابی توانایی آنتاگونیستی بر علیه باکتری پاتوژن لکه زاویه‌ای خیار در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند، توانایی آنتاگونیستی متفاوتی را نشان دادند. در بین جدایه‌های مورد مطالعه، جدایه‌های سودوموناس BSU390، BSU205 و BSU630 به ترتیب بیشترین توانایی آنتاگونیستی را نشان دادند. مکانیسم‌های دخیل در توانایی آنتاگونیستی این باکتری‌ها می‌تواند شامل تولید سیدروفور، هورمون اکسین، آنتی‌بیوتیک و سیانید هیدروژن و یا ترکیبی از این‌ها باشد (Beneduzi *et al.*, 2012). این موضوع می‌تواند دلیل محکمی بر انتخاب جدایه‌های مورد مطالعه برای بررسی‌های گلخانه‌ای باشد. فعالیت‌های آنتاگونیستی جدایه‌های *P. fluorescens* و *P. putida* علیه باکتری‌ها و قارچ‌های پاتوژن متعددی در شرایط آزمایشگاهی توسط مطالعات مختلف دیگری نیز گزارش شده است (Lemessa & Zeller, 2007; Aliye *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2014). در شرایط آزمایشگاهی فعالیت‌های آنتاگونیستی جدایه‌های *P. fluorescens* توسط رامش و فادک (۲۰۱۲) نیز گزارش شده است (Ramesh & Phadke, 2012). این محققان نشان دادند که جدایه‌های ERG6 و EB69 نسبت به بقیه‌ی جدایه‌های مورد بررسی سودوموناس‌های فلورسنت،

بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان دادند. در این بررسی مشخص شد که جدایه‌های BSU205 و BSU630 جداشده از ریزوسفر ریشه خیار، از یک طرف به واسطه‌ی داشتن خصوصیات تحریک‌کننده‌ی رشد گیاه مانند تولید هورمون اکسین، سیدروفور، پروتئاز و توانایی حل فسفات و از طرف دیگر به دلیل نداشتن خصوصیات آسیب‌رسان و زیان‌آور مانند تولید سلولاز و پکتیناز، می‌توانند به‌عنوان عوامل بیوکنترل مؤثر در تحریک رشد گیاه به‌همراه کاهش شیوع بیماری مطرح شوند. جدایه‌ی BSU390 علیرغم این که خصوصیات تحریک‌کننده‌ی رشد گیاه را دارا می‌باشد، اما با توجه به قابلیت تولید آنزیم سلولاز، این جدایه باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد.

با این حال بررسی‌های بیشتر در خصوص اثرات چندگانه آنتاگونیستی جدایه‌های جمع‌آوری‌شده مناطق مختلف کشور برای مطالعه‌ی قدرت آنتاگونیستی و تحریک‌کنندگی رشد این باکتری‌ها، باعث حصول اطمینان بیشتر نسبت به نتایج این مطالعه می‌شود. با وجود مطالعات متعدد انجام شده در خصوص خصوصیات آنتاگونیستی باکتری‌های مورد مطالعه، به‌نظر می‌رسد بررسی‌های زیاد دیگری نیز برای اثبات کارایی این جدایه‌ها با هدف کاربرد آن‌ها در شرایط مزرعه مورد نیاز است.

در ایجاد پدیده مقاومت ISR دخالت دارد (Maurhofer *et al.*, 1998). با وجود این که این موضوع در مطالعه حاضر مورد بررسی قرار نگرفته است، اما به‌نظر می‌رسد بررسی بیشتر موضوع در مطالعات بعدی مورد نیاز باشد. مطالعات آلیه و همکاران (۲۰۱۲) قدرت کنترل صدرصدی جدایه‌ی *P. fluorescens* EB69 بر علیه باکتری *R. solanacearum* را نشان داد (Aliye *et al.*, 2008).

یکی از ویژگی‌های مهم سودوموناس‌های فلورسنت قدرت و توانایی آن‌ها در کلنیزاسیون ریزوسفر ریشه‌ی گیاهان به‌شمار می‌آید. در مطالعه‌ی حاضر، جدایه‌های *P. putida* BSU161، *P. chlororaphis* BSU391 با وجود این که برخی از خصوصیات تحریک‌کنندگی رشد گیاه از قبیل توانایی حل فسفات و تولید ایندول استیک اسید و سیانید هیدروژن را دارا بودند، اما نتوانستند میزان بیماری را به‌طور معنی‌داری کاهش دهند. به‌نظر می‌رسد این دو جدایه قادر به کلنیزاسیون مناسب در ریزوسفر ریشه نمی‌باشد. لذا مطالعات بعدی در این خصوص مورد نیاز می‌باشد.

با وجود این که جدایه‌های *P. fluorescens* BSU390، *P. putida* BSU205 و *P. fluorescens* BSU630 از ریزوسفر خیار در مناطق جغرافیایی مختلف کشت خیار در استان همدان جداسازی شده بود، اما نتایج یکسانی را در

References

- Ahemad, M. & Khan, M.S. 2012. Evaluation of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide-stress. *Annals Microbiology*, 62: 1531-1540.
- Alexander, D.B. & Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 2: 39-4.
- Aliye, N., Fininsa, C. & Hiskias, Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control*. 47: 282-288.
- Alstrom, S. & Burns, R.G. 1989. Cyanid production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, 7: 232-238.
- Arsenijevic, M., Obradovic, A., Stevanovic, D. & Ivanovic, M. 1998. Antagonistic effect of some saprophytic bacteria to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*, IOBC Bulletin, 21 (9): 297-300.

- Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35, 4 (suppl): 1044-1051.
- Bent, E. Tuzan, S. Chanway C.P. & Enebak, S. 2000. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 793-800.
- Bhattacharjee P.N. & Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327-1350.
- Cappuccino, J.C. & Sherman, N. 1992. *Microbiology: A Laboratory Manual*. Third ed. Benjamin/Cummings Publishing Companies based in New York, pp. 125-179.
- Carrim, A.J.I., Barbosa E.C. & Gonalves Vieira, J.D. 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-docampo). *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 49: 353-359.
- Garrett, K.A. & Mundt, C.C. 2000. Host diversity can reduce potato late blight severity for focal and general patterns of primary inoculum. *Phytopathology*, 90: 1307-1312.
- Glick, B.R. 2012. *Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications*. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica.
- Guo, J.H., Qi, H.Y., Guo, Y.H., Ge, H., Gong, L.Y., Zhang, L.X. & Sun, P.H. 2004. Biocontrol of tomato wilt by growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, 29, 66-72.
- Haas, D. & Défago, G. 2005. Biological control of soilborne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review of Microbiology*, 3: 307-319.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43: 895-914.
- Henok, K., Fassil, A. & Yaynu, H. 2007. Evaluation of of *Pseudomonas fluorescens* isolates as biocontrol agents against bacterial wilt caused by *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*. *Pest Management Journal of Ethiopia*, 11: 9-18.
- Illmer, P., Barbato, A. & Schinner, F. 1995. Solubilization of hardy soluble AlPO₄ with P- solubilizing microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 265-270.
- King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 44: 301-307.
- Klement, Z., Rudolph, K. & Sand, D.C. 1990. *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado Budapest, 540pp.
- Kopen, J., Hodrov, B. & Stewart, C.S. 1996. The isolation and characterization of a rumen chitinolytic bacterium. *Letters in Applied Microbiology*, 23: 195-198.
- Lemessa, F. & Zeller, W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control*, 42: 336-344.
- Maurhofer, M., Reimann, C., Schmidli-sacherer, P., Heeb, S., Haas, D., & Defago, G. 1998. Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of system resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88: 678-684.
- McInroy, J.A. & Kloepper, J.W. 1995. Population dynamics of endophytic bacteria in field-grown sweet corn and cotton. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 895-901.

- Maleki, M., Mostafae, S., Mokhtarnejad, L. & Farzaneh, M. 2010. Characterization of *Pseudomonas fluorescens* strain CV6 isolated from cucumber rhizosphere in Varamin as a potential biocontrol agent. Australian Journal of Crop Science, 4(9): 676-683.
- Miller, J.H. 1974. Experiments in Molecular Genetics. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
- Moreira, R.R., Nesi, C.N. & Mio, L.L.M.D. 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.
- Pikovskaya, R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologiya, 17: 362-70.
- Prabhat, N.J, Garima, G., Prameela J. & Mehrotra, R. 2013. Association of Rhizospheric/Endophytic Bacteria with Plants: A Potential Gateway to Sustainable Agriculture. Greener Journal of Agricultural Sciences, 3 (2): 073-084.
- Ramesh, R. & Phadke, G.S. 2012. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Crop Protection, 37: 35-41.
- Ran, L.X., Liu, C.Y., Wu, G.J., van Loon, L.C. & Bakker, P.A.H.M., 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. Biological Control, 32: 111-120.
- Ryan, A.D., Kinkel, L.L. & Schottel, J.L. 2004. Effect of pathogen isolate, potato cultivar and antagonist strain on potato scab severity and biological control. Biochemical Science and Technology, 14: 301-311.
- Saharan, B.S. & Nehra, V. 2011. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. Life Sciences and Medicine Research, LSMR-21.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 373 pp.
- Sierra, J.M. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substances. Antonie van Leeuwenhock Ned. Tijdschr. Hyg. 23: 15-25.
- Weller, D.M. & Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology, 78: 463-469.

Isolation and identification of cucumber rhizospheric fluorescent pseudomonads and evaluation of their antagonistic potential as biocontrol agents

Samad Rafiei, Gholam Khodakaramian

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Corresponding author: Gholam khodakaramian, email: Khodakaramian@yahoo.com

Received: June 17, 2015

3 (2) 59-75

Accepted: Dec. 13, 2015

Abstract

Fluorescent pseudomonads are important group of plant growth promoting bacteria that can improve the plant growth and restrict or suppress phytopathogens directly or indirectly. The aim of this study was to obtain fluorescent pseudomonads with efficient antagonistic activities. For performing this research, a total of 120 bacterial isolates belonging to *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* were isolated from different cucumber rhizospheric soil in Hamedan province. Then, the isolates were screened for their plant growth promoting traits and antibacterial activity. These isolates also were screened against *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*. ~~So,~~ According to the results of *in vitro* studies, five antagonistic strains (BSU390, BSU630, BSU205, BSU161 and BSU391) with inhibition diameter >7 mm were selected. The range of inhibition diameter for these isolate was 7.66 to 22 mm. Also, during *in vivo* study, the strains were evaluated for their effect in suppressing disease development in terms of area under disease progress curve (AUDPC) and increasing biomass of cucumber. The results of greenhouse experiments revealed that strains BSU390, BSU205, and BSU630, showed high biocontrol efficacy. During the sole application, the strains significantly ($P \leq 0.05$) increased plant height and dry matter compared to non-bacterized control. Hence, the study shows that these isolates have potential use in cucumber bioprotection, as PGPR or in an integrated disease management; However, their effectiveness under a variety of field conditions should be investigated.

Keywords: angular leaf spot, biological control, cucumber, rhizobacteria
