

## مقاله تحقیقی

اثر بخشی زیستی سودومونادهای فلورسنت محیط ریشه گندم در برابر پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم

ناشی از *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemakerژیلادلوخواه<sup>۱</sup>، کیوان بهبودی<sup>۲</sup>، رضا معالی امیری<sup>۳</sup>

۱، ۲- دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران.

۳- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران.

مسئول مکاتبات: کیوان بهبودی، ایمیل: behbodi@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۱۱

۱۰۶-۸۳(۱)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۳۱

## چکیده

سودومونادهای فلورسنت با تولید سیدروفور و متابولیت‌های بازدارنده، بیمارگرهای گیاهی را مهار کرده و با تولید هورمون‌های گیاهی، برخی آنزیم‌ها و انحلال عناصر معدنی رشد گیاه را افزایش می‌دهند. در این مطالعه، ۱۰ جدایه سودوموناد فلورسنت از محیط ریشه گندم ارقام زاگرس و چمران (دزفول) و ارقام کوه‌دشت و زاگرس (پارس‌آباد) در اوایل اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶ و اوایل خرداد ماه ۱۳۹۷ با کشت و خالص‌سازی بر روی محیط کشت کینگ ب و نیز بر اساس تولید رنگدانه فلورسانس سبز و زرد در زیر نور UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر جداسازی و از نظر برخی ویژگی‌های متابولیکی مانند انحلال فسفات معدنی، تولید IAA، سیدروفور، ACC دآمیناز، سیانید هیدروژن و پروتئاز و نیز مهار بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم ناشی از *Bipolaris sorokiniana* و افزایش ارتفاع و زیست‌توده قسمت‌های هوایی و ریشه گندم در قالب طرح کامل تصادفی (RCD) با سه تکرار برای هر تیمار ارزیابی شدند. جدایه UTP1۰۵ با ۶۲/۵ و ۷۰ درصد به ترتیب در آزمون‌های کشت متقابل و تولید متابولیت‌های فرار بیشترین میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر را نشان داد. در گلخانه، شدت بیماری ۸۵/۳ درصد برآورد شد و جدایه‌های UTP1۰۴ و UTP1۰۵ به ترتیب با ۶۴/۵ و ۶۲/۳ درصد، بیشترین میزان کاهش بیماری را نشان دادند. همچنین، جدایه‌های UTP1۰۵ و UTP1۰۴ به ترتیب موثرترین جدایه‌ها در افزایش فاکتورهای رشد ریشه و قسمت‌های هوایی گندم بودند. این جدایه‌ها به واسطه دارا بودن خاصیت متابولیکی مطلوب، از نظر مهار بیماری و افزایش رشد گیاه برای استفاده در کشاورزی کارآمد هستند.

واژه‌های کلیدی: ACC دآمیناز، IAA، انحلال فسفات، سیدروفور، گندم، مهار زیستی

## مقدمه

میلیون تن بیشتر از سال ۲۰۲۱ بوده است و در سال ۲۰۲۲، ایران سیزدهمین کشور تولیدکننده گندم بود. این سازمان همچنین پیش‌بینی کرده است که ایران در سال ۲۰۲۳، ۱۳ میلیون تن گندم تولید کند که نسبت به سال ۲۰۲۲ تغییری نخواهد کرد (FAO, 2022). تولید گندم توسط تنش‌های زیستی متعددی محدود می‌شود و بیماری‌ها عامل محدودکننده اصلی تولید گندم در سراسر جهان هستند. تعداد کل بیماری‌های گندم بیش از ۲۰۰ بیماری است، اما ۵۰ بیماری باعث زیان‌های اقتصادی در گندم می‌شود. سالانه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از محصولات کشاورزی استراتژیک است که به‌طور گسترده در سطح جهان کشت می‌شود. فائو در گزارش دوسالانه خود از بازارهای جهانی غذا، میانگین تولید گندم در سال‌های ۲۰۱۹-۲۰۲۰ در ایران را ۱۴/۳ میلیون تن اعلام کرده است. طبق گزارش فائو، ایران در سال ۲۰۲۱، چهاردهمین کشور تولیدکننده بزرگ گندم در جهان بود. همچنین، تولید گندم در ایران در سال ۲۰۲۲، ۱۳ میلیون تن برآورد شد که ۲/۹

طی سال‌های ۱۹۶۹-۱۹۷۱ به دلیل پوسیدگی معمولی ریشه از بین رفت که معادل ۴۲ میلیون دلار بود (Ledingham et al., 1973). همچنین، در سال ۲۰۰۵، در شمال غربی اقیانوس آرام، ۳۵ درصد افت عملکرد گندم به دلیل پوسیدگی طوقه برآورد شد (Smiley et al., 2005). در ایران نیز خسارت ناشی از پوسیدگی ریشه و طوقه ۳-۱۲/۵ درصد در سال ۱۳۸۱ گزارش شده است (Mansoori et al., 2002). در استان‌های آذربایجان غربی، ایلام، لرستان، زنجان، مرکزی (Mansoori et al., 2002)، البرز، فارس، کرمانشاه و گرگان (Karamian et al., 2022) این بیمارگر گزارش شده است.

تناوب زراعی، استفاده از ارقام مقاوم و استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست برای مدیریت این بیماری گزارش شده است (Al-Sadi, 2021). خاک‌ورزی صفر باعث افزایش عملکرد گندم و کاهش بروز پوسیدگی ریشه گندم در مکزیک شده است (Govaerts et al., 2006). همچنین، گزارش شده است که تناوب زراعی گندم با *Brassica carinata* منجر به کاهش قابل توجه بیماری‌های پوسیدگی ریشه و پوسیدگی طوقه می‌شود (Campanella et al., 2020). در ایران نیز، آفتاب‌گیری خاک در کاهش پوسیدگی ریشه گندم مؤثر می‌شود (Saremi & Saremi, 2013). اما قارچ‌کش‌های شیمیایی گزینه مناسبی برای مدیریت بیماری ریشه و طوقه گندم نیستند (Fernandez et al., 2010).

از میان همه روش‌های مدیریت بیماری، مهار زیستی یک رویکرد بالقوه سازگار با محیط زیست برای مدیریت بیماری‌های گیاهی است (O'Brien, 2017; Köhl et al., 2019; Delkhah & Behboudi, 2021; Lahlali et al., 2022). اغلب عوامل مهار زیستی در محیط ریشه تجمع پیدا می‌کنند، درحالی‌که برخی از آن‌ها می‌توانند به داخل ریشه نفوذ کرده و جمعیت اندوفیتی را ایجاد کنند. سودومونادهای فلورسنت به عنوان یکی از امیدوارکننده‌ترین گروه‌های ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه هستند که به دلیل تجمع سریع، رقابت برای منابع غذایی، تولید متابولیت‌های ثانویه مانند هورمون‌های گیاهی، ترکیب

حدود ۲۰ درصد گندم به دلیل بیماری‌ها در سطح جهان از بین می‌رود. بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم ناشی از قارچ خاک‌زاد (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker یکی از این بیماری‌ها است (Al-Sadi, 2021). *Bipolaris sorokiniana* قارچی خاک‌زاد با طیف میزبانی وسیع است. نوع علائم و میزان خسارت در میزبان‌های مختلف متفاوت است. بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم یکی از شایع‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری‌های ناشی از این قارچ بیمارگر است (Abdullah et al., 2020; Aboukhaddour et al., 2020; Gulyaeva et al., 2020) که در تمام مناطق کشت گندم شیوع دارد. این بیماری در چین، استرالیا، خاورمیانه و اروپا از مهم‌ترین بیماری‌های گندم به‌شمار می‌رود (Ledingham et al., 1973; Fedel-Moen & Harris, 1987; Smiley et al., 2005; Tunali et al., 2008; Al-Sadi & Deadman, 2010; Xu et al., 2018a) و اغلب در مناطق خشک و دمای بالا شدت بیشتری دارد (Al-Sadi, 2021). این بیماری با قارچ‌های دیگر از جمله *Fusarium Microdochium*، *F. culmorum pseudograminearum* و *Pythium spp nivale* مرتبط است (Moya-Elizondo et al., 2011; Saremi & Saremi, 2013; Kazan & Gardiner, 2018; Xu et al., 2018a; White et al., 2019) و در صورت همراه بودن با هر یک از این بیمارگرها، شدت بیماری افزایش می‌یابد. نحوه خسارت این بیماری به صورت کاهش عملکرد با اثر بر تعداد پنجه، تعداد و اندازه دانه و نیز کیفیت محصول است. علائم این بیماری، ایجاد لکه‌های نکروزه قهوه‌ای تیره تا سیاه در ریشه‌ها، میان‌گره زیر طوقه و طوقه است. همچنین، در ارقام حساس باعث سفید شدن سنبله و چروکیدگی دانه-ها می‌شود (Mansoori & Pazhoumand, 2005). بروز علائم روی ریشه اغلب با علائم روی طوقه گندم همراه است (Al-Sadi & Deadman, 2010; Qostal et al., 2019). کاهش عملکرد ۶ تا ۲۴ درصد در اثر پوسیدگی معمولی ریشه (Wildermuth et al., 1992) و ۰ تا ۸۹ درصد در اثر پوسیدگی طوقه گزارش شده است (Klein et al., 1991). در کانادا حدود ۵/۷ درصد از محصول گندم در

گندم مزارع البرز جداسازی شده بود، از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه مذکور تهیه شد. برای تهیه جدایه‌های باکتریایی، نمونه‌برداری از محیط ریشه گندم ارقام زاگرس و چمران از مزارع شهرستان دزفول (استان خوزستان) و گندم ارقام کوهدشت و زاگرس از مزارع دیم شهرستان پارس‌آباد (استان اردبیل) در اوایل اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۶ و اوایل خرداد ماه ۱۳۹۷ صورت گرفت. با توجه به بالا بودن دما در مراحل پایانی رشد گیاه گندم و ارتباط شدت بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم با خشکی و دمای بالا، نمونه‌برداری در ماه‌های آخر فصل رشد گندم در این مناطق با هدف دستیابی به جدایه‌هایی باکتریایی آنتاگونیست و متحمل به شرایط گرم و خشک برای نمونه‌برداری انجام شد. گیاهان گندم همراه با خاک محیط ریشه به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی سودوموناد‌های فلورسنت، ۱۰ گرم از نمونه خاک محیط ریشه به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار گرفت و سری رقت تا  $10^{-9}$  تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از هر سری رقت بر روی محیط کشت افتراقی کینگ ب (۱۰ گرم پروتئاز پیتون، ۱/۵ گرم  $K_2HPO_4$ ، ۱/۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) با pH ۷/۲ کشت شدند. پتری‌های کشت شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴-۴۸ ساعت نگهداری شدند (King et al., 1954). پس از طی دوره نگهداری، به منظور جداسازی سودوموناد‌های فلورسنت، ۱۵۰ کلنی باکتریایی که از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند شکل و رنگ متفاوت و شبیه سودوموناس بودند، انتخاب، نامگذاری و بر روی محیط کشت افتراقی کینگ ب خالص‌سازی شدند. در این مرحله، نامگذاری براساس اسم دانشگاه محل جداسازی و اسم جنس احتمالی صورت گرفت. آزمون‌های ۳% KOH، اکسیداز، کاتالاز، لهانیدن سیب‌زمینی، هیدرولیز نشاسته و واکنش فوق حساسیت بر روی گیاه شمعدانی برای تشخیص باکتری‌های گرم منفی و غیربیماری‌زای گیاهی انجام شدند. همچنین، از آزمون رشد باکتری‌ها در دمای ۴۲ درجه سلسیوس برای تمایز جدایه‌ها از *P. aeruginosa* استفاده شد. بدین ترتیب،

فرار سیانید هیدروژن، آنتی‌بیوتیک‌ها و سیدروفورها در مهیار زیستی بیماری‌های گیاهی نقش دارند (Win et al., 2022). همچنین، این باکتری‌ها به واسطه انحلال فسفات، تولید سیدروفورها، ۱-آمینو سیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC) دآمیناز و ایندول-۳-استیک اسید (IAA) می‌توانند رشد گیاه را افزایش دهند (Xu et al., 2021). تحقیقات زیادی در زمینه مهیار بیماری‌های مختلف گیاهی با باکتری‌های سودوموناد‌های فلورسنت انجام شده است (Ganeshan & Kumar, 2005; Stockwell & Stack, 2007; Vanitha & Ramjagathesh, 2014; Durairaj et al., 2017; Wang et al., 2020; Win et al., 2022) به‌طور معمول، سازوکارهای مسئول افزایش رشد گیاه در باکتری‌ها به تنهایی عمل نمی‌کنند، بلکه چندین سازوکار در تعامل با هم‌دیگر منجر به افزایش رشد گیاه می‌شوند (Taheri et al., 2022).

با توجه به اهمیت گندم در تامین غذای جمعیت روزافزون جهان، خسارت اقتصادی *B. sorokiniana* با ایجاد بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه بر روی گندم و نیز توانایی‌های سودوموناد‌های فلورسنت در مهیار بیمارگرهای گیاهی، در مطالعه حاضر، اقدام به جداسازی باکتری‌های سودوموناد‌های فلورسنت از محیط ریشه گندم ارقام زاگرس، چمران و کوهدشت شد. سپس، ویژگی‌های محرک رشدی گیاه، فعالیت‌های آنتاگونیستی این جدایه‌ها در برابر بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم ناشی از *B. sorokiniana* و سازوکارهای مربوطه مورد ارزیابی قرار گرفت. هدف اصلی این مطالعه، یافتن جدایه‌هایی از سودوموناد فلورسنت کارآمد از نظر مهیار بیمارگر گیاهی و افزایش رشد گیاه برای استفاده آتی در کشاورزی است.

## مواد و روش‌ها

### بذر، بیمارگر و باکتری‌ها

بذور گواهی‌شده گندم رقم کویر از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران دریافت شد. این رقم به بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه ناشی از *B. sorokiniana* حساس است. قارچ بیمارگر *B. sorokiniana* که از ریشه

که در آن I، درصد مهار رشد شعاعی بیمارگر توسط باکتری،  $R_c$ ، رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد و  $R_t$ ، رشد شعاعی بیمارگر در تیمارهای دارای باکتری است.

آزمون تولید ترکیبات آلی فرار: برای این منظور، ابتدا سوسپانسیونی با جمعیت  $10^8$  cfu/ml از باکتری‌ها تهیه و به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در پتری‌های حاوی محیط NA کشت شد. پتری دیش‌ها به مدت یک ۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه درون اتاقک رشد نگهداری شدند. سپس، یک قطعه ۰/۵ سانتی‌متری از حاشیه کشت شش روزه بیمارگر در مرکز پتری دیش‌های حاوی محیط کشت PDA کشت شد. در زیر اتاقک کشت ضدعفونی شده، درب پتری دیش‌های حاوی قارچ و پتری دیش‌های حاوی باکتری برداشته شد و پتری دیش‌های حاوی باکتری‌ها بر روی پتری دیش‌های حاوی قارچ بیمارگر به‌طور وارونه قرار گرفتند و به مدت شش روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس درون اتاقک رشد نگهداری شدند. در تیمار شاهد نیز آب مقطر سترون جایگزین سوسپانسیون باکتری شد.

درصد مهار رشد میسلیومی بیمارگر توسط باکتری‌ها در تیمارها با رابطه ۲ محاسبه شد:

$$I = \frac{D_c - D_t}{D_c} \times 100 \quad \text{رابطه (۲)}$$

که در آن I، درصد مهار رشد میسلیومی بیمارگر توسط باکتری،  $D_c$ ، قطر بیمارگر در تیمار شاهد و  $D_t$ ، قطر بیمارگر در تیمارهای دارای باکتری است.

### ارزیابی فعالیت‌های متابولیکی جدایه‌های سودومونادهای فلورسنت ارزیابی توانایی تولید IAA

کشت‌های تازه باکتری‌ها در فالكون‌ها ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط LB غنی شده با ۱۰۰ میکروگرم در لیتر ال-تریپتوفان با pH ۷/۲ به مدت ۴۸ ساعت در شیکر-انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه رشد کردند. سپس، در ۹۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه، سانتریفیوژ (مدل HST650CC شرکت Orum Tadjhiz ایران) شدند. سه قطره اورتو-فسفوریک اسید ۱۰ میلی‌مولار و چهار میلی‌لیتر

۶۰ جدایه از بین ۱۵۰ جدایه انتخاب شد. در مرحله بعد، ۱۰ جدایه سودوموناد فلورسنت براساس تولید رنگدانه سبز و زرد با شدت‌های مختلف خاصیت فلورسانسی در زیر نور UV با طول موج ۳۶۵ نانومتر انتخاب شدند (Woomer *et al.*, 1990). این جدایه‌ها، پس از کشت مجدد روی محیط کشت کینگ ب، خالص شده و در دمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. همچنین، تمام جدایه‌های انتخاب شده در دمای ۸۰- درجه سلسیوس در محیط کشت لیزوژنی براث (LB) (۱۰ گرم تریپتون، پنج گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم NaCl در یک لیتر آب مقطر) حاوی ۳۰ درصد گلیسرول برای طولانی مدت نگهداری شدند (Kumar *et al.*, 2014).

### ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی

اثر آنتاگونیستی ۱۰ جدایه باکتریایی مورد استفاده در این پژوهش در برابر *B. sorokiniana* با آزمون‌های کشت متقابل (Hagedorn *et al.*, 1989) و تولید ترکیبات آلی فرار (Fiddaaman & Rossal, 1994) تعیین شد.

آزمون کشت متقابل: ابتدا سوسپانسیونی با جمعیت  $10^8$  cfu/ml از هر کدام از جدایه‌ها به‌طور جداگانه تهیه شد و به‌صورت کشت نقطه‌ای بر روی محیط کشت PDA+NA (۵۰ درصد محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار و ۵۰ درصد آگار مغذی) به فاصله یک سانتی‌متر از لبه پتری دیش‌های هشت سانتی‌متری کشت شدند. هم‌زمان یک قطعه ۰/۵ سانتی‌متری از حاشیه کشت شش روزه بیمارگر در طرف مقابل جدایه باکتری و به فاصله یک سانتی‌متر از لبه پتری دیش قرار داده شد. در تیمار شاهد فقط بیمارگر وجود داشت. تمام تیمارها در دمای ۲۶ درجه سلسیوس به مدت شش روز نگهداری شدند.

درصد مهار رشد شعاعی بیمارگر توسط باکتری‌ها در تیمارها با رابطه ۱ محاسبه شد:

$$I = \frac{R_c - R_t}{R_c} \times 100 \quad \text{رابطه (۱)}$$

محلول فوق ۱۵ گرم آگار اضافه شد و با افزودن آب مقطر حجم آن به ۸۰۰ میلی لیتر رسید. بعد از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سلسیوس خنک شد.

محلول سوم: محلول غذایی که حاوی دو گرم گلوکز، دو گرم مانتول، ۴۹۳ میلی گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱۱ میلی گرم  $CaCl_2$ ، ۱/۱۷ میلی گرم  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ، ۱/۴ میلی گرم  $H_3BO_3$ ، ۰/۰۴ میلی گرم  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۱/۲ میلی گرم  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  و یک میلی گرم  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  است. این محلول نیز به صورت جداگانه اتوکلاو و خنک شد.

محلول چهارم: محلول کازآمینواسید که سه گرم کازآمینواسید به ۳۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. این محلول با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون ضد عفونی شد. ابتدا محلول چهارم و سپس محلول سوم به محلول بافر اضافه شد. در نهایت، محلول معرف اضافه شد و در پتری دیش های هشت سانتی متری پخش شد.

جدایه های باکتریایی به صورت نقطه ای روی محیط CAS آگار کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند. تولید هاله زرد تا نارنجی در اطراف کلنی ها بعد از طی دوره نگهداری نشان دهنده تولید سیدروفور است (Ghazy & El-Nahrawy, 2021). قطر هاله بعد از ۹۶ ساعت اندازه گیری و ثبت شد.

### ارزیابی توانایی انحلال فسفات معدنی

برای تعیین این ویژگی، هر جدایه در پتری های حاوی محیط کشت جامد Sperber (۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم  $CaCl_2$ ، ۲/۵ گرم  $Ca_3(PO_4)_2$ ، ۰/۲۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) با pH ۷/۲ کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۱۲۰ ساعت نگهداری شدند. برای تشخیص توانایی انحلال فسفات از ویژگی شفاف سازی محیط پیرامون کلنی ها استفاده شد. قطر هاله پس از یک هفته اندازه گیری شد (Hajjam et al., 2016).

### ارزیابی توانایی تولید آنزیم ACC ۵ آمیناز

از معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی لیتر  $HClO_4$  غلیظ، ۷/۵ میلی لیتر  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  ۰/۵ مولار و ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر) به دو میلی لیتر از محلول رویی فاقد سلول باکتری اضافه شدند. توسعه رنگ صورتی نشان دهنده تولید IAA بود. به منظور سنجش کمی اکسین تولید شده، میزان جذب نوری محلول رویی هر جدایه در طول موج نوری ۵۳۵ نانومتر با اسپکتروفوتومتر مدل T70+ شرکت PG Instruments انگلستان اندازه گیری شد. برای بلانک کردن (صفر کردن) کووت از محیط LB غنی شده با ۱۰۰ میکروگرم در لیتر ال-تریپتوفان با pH ۷/۲ استفاده شد.

برای تهیه نمودار استاندارد، محلول محیط کشت پایه LB با غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر IAA، تهیه شده و میزان جذب نور آن ها به وسیله دستگاه قرائت شد. به همان میزان که به سوسپانسیون باکتری، معرف اضافه می شد، به غلظت های مختلف IAA نیز اضافه می شد و طیفی از رنگ قرمز ایجاد شد. سری رقت های پایین، رنگ روشن و زرد دارند و در غلظت های بالاتر، طیف رنگ، صورتی و قرمز می شد. برای ارزیابی نتایج آزمون، مقدار تولید اکسین هر جدایه با مقایسه مقدار جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده و میزان ایندول استیک اسید با نرم افزار اکسل محاسبه شد (Brick et al., 1991).

### ارزیابی توانایی تولید سیدروفور

برای این منظور از محیط کشت CAS آگار استفاده شد. این محیط کشت از چهار محلول جداگانه تهیه می شود. محلول اول: محلول معرف Fe-CAS که از ترکیب ۱۰ میلی لیتر  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  یک میلی مولار تهیه شده در اسید کلریدریک ۱۰ میلی مولار با ۵۰ میلی لیتر محلول CAS (۱/۲۱ میلی گرم در لیتر) تهیه شد. محلول حاصل به ۴۰ میلی لیتر محلول HDTMA (۱/۸۲ میلی گرم در لیتر) اضافه و بعد از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سلسیوس خنک شد.

محلول دوم: محلول بافر که با انحلال ۳۰/۲۴ گرم بافر PIPES در ۷۵۰ میلی لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم  $KH_2PO_4$ ، ۰/۵ گرم  $NaCl$  و یک گرم  $NH_4Cl$  تهیه و pH آن با KOH ۵۰ درصد به ۶/۸ رسانده شد. قبل از اتوکلاو، به

## ارزیابی‌های گلخانه‌ای

### اثبات بیماری‌زایی

برای اطمینان از بیماری‌زا بودن جدایه فارچ بیمارگر، آزمون اثبات بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های گندم انجام می‌شود. برای تهیه زاد مایه بیمارگر، یک کیلوگرم بذور گندم با میزان مساوی در پنج ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری تقسیم و یک شبانه‌روز خیس‌انده شدند. بعد از خیس شدن و جذب آب کافی، آب اضافی ارلن‌ها خارج شد. سپس، ارلن‌ها دو بار به فاصله ۲۴ ساعت با اتوکلاو ضدعفونی شده و پس از سرد شدن هر ارلن با پنج قطعه یک سانتی‌متری از کشت تازه بیمارگر، مایه‌زنی شده و به مدت دو هفته در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند تا کل بذور با بیمارگر شود. سپس، بذور حاوی بیمارگر در زیر اتاقک کشت ضدعفونی شده، هوا خشک و هم‌زمان با کشت بذور با نسبت وزنی ۳ درصد به یک سوم خاک بالایی گلدان‌های یک کیلوگرمی اضافه شدند (Salehpour et al., 2005). قبل از کاشت، بذور با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و سپس چندین بار شست‌وشو داده شدند. ۱۵ عدد بذور گندم ضدعفونی شده در هر پتری-دیش هشت سانتی‌متری به مدت ۷۲ ساعت در لابه‌لای کاغذ صافی ضدعفونی شده با اتوکلاو در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شد تا جوانه بزنند. سپس، ۱۰ عدد از بذور هم‌سن جوانه زده در هر گلدان کشت شد. گلدان‌ها در گلخانه ساختمان بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران با دمای ۲۲-۲۵ درجه سلسیوس با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی به مدت ۲۱ روز نگهداری و به فاصله سه روز یک بار آبیاری شدند. پس از ۲۱ روز، درصد شدت بیماری تعیین (Salehpour et al., 2005) و اصول کخ اجرا شد. برای تعیین درصد شدت بیماری، پس از شستن ریشه‌ها و میان‌گره زیر طوقه هر گیاه، درصد پوسیدگی ریشه و وسعت لکه موجود روی میان‌گره سطح‌بندی شد (Ledingham et al., 1973): ۱= بدون لکه، ۲= لکه‌های خیلی کوچک که تا ۲۵ درصد سطح میان‌گره زیر طوقه را

از محیط کشت نمکی حداقل DF (چهار گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، شش گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۰/۲ گرم  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، دو گرم گلوکز، دو گرم گلوکونیک اسید، دو گرم اسید سیتریک، یک میلی‌گرم  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۰ میلی‌گرم  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ، ۱۱/۱۹ میلی‌گرم  $\text{MnSO}_4$ ، ۱۲۴/۶ میلی‌گرم  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۷۸/۲۲ میلی‌گرم  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  و ۱۰ میلی‌گرم  $\text{MoO}_3$ ) (Dworkin & Foster, 1958) با pH اصلاح شده ۷/۲ استفاده شد. سه حالت شاهد منفی (فاقد منبع نیتروژنی)، شاهد مثبت (دارای  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) به‌عنوان تنها منبع نیتروژنی) و تیمار مورد نظر (دارای ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن) در نظر گرفته شد. برای جلوگیری از تأثیر منبع نیتروژنی آگار، از آگار شسته شده استفاده شد. پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. رشد جدایه‌ها روی پتری‌دیش‌های دارای ACC نشان‌دهنده فعالیت آنزیم ACC دآمیناز است (Gupta & Pandey, 2019).

### ارزیابی توانایی تولید سیانید هیدروژن (HCN)

جدایه‌های باکتری در محیط کشت NA حاوی ۴/۴ گرم گلایسین کشت شدند و کاغذ صافی آغشته به محلول دو درصد  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  و ۰/۵ درصد اسید پیکریک روی محیط کشت قرار گرفت. سپس، پتری‌دیش‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۹۶ ساعت نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد به نارنجی و قهوه‌ای نشان‌دهنده تولید HCN است (Manasa et al., 2021).

### ارزیابی توانایی تولید آنزیم پروتئاز

باکتری‌ها به‌صورت نقطه‌ای روی محیط شیر بدون چربی مخلوط با آگار (Skim Milk=SMA) (۱۵ گرم پودر شیر، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و نه گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. تشکیل هاله بی‌رنگ اطراف کلنی باکتری نشان‌دهنده فعالیت آنزیم پروتئاز است (Bajaj & Sharma, 2011). قطر هاله بعد از ۴۸ ساعت اندازه‌گیری و مقایسه شد.



## ارزیابی توانایی جدایه‌ها در تحریک رشد گیاه در گلخانه

ضد عفونی بذور، تهیه سوسپانسیون باکتریایی، تیمار بذور با باکتری‌ها و کاشت گیاهان مطابق بخش قبلی انجام شد. با این تفاوت که در این آزمایش تیمارها بدون مایه‌زنی بیمارگر بودند و فقط اثر باکتری‌ها در تحریک رشد گیاه بدون حضور بیمارگر بررسی شد.

### تجزیه و تحلیل‌های آماری

آزمایش‌ها دو بار و در قالب طرح آماری کامل تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار تکرار شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها نیز با نرم‌افزار SPSS16.0 و آزمون چنددامنه‌ای دانکن در  $P \leq 0.01$  انجام شد.

### نتایج

از کل نمونه‌های خاک محیط ریشه گندم ارقام زاگرس، چمران و کوهدشت مناطق یاد شده، ۱۰ جدایه سودوموناد فلورسنت براساس ویژگی فلورسانس در UV-Transilluminator با طول موج ۳۶۵ نانومتر انتخاب شد. این جدایه‌ها طیفی از رنگ‌های سبز و زرد را نشان دادند. جدایه UTP113 توانست رنگدانه سبز را با شدت بیشتری تولید کند (شکل ۱). محل جداسازی جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش، در جدول ۱ ارائه شده است. همه ۱۰ جدایه مورد استفاده در این پژوهش، گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت و نیز فاقد توانایی در لهانیدن سیب‌زمینی، هیدرولیز نشاسته و ایجاد واکنش فوق حساسیت بودند و نتوانستند در دمای ۴۲ درجه سلسیوس رشد کنند.

### ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی

در ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌ها، در هر دو آزمون کشت متقابل و تولید متابولیت‌های آلی فرار، تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها از نظر میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. جدایه UTP105 با ۶۲/۵ و ۷۰ درصد به ترتیب در آزمون کشت متقابل و آزمون تولید متابولیت‌های فرار بیشترین میزان

می‌پوشاند، ۳= لکه‌های وسیعی که تا ۵۰ درصد سطح میان-گره زیر طوقه را می‌پوشاند، ۴= لکه‌های وسیعی که بیش از ۵۰ درصد سطح میان‌گره را می‌پوشاند. درصد شدت بیماری نیز با رابطه ۳ محاسبه شد (Tinline, 1977):

$$DS = \frac{\sum(N_i \times I)}{N_t} \times 100$$

رابطه (۳)

که DS، درصد شدت بیماری،  $N_i$  تعداد گیاهان در گروه شاخص بیماری، I، گروه شاخص بیماری و  $N_t$ ، تعداد کل گیاهان موجود در هر تیمار است.

## ارزیابی توانایی جدایه‌ها در مهار بیماری در گلخانه

بعد از تهیه زادمایه قارچ بیمارگر و ضد عفونی بذور، سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی با کشت باکتری‌ها به‌طور مجزا در محیط NB و نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت در ۱۴۰ دور در دقیقه در شیکر-انکوباتور تهیه شد. سوسپانسیون باکتریایی هر جدایه به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس، با خارج کردن محلول رویی، سوسپانسیون باکتریایی با غلظت  $10^8$  cfu/ml با بفر فسفات یک درصد تهیه شد (Asha et al., 2011). سپس، بذور در سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی حاوی متیل سلولز به مدت یک ساعت تیمار شدند. هنگام کاشت، افزودن زادمایه بیمارگر مطابق آزمون اثبات بیماری‌زایی انجام شد. پس از ۲۱ روز، درصد کاهش بیماری، ارتفاع، وزن تر و وزن خشک کل گیاه، قسمت‌های هوایی و ریشه تعیین شدند (Salehpour et al., 2005). برای محاسبه درصد کاهش بیماری، ابتدا درصد شدت بیماری در هر تیمار مطابق رابطه ۳ تعیین شد. سپس، براساس درصد شدت بیماری در تیمار شاهد منفی و سایر تیمارها، درصد کاهش بیماری در هر تیمار محاسبه شد (رابطه ۴).

$$DC = \frac{DS(c^-) - DS(c)}{DS(c^-)} \times 100$$

رابطه (۴)

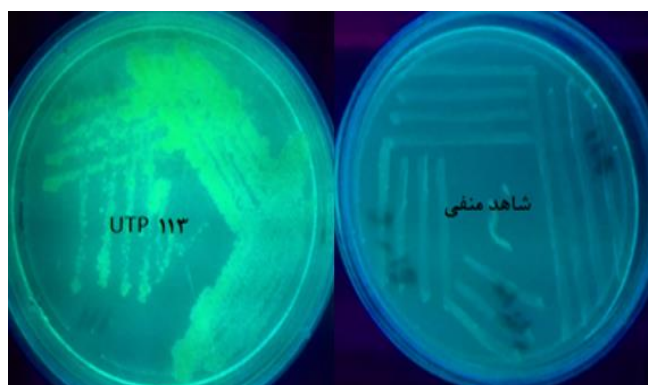
که DC، درصد مهار بیماری در هر تیمار،  $DS(c^-)$ ، درصد شدت بیماری در تیمار شاهد منفی و  $DS(c)$ ، درصد شدت بیماری در تیمار مورد محاسبه است.

طیف مختلف رنگ صورتی را ایجاد کردند. ایجاد رنگ صورتی نشان‌دهنده تولید هورمون اکسین IAA است. تفاوت در شدت رنگ صورتی حاکی از تفاوت در میزان تولید این هورمون است. تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین جدایه‌های تولیدکننده IAA در مقایسه با میزان جذب نوری محلول حاوی IAA فاقد سلول باکتریایی (شاهد) در طول موج ۵۳۵ نانومتر T ۴۸ ساعت بعد از کشت باکتریایی مشاهده شد و جدایه UTP1۲۵ با ۱/۷۴۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین میزان IAA را تولید کرد. میزان تولید IAA در جدایه‌های UTP1۰۴، UTP1۰۵ و UTP1۱۳ به ترتیب ۰/۶۷۷، ۰/۵۲۹ و ۰/۷۳۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (شکل ۳).

بازدارندگی از رشد بیمارگر را نشان داد. در آزمون کشت متقابل، جدایه‌های UTP1 و UTP1۰۴ با ۶۰ درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر از نظر آماری در گروه دوم قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد با جدایه UTP1۰۵ نشان دادند. همچنین، در آزمون تولید متابولیت‌های فرار جدایه‌های UTP1، UTP2۴ و UTP1۰۴ به ترتیب با ۶۰، ۶۲/۵ و ۶۲/۵ درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر از نظر آماری در گروه دوم قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری با جدایه‌های دیگر در سطح احتمال یک درصد نشان دادند (شکل ۲).

### ارزیابی فعالیت‌های متابولیکی جدایه‌های سودومونادهای فلورسنت

در ارزیابی توانایی باکتری‌ها در تولید هورمون IAA، جدایه‌های UTP1۰۴، UTP1۰۵، UTP1۱۳ و UTP1۲۵ قادر به تولید اکسین IAA بودند (جدول ۲). این جدایه‌ها



شکل ۱- کلنی سودوموناس رشد کرده در محیط جامد کینگ ب در ۳۶۵ نانومتر نور UV. جدایه UTP1۱۳ نور سبز فلورسانس با شدت بیشتری تولید کرده است.

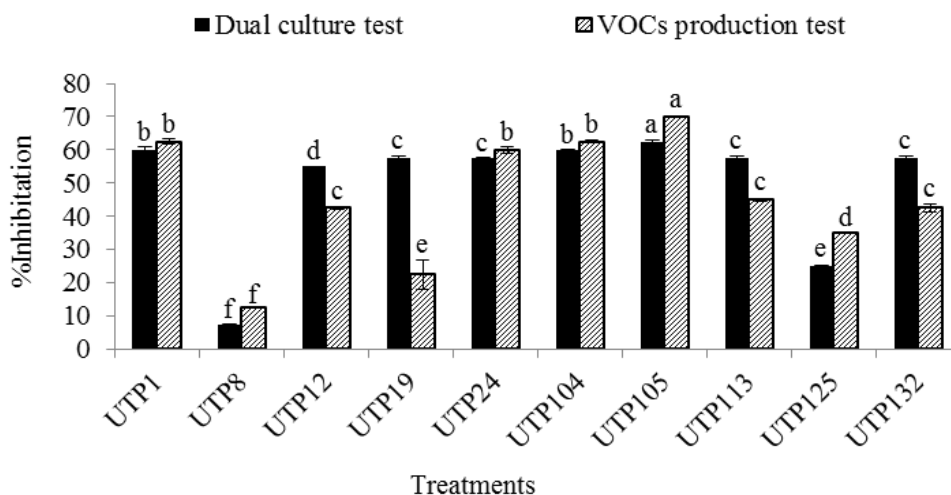
Fig. 1. *Pseudomonas* colony grown in King B solid medium at 365 nm UV light. UTP113 isolate produced more intense green fluorescence.



جدول ۱- محل جمع آوری باکتری های مورد استفاده.

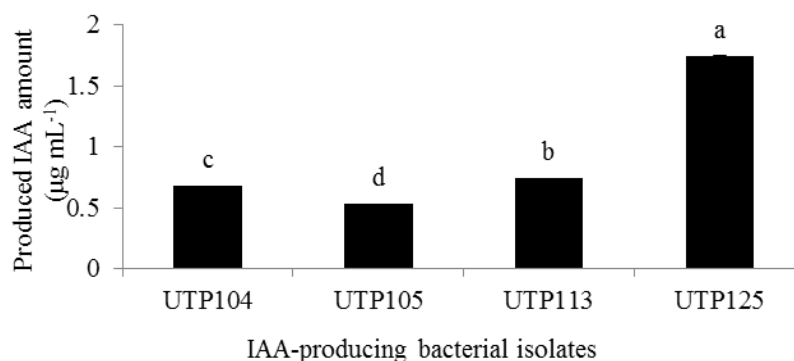
Table 1. The location of used bacteria collection.

Bacterial isolates	Sources of bacterial isolates
UTP1	Rhizosphere of wheat cv. Chamran/ Dezful
UTP8	Rhizosphere of wheat cv. Chamran/ Dezful
UTP12	Rhizosphere of wheat cv. Zagros/ Dezful
UTP19	Rhizosphere of wheat cv. Zagros/ Dezful
UTP24	Rhizosphere of wheat cv. Zagros/ Dezful
UTP104	Rhizosphere of wheat cv. Zagros/ Parsabad
UTP105	Rhizosphere of wheat cv. Zagros/ Parsabad
UTP113	Rhizosphere of wheat cv. Zagros/ Parsabad
UTP125	Rhizosphere of wheat cv. Kohdasht/ Parsabad
UTP132	Rhizosphere of wheat cv. Kohdasht/ Parsabad



شکل ۲- مقایسه میانگین توانایی جدایه های باکتریایی در بازدارندگی از رشد مسیلیومی قارچ *B. sorokiniana* با آزمون های کشت متقابل و تولید ترکیبات آلی فرار، شش روز بعد از کشت. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی است و اعداد مربوط به میزان بازدارندگی در هر تیمار، میانگین سه تکرار (± خطای استاندارد) هستند. ستون های دارای حروف مشترک، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

Fig. 2. Mean comparison of bacterial isolates ability to inhibit the mycelial growth of *B. sorokiniana* with dual culture and the production of VOCs tests six days after culture. The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to the inhibition rate in each treatment are the average of three replicates (± standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ ).

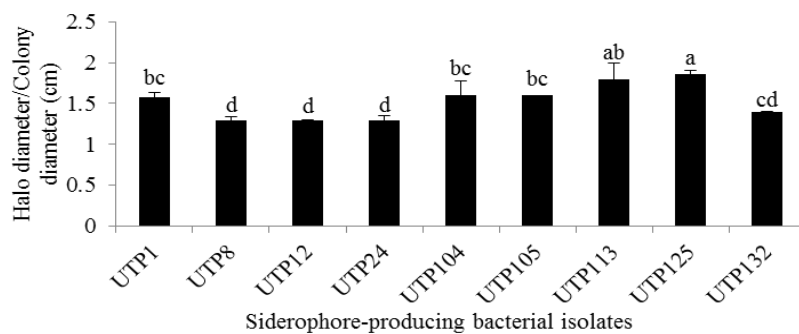


شکل ۳- مقایسه جدایه‌های باکتریایی از نظر میزان تولید IAA در ۵۳۵ نانومتر. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی است و اعداد مربوط به میزان IAA تولید شده در هر تیمار، میانگین سه تکرار ( $\pm$  خطای استاندارد) هستند. ستون‌های دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

Fig. 3. Comparison of bacterial isolates in terms of IAA in 535 nm. The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to the produced IAA amount in each treatment are the average of three replicates ( $\pm$  standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ ).

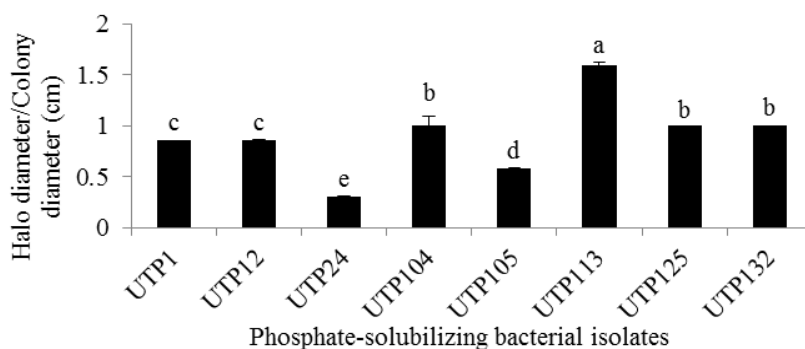
در بررسی توانایی باکتری‌ها در انحلال فسفات معدنی، جدایه‌های UTPA و UTP19 توان انحلال فسفات معدنی را نداشتند (جدول ۲). تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری، نشان‌گر توانایی باکتری در انحلال فسفات معدنی است. در این آزمون، جدایه UTP113 با ۱/۶ سانتی‌متر بیشترین میزان میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی را بعد از یک هفته ایجاد کرد و اختلاف معنی‌داری با جدایه‌های دیگر در سطح احتمال یک درصد نشان داد. جدایه‌های UTP104، UTP125 و UTP132 با یک سانتی‌متر میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی نیز در گروه دوم آماری قرار گرفتند (شکل ۵).

نتایج آزمون تولید سیدروفور نشان داد، از بین ۱۰ جدایه مورد بررسی، همه جدایه‌ها به جز جدایه UTP19 توانستند سیدروفور تولید کنند (جدول ۲). تغییر رنگ محیط CAS آگار از آبی به نارنجی تا زرد به دلیل جدا شدن آهن از این محیط توسط سیدروفور می‌باشد. جدایه‌های تولیدکننده سیدروفور توانستند هاله زرد متمایل به نارنجی تولید کنند و جدایه‌های UTP125 و UTP113 به ترتیب با ۱/۸ و ۱/۸۶ سانتی‌متر بیشترین میزان میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی را بعد از ۹۶ ساعت ایجاد کردند و اختلاف معنی‌داری از این نظر بین این دو جدایه در سطح احتمال یک درصد وجود نداشت (شکل ۴).



شکل ۴- مقایسه میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه‌های باکتریایی در آزمون تولید سیدروفور بعد از طی دوره نگهداری (۹۶ ساعت). آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی است و اعداد مربوط به نسبت قطر هاله به قطر کلنی در هر تیمار، میانگین سه تکرار ( $\pm$  خطای استاندارد) هستند. ستون‌های دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

Figure 4. Comparison of the ratio of halo diameter to colony diameter of bacterial isolates in siderophore production test after incubation period (96 h). The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to the ratio of halo diameter to colony diameter in each treatment are the average of three replicates ( $\pm$  standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ ).



شکل ۵- مقایسه میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه‌های باکتریایی در آزمون انحلال فسفات معدنی بعد از طی دوره نگهداری (یک هفته). آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی است و اعداد مربوط به نسبت قطر هاله به قطر کلنی در هر تیمار، میانگین سه تکرار ( $\pm$  خطای استاندارد) هستند. ستون‌های دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

Fig. 5. Comparison of the ratio of halo diameter to colony diameter of bacterial isolates in phosphate solubilization test after incubation period (one week). The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to the ratio of halo diameter to colony diameter in each treatment are the average of three replicates ( $\pm$  standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ ).

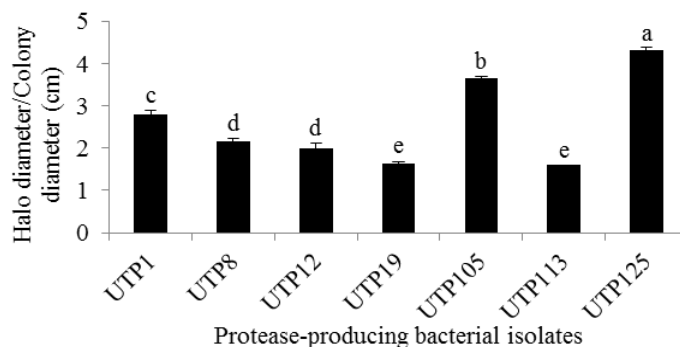
شد. جدایه‌های UTP1، UTP104، UTP113 و UTP132، کاغذ صافی را به ترتیب آجری رنگ (HCN خیلی زیاد)، قهوه‌ای تیره (HCN زیاد)، قهوه‌ای روشن (HCN متوسط) و کرم (HCN کم) کردند (جدول ۲).

تولید آنزیم پروتئاز نیز با ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری مشخص می‌شود و نشان‌دهنده توانایی باکتری در تولید این آنزیم و تجزیه پروتئین شیر است که جدایه‌های

در بررسی توان تولید آنزیم ACC دامیناز در باکتری‌ها، جدایه‌های UTP1، UTP24 و UTP104 نتوانستند آنزیم ACC دامیناز تولید کنند (جدول ۲). چون نتوانستند بر روی محیط کشت DF دارای ACC رشد کنند. در بررسی تولید HCN، توانایی تولید HCN از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی شد. تغییر رنگ از کرم تا آجری متغیر بود که به ترتیب با درجه‌بندی ۱ تا ۴ مشخص

سانتی‌متر در گروه دوم آماری قرار گرفت. اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌ها در سطح احتمال یک درصد وجود داشت (شکل ۶).

UTP104، UTP104 و UTP132 فاقد آنزیم پروتئاز بودند (جدول ۲). در این آزمون، جدایه UTP125 با ۴/۳۳ سانتی‌متر بیشترین میزان میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی را بعد از ۴۸ ساعت ایجاد کرد و جدایه UTP105 با ۳/۶۷



شکل ۶- مقایسه میانگین نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه‌های باکتریایی در آزمون تولید پروتئاز بعد از طی دوره نگهداری (۴۸ ساعت). آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی است و اعداد مربوط به نسبت قطر هاله به قطر کلنی در هر تیمار، میانگین سه تکرار (± خطای استاندارد) هستند. ستون‌های دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

Fig. 6. Comparison of the ratio of halo diameter to colony diameter of bacterial isolates in protease production test after incubation period (48 h). The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to the ratio of halo diameter to colony diameter in each treatment are the average of three replicates (± standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ )

جدول ۲- خصوصیات متابولیکی جدایه‌های باکتریایی.

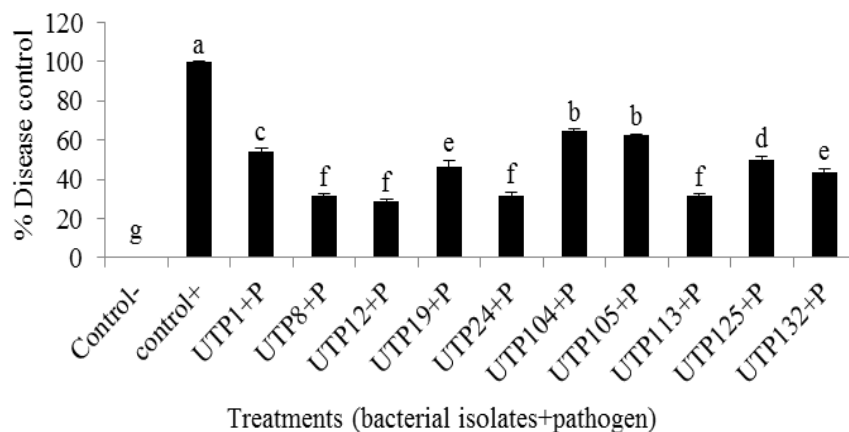
Table 2. The metabolic characteristics of bacterial isolates.

Bacterial isolates	IAA production	Siderophore production	Phosphate solubilization	ACC deaminase production	HCN production	Protease production
UTP1	-	+	+	-	+++	+
UTP8	-	+	-	+	-	+
UTP12	-	+	+	+	-	+
UTP19	-	-	-	+	-	+
UTP24	-	+	+	-	-	-
UTP104	+	+	+	-	++++	-
UTP105	+	+	+	+	-	+
UTP113	+	+	+	+	+	+
UTP125	+	+	+	+	-	+
UTP132	-	+	+	+	++	-

منفی) ثبت شد و در تیمار شاهد سالم (شاهد مثبت)، ریشه و طوقه گیاه به‌طور کامل سالم بود. در گیاهان آلوده طبق اصول کخ، قارچ بیمارگر شناسایی و بیماری‌زایی اثبات شد. در تیمارهای مربوط به مهار بیماری، جدایه‌های UTP104 و UTP105 به ترتیب با ۶۴/۵ و ۶۲/۳۳ درصد بیشترین تأثیر را در کاهش بیماری داشتند (شکل ۷).

### ارزیابی‌های گلخانه‌ای

در ارزیابی‌های گلخانه‌ای نیز پس از گذشت ۲۱ روز از کاشت، تأثیر تیمارها بر روی شدت بیماری و برخی شاخص‌های رشدی مانند ارتفاع، وزن تر و وزن خشک قسمتهای هوایی، ریشه و کل گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمون اثبات بیماری‌زایی، ۸۵/۳ درصد بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه در تیمار شاهد آلوده (شاهد



Treatments (bacterial isolates+pathogen)

شکل ۷- تأثیر جدایه‌های باکتریایی در مهیار بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم در گلخانه، ۲۱ روز بعد از کاشت. تیمار شاهد آلوده (شاهد منفی) فاقد هر گونه جدایه باکتریایی بوده و فقط دارای بیمارگر است. تیمار شاهد سالم (شاهد مثبت) فاقد بیمارگر و جدایه‌های باکتریایی هستند و همه گیاهان سالم هستند. اعداد مربوط به هر تیمار، میانگین سه تکرار ( $\pm$  خطای استاندارد) هستند. ستون‌های دارای حروف مشترک، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

Fig. 7. The effect of bacterial isolates control of wheat common root and crown rot disease in the greenhouse, 21 days after planting. The infected control treatment (negative control) does not contain any bacterial isolates and only contains pathogens. The healthy control treatment (positive control) does not contain pathogens and bacterial isolates, and all plants are healthy. The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to each treatment are the average of three replicates ( $\pm$  standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ ).

بر ارتفاع کل گیاه و وزن خشک کل گیاه داشت، درحالی که جدایه UTP105 از نظر این دو شاخص رشدی در گروه دوم آماری قرار گرفت. جدایه UTP105 همچنین، بیشترین تأثیر را بر ارتفاع قسمت‌های هوایی گیاه نشان داد و جدایه‌های UTP113 و UTP132 از این نظر در گروه دوم آماری قرار گرفتند. بیشترین وزن خشک قسمت‌های هوایی نیز در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های UTP105 و UTP132 مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری بین این جدایه‌ها با جدایه UTP113 از این نظر در سطح احتمال یک درصد وجود نداشت. بیشترین وزن تر کل و وزن تر قسمت‌های هوایی گیاه نیز مربوط به گیاهان تیمار شده با جدایه‌های UTP105 و UTP132 بود. جدایه‌های UTP104، UTP125 و UTP132 توانستند ارتفاع ریشه و وزن تر ریشه گیاه را بیشتر از سایر جدایه‌ها افزایش دهند و از نظر تأثیر بر وزن خشک ریشه، اختلاف معنی‌داری بین این جدایه‌ها در سطح احتمال یک درصد مشاهده نشد و بیشترین تأثیر از این نظر مربوط به این جدایه‌ها بود. به‌طور کلی، در گیاهان غیرآلوده، جدایه‌های UTP104 و UTP105 بر روی شاخص‌های رشدی

در ارزیابی تأثیر باکتری‌ها بر شاخص‌های رشدی گیاه آلوده و غیرآلوده، میزان اثربخشی باکتری‌ها متغیر بود و همه جدایه‌ها در مقایسه با شاهد لزوماً اثر افزایشی نداشتند. در ارزیابی تأثیر باکتری‌ها بر شاخص‌های رشدی گیاه آلوده، جدایه‌های UTP119 و UTP104 بیشترین تأثیر را بر ارتفاع کل گیاه داشتند، درحالی که جدایه‌های UTP24 و UTP105 از این نظر در گروه دوم آماری قرار گرفتند. همچنین، جدایه‌های UTP24 و UTP105 بیشترین تأثیر را به ترتیب بر ارتفاع قسمت‌های هوایی و ارتفاع ریشه داشتند. بیشترین وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه به جدایه UTP105 و وزن تر و وزن خشک کل گیاه و وزن تر و وزن خشک قسمت‌های هوایی نیز به جدایه UTP104 مربوط بود. در واقع، جدایه UTP104 بر ارتفاع و مقدار زیست‌توده قسمت‌های هوایی و کل گیاه گندم بیشترین تأثیر را نشان داد، در حالی که جدایه UTP105 بر روی ارتفاع و مقدار زیست‌توده ریشه و قسمت‌های هوایی گندم بیشترین تأثیر را داشت (جدول ۳). در ارزیابی تأثیر باکتری‌ها بر شاخص‌های رشدی گیاه غیرآلوده نیز جدایه UTP132 بیشترین تأثیر را

ریشه گندم موثرتر بودند و UTP105 نیز بر روی شاخص‌های رشدی همه شاخص‌های گیاه به جز ارتفاع هوایی  
رشدی هوایی بیشترین اثر را داشت. همچنین، UTP132 در نسبت به همه جدایه‌ها موثرتر بود (جدول ۴).

جدول ۳- تأثیر جدایه‌های باکتریایی بر برخی شاخص‌های رشدی گیاه گندم آلوده به بیمارگر در گلخانه، ۲۱ روز بعد از

کاشت.

Table 3. The effect of bacterial isolates on some growth factors of the wheat plant infected with pathogen in greenhouse, 21 days after sowing.

Bacterial isolates	Total length (cm)±SE	Shoot length (cm)±SE	Root length (cm)±SE	Total fresh weight (g)±SE	Shoot fresh weight (g)±SE	Root fresh weight (g)±SE	Total dry weight (g)±SE	Shoot dry weight (g)±SE	Root dry weight (g)±SE
Control +	22.5±0.2bc	18.4±0.45bc	4.1±0.26de	0.12±0.017bc	0.1±0.01ab	0.02±0.01bc	0.068±0.002cd	0.06±0.0ab	0.008±0.002ef
-Control	17.6±0.36e	15.3±0.5de	2.3±0.2g	0.07±0.01e	0.06±0.01cd	0.01±0.0c	0.035±0.003e	0.03±0.003d	0.005±0.003f
UTP1+P	20.5±1.0d	16.0±0.3d	4.5±0.2d	0.1±0.01cd	0.08±0.0a-d	0.02±0.01bc	0.06±0.01d	0.05±0.01bc	0.01±0.0ef
UTP8+P	15.9±1.15f	13.9±0.72fg	2.0±0.51g	0.06±0.02e	0.05±0.02d	0.01±0.0c	0.033±0.005e	0.028±0.003d	0.005±0.003f
UTP12+P	21.0±0.7cd	18.2±0.72c	2.8±0.17fg	0.11±0.0bc	0.1±0.01ab	0.01±0.0c	0.068±0.002cd	0.06±0.0ab	0.008±0.002ef
UTP19+P	25.5±0.5a	19.5±0.5ab	6.0±0.3c	0.13±0.0abc	0.09±0.017abc	0.04±0.02ab	0.058±0.002d	0.04±0.009cd	0.018±0.008cd
UTP24+P	23.5±0.5b	20.0±0.6a	2.5±0.5g	0.11±0.0bc	0.1±0.017ab	0.01±0.0c	0.066±0.0cd	0.06±0.003ab	0.006±0.003ef
UTP104+P	25.9±0.65a	18.4±0.45bc	7.5±0.5ab	0.15±0.017a	0.11±0.01a	0.04±0.01ab	0.092±0.002a	0.07±0.0a	0.022±0.002bc
UTP105+P	23.1±0.36b	14.8±0.43ef	8.3±0.3a	0.14±0.01ab	0.09±0.01abc	0.05±0.01a	0.081±0.002b	0.05±0.0bc	0.031±0.002a
UTP113+P	17.0±0.45ef	10.2±0.26h	6.8±0.3bc	0.11±0.01bc	0.07±0.01bcd	0.04±0.01ab	0.058±0.003d	0.03±0.0d	0.028±0.003ab
UTP125+P	16.8±0.75ef	13.2±0.34g	3.6±0.45ef	0.08±0.01de	0.06±0.02cd	0.02±0.0bc	0.043±0.009e	0.03±0.008d	0.013±0.002de
UTP132+P	20.8±0.62d	13.3±0.52g	7.5±0.46ab	0.12±0.01bc	0.09±0.02abc	0.03±0.01abc	0.067±0.003cd	0.05±0.003bc	0.017±0.001cd

P: بیمارگر؛ آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی است و اعداد مربوط به هر تیمار، میانگین سه تکرار (± خطای استاندارد)

هستند. ستون‌های دارای حروف مشترک، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

P: Pathogen; The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to each treatment are the average of three replicates (± standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ ).

جدول ۴- تأثیر جدایه‌های باکتریایی بر برخی شاخص‌های رشدی گیاه گندم غیر آلوده به بیمارگر در گلخانه، ۲۱ روز بعد از

کاشت.

Table 4. The effect of bacterial isolates on some growth factors of the wheat plant non-infected with pathogen in greenhouse, 21 days after sowing

Bacterial isolates	Total length (cm)±SE	Shoot length (cm)±SE	Root length (cm)±SE	Total fresh weight (g)±SE	Shoot fresh weight (g)±SE	Root fresh weight (g)±SE	Total dry weight (g)±SE	Shoot dry weight (g)±SE	Root dry weight (g)±SE
Control	22.5±0.2h	18.4±0.45f	4.1±0.26c	0.12±0.017cd	0.1±0.01c	0.02±0.01bc	0.07±0.02ef	0.06±0.015c	0.01±0.017b
UTP1	24.5±0.5g	20.0±1.0e	4.5±1.32bc	0.16±0.01b	0.13±0.01b	0.03±0.01ab	0.1±0.01cd	0.09±0.01b	0.01±0.0b
UTP8	18.8±0.34i	15.4±0.5g	3.4±0.81c	0.11±0.017d	0.1±0.017c	0.01±0.0c	0.057±0.006f	0.05±0.003c	0.007±0.004b
UTP12	25.0±0.3g	22.0±0.51d	3.0±0.79c	0.15±0.01bc	0.13±0.01b	0.02±0.01bc	0.089±0.003cde	0.08±0.0b	0.009±0.003b
UTP19	31.5±0.43d	25.5±0.2c	6.0±0.3b	0.13±0.01bcd	0.1±0.01c	0.03±0.0ab	0.06±0.01f	0.047±0.006c	0.013±0.005b
UTP24	27.7±0.36f	25.0±0.52c	2.7±0.3c	0.15±0.02bc	0.14±0.02b	0.01±0.0c	0.091±0.003cde	0.083±0.01 b	0.008±0.01b
UTP104	29.8±0.5e	20.3±0.26e	9.5±0.72a	0.12±0.017cd	0.08±0.01c	0.04±0.0a	0.06±0.02f	0.04±0.01c	0.02±0.01ab
UTP105	38.1±1.08b	31.8±0.5a	6.3±1.57b	0.2±0.017a	0.18±0.017a	0.02±0.0bc	0.13±0.0ab	0.12±0.0a	0.01±0.0b
UTP113	36.7±0.72c	30.5±0.6b	6.2±0.52b	0.15±0.0bc	0.13±0.01b	0.02±0.015bc	0.11±0.01bc	0.1±0.01ab	0.01±0.0b
UTP125	32.4±0.43d	22.7±0.6d	9.7±0.26a	0.13±0.0bcd	0.09±0.01c	0.04±0.01a	0.08±0.02def	0.05±0.01c	0.03±0.01a
UTP132	39.4±0.45a	30.0±0.5b	9.4±0.1a	0.21±0.01a	0.17±0.01a	0.04±0.0a	0.14±0.01a	0.12±0.0a	0.02±0.01ab

آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی است و اعداد مربوط به هر تیمار، میانگین سه تکرار (± خطای استاندارد) هستند. ستون‌های

دارای حروف مشترک، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند (آزمون دانکن،  $P \leq 0.01$ ).

The experiment is in a completely randomized design (CRD) and the values related to each treatment are the average of three replicates (± standard error). Bars with the same letters are not significantly different (Duncan test,  $P \leq 0.01$ ).



## بحث

مطالعه حاضر به منظور معرفی جدایه‌هایی از سودومونادهای فلورسنت با فعالیت آنتاگونیستی کارآمد برای مه‌ار بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه گندم ناشی از *B. sorokiniana* و تقویت رشد گیاه گندم انجام شد. جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش، کلنی‌هایی بی‌رنگ تا سفید مایل به کرم بودند. همه جدایه‌ها گرم منفی، کاتالاز مثبت و اکسیداز مثبت و نیز فاقد توانایی رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس، لهانیدن سیب‌زمینی، هیدرولیز نشاسته و ایجاد واکنش فوق حساسیت بودند. همچنین، طیفی از رنگ‌های فلورسانس سبز و زرد را در مشاهده با UV-Transilluminator با طول موج ۳۶۵ نانومتر نشان دادند. کلنی‌های سودوموناس ممکن است تقریباً بی‌رنگ باشند، اما رنگدانه‌های کلنی سفید، مایل به سفید، کرم و زرد رایج است. گونه‌های سودوموناس، باکتری‌هایی گرم منفی و هوازی هستند، اما در برخی موارد از نترات به عنوان جایگزینی برای اکسیژن استفاده می‌کنند و همین مسئله، امکان رشد بی‌هوازی را فراهم می‌کند. اکثر گونه‌ها به جز *P. luteola* و *P. oryzihabitans*، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت هستند. اغلب گونه‌های سودوموناس، تحت شرایط محدودیت آهن، سیدروفور زرد-سبز فلورسنت پیوریدین ترشح می‌کنند (Meyer et al., 2000). برخی از گونه‌های سودوموناس نیز ممکن است انواع دیگری از سیدروفور مانند پیوسیانین (آبی) توسط *P. aeruginosa* تولید کنند (Lau et al., 2004). کلنی‌های فلورسنت را می‌توان به راحتی در زیر نور ماوراء بنفش مشاهده کرد. گونه‌های *P. Putida* و *P. fluorescens* از اعضای گروه سودومونادهای فلورسنت هستند. برخلاف *P. aeruginosa*، آن‌ها قادر به رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس نیستند و پیوسیانین تولید نمی‌کنند (Hsueh et al., 1998).

در این بررسی، جدایه‌های UTP۱۱۳ توانست رنگدانه سبز فلورسنت با شدت بیشتری تولید کند. تولید رنگدانه فلورسنت سبز-زرد نشان‌گر ایجاد کمبود آهن در محیط کشت به‌دنبال ایجاد کمپلکس Fe (III) می‌باشد و این رنگدانه وجه‌تمایز سودوموناس‌های فلورسنت از سایر گونه‌های سودوموناس بوده و از گروه سیدروفورها هستند.

*B. sorokiniana* به دلیل آلوده کردن ریشه، طوقه، ساقه، برگ و بذر و نیز کاهش قابل توجه عملکرد محصول، یکی از بیمارگرهای خاک‌زاد خطرناک در گندم است. بنابراین، استراتژی‌های مدیریتی نه تنها باید بر محدود کردن حضور قارچ در اندام‌های هوایی گیاه متمرکز شوند، بلکه باید به کاهش زادمایه *B. sorokiniana* موجود در خاک نیز توجه شود. علاوه بر این، توسعه یک برنامه یکپارچه مدیریت بیماری برای مدیریت *B. sorokiniana* با استفاده از اقدامات زراعی، مه‌ار زیستی و قارچ‌کش‌های شیمیایی مهم است. پژوهش برای یافتن عوامل مه‌ار زیستی در سال‌های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و یافتن باکتری‌های آنتاگونیست برای استفاده در تلفیق با اقدامات زراعی و شیمیایی می‌تواند اثربخشی بالایی در مدیریت این بیمارگر داشته باشد (Al-Sadi, 2021). در مه‌ار پوسیدگی ریشه و طوقه گندم از روش‌های مختلفی استفاده شده است. در روش مه‌ار زیستی، استفاده از باکتری *Pseudomonas mediterranea* منجر به کاهش قابل توجه پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در پاکستان شد (Ullah et al., 2020). در تحقیقی دیگر، شاخص شدت بیماری پوسیدگی معمولی ریشه گندم به‌دنبال استفاده از *Nocardopsis dassonvillei* به عنوان یک عامل مه‌ار زیستی از ۹۰/۸ به ۲۷/۷ درصد کاهش یافته بود که به توانایی این باکتری در تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن نسبت داده شد. همچنین، مشخص شد که این باکتری رشد گندم را از طریق تولید IAA افزایش می‌دهد (Allali et al., 2019).

باکتری‌های آنتاگونیست نقش مهمی در سرکوب بیمارگرهای گیاهی خاک‌زاد دارند و می‌توانند به عنوان عوامل مه‌ار زیستی مورد استفاده قرار بگیرند. سازوکارهای فعالیت آنتاگونیستی شامل سرکوب بیمارگر توسط آنتی‌بیوز، رقابت برای فضا و منابع غذایی و تولید آنزیم‌های خارج سلولی تخریب‌کننده دیواره سلولی می‌باشد (Eken and Yuen, 2014). همچنین، متابولیت‌های ثانویه تولیدشده توسط میکروب‌های خاک، نقش مهمی در مه‌ار بیماری‌های گیاهی و بهبود رشد گیاه دارند (Yue et al., 2018).

همچنین، به خوبی مشخص شده است که تعدادی از سویه‌های سودوموناس جداسازی شده از محیط ریشه می‌توانند رشد گیاه را تقویت کنند (Maleki *et al.*, 2010; Hernández-León *et al.*, 2015; Panpatte *et al.*, 2016). این سویه‌ها با تولید IAA، سیدروفور، سیانید هیدروژن و انحلال فسفات رشد گیاه را افزایش دادند (Gopalakrishnan *et al.*, 2015; Uzair *et al.*, 2018).

در بررسی توانایی باکتری‌ها در انحلال فسفات معدنی، جدایه‌های UTP8 و UTP19 فاقد توانایی انحلال فسفات معدنی بودند. نقش گونه‌های سودوموناس در انحلال فسفات معدنی در تحقیقات زیادی ثابت شده است (Verma *et al.*, 2001; Damayanti *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2009). سفر یکی از درشت مغذی‌های اصلی محدودکننده رشد است که برای رشد مناسب گیاهان، به ویژه در مناطق گرمسیری، به دلیل دسترسی کم آن در خاک مورد نیاز است. سفر در همه جنبه‌های رشد و نمو گیاه از سطح مولکولی تا بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ضروری است. با این حال، در دسترس بودن اشکال محلول سفر برای گیاهان در خاک به دلیل تثبیت آن به عنوان فسفات‌های نامحلول آهن، آلومینیوم و کلسیم در خاک محدود است. استفاده از ریزموجودات حل‌کننده فسفات به عنوان کودهای زیستی برای تقویت کشاورزی طی چند دهه اخیر، موضوع مطالعات زیادی بوده است. این ریزموجودات همچنین می‌توانند در تحریک رشد گیاه نیز نقش داشته باشند (Kalayu, 2019). افزایش طول و وزن تر گیاه می‌تواند به ویژگی انحلال فسفات باکتری‌ها نیز مرتبط باشد (Tariq *et al.*, 2022).

در ارزیابی توانایی باکتری‌ها در تولید هورمون IAA، جدایه‌های UTP104، UTP105، UTP113 و UTP125 قادر به تولید اکسین IAA بودند. جدایه UTP125 با 1/743 میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین میزان اکسین را تولید کرد. اکسین‌ها دسته‌ای از هورمون‌های گیاهی یا تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه با برخی ویژگی‌های شبه مورفوژن هستند. این هورمون‌ها همچنین، در تعاملات ریزموجودات با گیاهان نقش دارد. اکسین باکتریایی می‌تواند در بسیاری از

سودوموناس‌های فلورسنت مدل‌های اصلی برای ارزیابی برهمکنش‌های مفید گیاه و باکتری هستند، زیرا آن‌ها طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های مفید متابولیکی را نشان می‌دهند و نقش مهمی در محیط ریشه دارند (Vacheron *et al.*, 2016).

در این پژوهش، به جز جدایه UTP19، بقیه جدایه‌ها قادر به تولید سیدروفور بودند. جدایه‌های UTP8، UTP12 و UTP24 کمترین قطر هاله را در آزمون سیدروفور تولید کردند. باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور با انحلال آهن و فسفات سبب افزایش رشد و عملکرد محصولات کشاورزی می‌شوند (Kloepper *et al.*, 1988; Campestre *et al.*, 2006)، اما مزایای دیگر این باکتری‌ها برای گیاهان انحلال فسفات (Timofeeva *et al.*, 2022) و تثبیت نیتروژن اتمسفر (Pankievicz *et al.*, 2021) است با توجه به این که فسفات و نیتروژن برای سنتز سیدروفور مورد نیاز هستند، باکتری‌های دارای این ویژگی‌ها به عنوان کودهای زیستی بالقوه در نظر گرفته می‌شوند (Timofeeva *et al.*, 2022). باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور فرآیندهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان را در شرایط نامساعد تسریع می‌کنند. افزودن Fe (III) و سیدروفورها به خاک باعث رشد بهتر و افزایش وزن گیاه در مقایسه با افزودن Fe (III) به تنهایی می‌شود (De Serrano, 2017). همچنین، سیدروفورها با رقابت برای آهن و القای مسیرهای دفاعی گیاه از گیاهان در برابر بیمارگر محافظت می‌کنند (Sharifi *et al.*, 2010).

در سال‌های اخیر، بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که سویه‌های سودوموناس جداسازی شده از محیط ریشه می‌توانند بیماری‌های ناشی از انواع بیمارگرها را مهار کنند (Wahyudi and Astuti, 2011; Gopalakrishnan *et al.*, 2012; Agaras *et al.*, 2020). طی تحقیقی، *P. fluorescens* VUPf5 شدت بیماری پاخوره را تا ۸۵ درصد مهار کرد (Lagzian *et al.*, 2013). در تحقیقی دیگر، *P. fluorescens* UTP100 قادر به تجمع در محیط ریشه ارقام مختلف گندم بود و از گیاه در برابر بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گندم ناشی از *Fusarium culmorum* محافظت کرد (Hosseinzadeh *et al.*, 2017).

در آزمون تولید HCN، جدایه‌های UTP<sub>۱۰۴</sub>، UTP<sub>۱۱۳</sub> و UTP<sub>۱۳۲</sub> قادر به تولید HCN بودند. HCN یک متابولیت ثانویه است که توسط بسیاری از گونه‌های سودوموناس آنتاگونیست تولید می‌شود (Michelsen & Stougaard, 2012). این متابولیت بر اساس سمیت آن برای بیمارگرهای گیاهی به‌عنوان یک عامل مهار زیستی شناخته می‌شود. همچنین، به‌طور غیرمستقیم در دسترس بودن فسفات را افزایش می‌دهد (Rijavec & Lapanje, 2016). HCN به‌طور کلی به‌عنوان یک متابولیت ثانویه در نظر گرفته می‌شود که نقش اکولوژیکی دارد و یک مزیت انتخابی به باکتری‌های تولیدکننده می‌دهد. فعالیت سیانوزنری در باکتری‌ها بخشی از ظرفیت مهار زیستی باکتری‌هایی است که بیماری‌های قارچی برخی از گیاهان مهم اقتصادی را مهار می‌کنند. HCN ممکن است بر استقرار گیاه تأثیر بگذارد یا از توسعه بیماری گیاهی جلوگیری کند (Lanteigne et al., 2012). برخی از مطالعات، HCN را بر اساس عدم همبستگی سطح HCN تولیدشده توسط ریزوباکتری‌ها با اثرات مهار زیستی در شرایط آزمایشگاهی زیر سوال برده‌اند. این مطالعات نشان داده‌اند که HCN به‌طور مستقیم در فرآیند مهار زیستی عمل نمی‌کند، بلکه در فرآیندهای ژئوشیمیایی در بستر مانند کلاته کردن فلزات نقش دارد که منجر به افزایش غیرمستقیم در دسترس بودن مواد مغذی برای ریزوباکتری‌ها و میزبان‌های گیاهی آن‌ها می‌شود (Rijavec & Lapanje, 2016). همچنین، پیشنهاد شده است که HCN در محیط ریشه می‌تواند با آهن کمپلکس تشکیل بدهد. اگرچه این ایده بر رقابت با عوامل بیماری‌زای گیاهی متمرکز برای جذب آهن موجود و به تبع آن برای اعمال مهار زیستی نیز مرتبط بود، اما بعید است باکتری‌های سیانوزن بتواند با کارایی بالایی در محیط ریشه از HCN برای رقابت با باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور در کلاته کردن آهن استفاده کنند. HCN و سیدروفورها ثابت‌های پایداری کمپلکس آهن مشابهی دارند، اما سیدروفورها با سرعت بسیار بالاتری تولید می‌شود و به‌طور کلی کارایی بالاتری برای کلاته کردن Fe (III) نسبت به HCN دارد (Domagal-Goldman, 2009). این احتمال

فرآیندهای رشد گیاه که توسط اکسین تنظیم می‌شود، تداخل ایجاد کند. این هورمون در باکتری‌ها از مسیرهای متعددی بیوسنتز می‌شود. شواهد زیادی نشان داده است، IAA به‌عنوان محرک اصلی طبیعی، یک مولکول سیگنال‌دهنده در ریزموجودات است. بنابراین، IAA می‌تواند به‌عنوان یک مولکول سیگنال‌دهنده متقابل در تعاملات میکروبی گیاه عمل کند (Spaepen & Vanderleyden, 2011). تولید غلظت زیاد اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت ویژگی بارز آن‌ها است. این هورمون موجب افزایش سطح ریشه و تعداد ریشه‌های موئین می‌شود و به این ترتیب جذب مواد غذایی و استقرار بیشتر گیاه را در خاک افزایش می‌دهد. از آنجایی که اکثر فرآیندهای فیزیولوژیکی در گیاه به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم با این هورمون گیاهی مرتبط هستند، جای تعجب نیست که باکتری‌های محرک رشد می‌توانند بر مقدار و محل تولید اکسین و همچنین جهت حرکت اکسین در گیاه تأثیر بگذارند (Ahmed & Hasnain, 2014). تأثیر اکسین بر مورفونریز ریشه از اثرات مفید تا اثرات منفی متغیر است (Xie et al., 1996). اثر IAA بر روی سیستم ریشه به غلظت آن بستگی دارد. اغلب در غلظت‌های پایین IAA رشد ریشه را تحریک و در غلظت‌های بالاتر رشد ریشه را مهار می‌کند. محدوده غلظت بهینه ممکن است بسیار محدود باشد که در *Pseudomonas putida* این مورد مشاهده شده است (Xie et al., 1996). همچنین، نتایج مشابهی در *Pseudomonas thivervalensis* تولیدکننده اکسین بر روی طول و انشعابات ریشه‌های گیاه ارایدوپسیس مشاهده شده است (Persello-Cartieaux et al., 2001). علاوه بر مقدار اکسین باکتریایی تولید شده، اثرات متضاد این فیتوهورمون بر رشد ریشه گیاه به حساسیت خود گیاه نیز مرتبط است (Ansary et al., 2012). در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از تعیین میزان تولید IAA به‌وسیله جدایه‌های UTP<sub>۱۰۴</sub>، UTP<sub>۱۰۵</sub>، UTP<sub>۱۱۳</sub> و UTP<sub>۱۲۵</sub> و تعیین همبستگی آن با افزایش رشد گیاه نشان داد که بین افزایش میزان تولید اکسین با افزایش ارتفاع، زیست توده تر و خشک گیاه گندم همبستگی وجود ندارد.

بیمارگر وجود دارد و جدایه UTP<sub>105</sub> با ۶۲/۵ و ۷۰ درصد به ترتیب در آزمون کشت متقابل و آزمون تولید متابولیت‌های فرار بیشترین میزان بازدارندگی از رشد میسلیمی بیمارگر را نشان داد.

در بررسی پتانسیل فعالیت آنزیمی و محرک رشدی باکتری‌ها مشخص شد، جدایه UTP<sub>104</sub> قادر به انحلال فسفات معدنی، تولید سیانید هیدروژن، IAA و سیدروفور و جدایه UTP<sub>105</sub> نیز قادر به انحلال فسفات معدنی، تولید IAA و آنزیم ACC دآمیناز هستند. در ارزیابی‌های گلخانه‌ای، شدت بیماری ۸۵/۳ درصد برآورد شد و جدایه‌های UTP<sub>104</sub> و UTP<sub>105</sub> به ترتیب با ۶۴/۵ و ۶۲/۳ درصد کاهش بیماری، بیشترین میزان مهار بیماری را نشان دادند. اثر مهار زیستی UTP<sub>104</sub> ممکن است به علت تولید HCN باشد. از طرفی، نمی‌توان نقش‌های IAA در سیگنال‌دهی و تحریک رشد ریشه، آنزیم ACC دآمیناز در تولید ریشه‌های طویل و کاهش رشد گیاه در شرایط تنش‌های زیستی و غیرزیستی، سیدروفور در افزایش وزن گیاه و رقابت با بیمارگر در دستیابی به آهن و انحلال فسفات در افزایش طول و وزن تر و خشک گیاه انکار کرد. به طور خلاصه، نتایج نشان داد، جدایه UTP<sub>104</sub> از نظر تولید IAA، سیدروفور و سیانید هیدروژن مثبت بوده و دارای فعالیت انحلال فسفات معدنی بود. جدایه UTP<sub>105</sub> نیز قادر به تولید IAA، سیدروفور، ACC دآمیناز و پروتئاز و دارای توانایی انحلال فسفات معدنی بود که همه این ویژگی‌ها می‌توانند به اثرات مفید این جدایه‌ها در بهبود رشد گیاه و مهار بیماری پوسیدگی معمولی ریشه و طوقه در گیاه گندم کمک می‌کند.

### نتیجه‌گیری کلی و چشم‌انداز

نتایج نشان داد که سودوموناد‌های فلورسنت انتخاب شده می‌توانند با ترشح انواع متابولیت‌ها، رشد میسلیم B. sorokiniana را مهار کنند. همچنین، سودوموناد‌های فلورسنت آنتاگونیست می‌توانند به‌طور موثری شدت بیماری را در شرایط گلخانه کاهش داده و رشد گیاه را از طریق سازوکارهای محرک رشدی افزایش دهند. جدایه UTP<sub>104</sub>

وجود دارد که HCN باعث ایجاد مقاومت سیستمیک در برخی گیاهان می‌شود (Wei *et al.*, 1991) و آن‌ها را در برابر حمله بیمارگرهای گیاهی مقاوم می‌کند. HCN توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه در مقادیر کم تولید می‌شود که مؤید عدم مقاومت قارچ‌ها در برابر سایر متابولیت‌های ضدقارچی سنتز شده توسط باکتری‌ها و به تبع آن افزایش اثربخشی عوامل مهار زیستی است (Olanrewaju *et al.*, 2017). یکی از مطالعات اولیه بر روی سودوموناد‌های تولیدکننده HCN نشان داد که HCN می‌تواند برای بیمارگرهای گیاهی سمی باشد (Voisard *et al.*, 1989). تحقیقات دیگر نشان داده است، HCN هیچ اقدام خاصی در برابر بیمارگرها ندارد و حتی در اکثر آزمایشات آزمایشگاهی باعث اثرات فیتوتوکسیک می‌شود (Alström and Burns, 1989; Kremer and Souissi, 2001; Rudrappa *et al.*, 2008; Blom *et al.*, 2011) عملکرد مهار زیستی این باکتری‌ها زیر سوال می‌رود.

فعالیت ACC دآمیناز یکی از صفات کلیدی مورد استفاده توسط باکتری‌های محرک رشد برای کاهش سطوح اتیلن تحت طیف وسیعی از شرایط تنشی است (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2019). در نتیجه منجر به تولید ریشه‌های طویل‌تر و کاهش مهار رشد گیاه در شرایط تنش‌های محیطی یا وجود بیمارگر می‌شود (Viterbo *et al.*, 2010). در این بررسی، همه جدایه‌ها به‌جز جدایه‌های UTP<sub>1</sub>، UTP<sub>24</sub> و UTP<sub>104</sub> قادر به تولید آنزیم ACC دآمیناز بودند.

علاوه بر ویژگی‌های محرک رشد گیاه که به‌طور غیرمستقیم بر ویژگی مهار زیستی عوامل مهار زیستی موثر هستند، آنزیم‌های خارج سلولی مانند پروتئاز نیز به‌طور گسترده در مهار بیمارگرهای گیاهی نقش دارند. جدایه‌های باکتریایی که آنزیم‌های هیدرولیتیک مختلف تولید می‌کنند، اثر آنتاگونیستی روی قارچ‌های بیمارگر خاک‌زاد دارند که در بررسی حاضر، جدایه‌های UTP<sub>104</sub>، UTP<sub>105</sub> و UTP<sub>132</sub> فاقد آنزیم پروتئاز بودند. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که در آزمون‌های آنتاگونیستی تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها از نظر میزان بازدارندگی از رشد

شبکه تعاملاتی دیگر و نیز اثرات احتمالی آن‌ها بر همدیگر همچنین، مطالعات بیشتر بر روی توانایی این جدایه‌ها برای مه‌ار *B. sorokiniana* تحت شرایط مختلف تنش مانند خشکی و بررسی اثر آن‌ها به تنهایی و در تعامل با سایر باکتری‌ها علیه *B. sorokiniana* و دیگر بیمارگرها در حال تکمیل شدن و انتشار قبل از تجاری سازی است.

### سپاسگزاری

این مطالعه با حمایت دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران انجام شد.

و UTP۱۰۵ به‌واسطه دارا بودن توانایی انحلال فسفات معدنی، تولید سیانید هیدروژن، IAA، سیدروفور و آنزیم ACC دآمیناز توانستند اهداف تحقیق را پوشش دهند. درواقع، تحقیق حاضر، گزارشی از جدایه‌های بومی سودومونادهای فلورسنت است که می‌توانند به‌طور موثر برای مه‌ار زیستی *B. sorokiniana* به‌عنوان یکی از عوامل اصلی ایجاد کننده بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گندم استفاده شوند. شناسایی بیشتر خواص فنوتیپی و بیوشیمیایی ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط این جدایه‌ها، بررسی‌های بیشتر در جهت آشکار شدن سازوکار عمل هر یک از این ویژگی‌ها در تعاملات بین این بیمارگر و گیاه گندم و یا هر

### References

- Abdullah, A.S., Gibberd, M.R. & Hamblin, J. 2020. Co-infection of wheat by *Pyrenophora tritici-repentis* and *Parastagonospora nodorum* in the wheatbelt of Western Australia. *Crop and Pasture Science*, 71(2): 119–127.
- Aboukhaddour, R., Fetch, T., McCallum, B.D., Harding, M.W., Beres, B.L. & Graf, R.J. 2020. Wheat diseases on the prairies: A Canadian story. *Plant Pathology*, 69(3): 418–432.
- Agaras, B.C., Noguera, F., Anta, G.G., Wall, L.G. & Valverde, C. 2020. Biocontrol potential index of pseudomonads, instead of their direct-growth promotion traits, is a predictor of seed inoculation effect on crop productivity under field conditions. *Biological Control*, 143: 104209.
- Ahmed, A. & Hasnain, S. 2014. Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 63(3): 261–266.
- Allali, K., Goudjal, Y., Zamoum, M., Bouznada, K., Sabaou, N. & Zitouni, A. 2019. *Nocardiosis dasonvillei* strain MB22 from the Algerian Sahara promotes wheat seedlings growth and potentially controls the common root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Plant Pathology*, 101: 1115–1125.
- Al-Sadi, A.M. & Deadman, M.L. 2010. Influence of seed-borne *Cochliobolus sativus* (Anamorph *Bipolaris sorokiniana*) on crown rot and root rot of barley and wheat. *Journal of Phytopathology*, 158(10): 683–690.
- Al-Sadi, A.M. 2021. *Bipolaris sorokiniana*-induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: A review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11: 584899.
- Alström, S. & Burns, R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, 7: 232–238.
- Ansary, M., Rahmani, H., Ardakani, M.R., Paknejad, F., Davood, H. & Mafakheri, S. 2012. Effect of *Pseudomonas fluorescens* on proline and phytohormonal status of maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. *Annals of Biological Research*, 3(2): 1054–1062.
- Asha, B.B., Chandra Nayaka, S., Udaya Shankar, A.C., Srinivas, C. & Niranjana, R. 2011. Biological control of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* causing wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Microbiology Research*, 3: 79–84.
- Bajaj, B.K. & Sharma, P. 2011. An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2. *New biotechnology*, 28(6): 725–732.
- Blom, D., Fabbri, C., Connor, E.C., Schiestl, F.P., Klausner, D.R., Boller, T., Eberl, L. & Weiskopf, L. 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental microbiology*, 13(11): 3047–3058.
- Brick, J.M., Bustock, R.M. & Silversone, S.E. 1991. Rapid *in situ* assay for indole acetic acid production by bacterial immobilization on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2): 535–538.
- Campanella, V., Mandalà, C., Angileri, V. & Miceli, C. 2020. Management of common root rot and Fusarium foot rot of wheat using *Brassica carinata* break crop green manure. *Crop Protection*, 130: 105073.
- Campestre, M.P., Castagno, L.N., Estrella, M.J. & Ruiz, O.A. 2016. *Lotus japonicus* plants of the Gifu B-129 ecotype subjected to alkaline stress improve their Fe<sup>(2+)</sup> bio-availability through inoculation with *Pantoea eucalypti* M91. *Journal of Plant Physiology*, 192: 47–55.
- Castro, R.O., Cornejo, H.A.C., Rodriguez, L.M. & Bucio, J.L. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8): 701–712.



- Damayanti, T.A., Pardede, H. & Mubarik, N.R. 2007. Utilization of root colonizing bacteria to protect hot-pepper against Tobacco Mosaic Tobamovirus. HAYATI Journal of Biosciences, 14(3): 105–109.
- Delkhah, Z. & Behboudi, K. 2021. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* Tr6 vs. *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of damping-off disease in *Cucumis sativus*. Journal of Crop Protection, 10(2): 411–423.
- De Serrano, L.O. 2017. Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields. Biomolecular Concepts, 8(3–4): 169–178.
- Domagal-Goldman, S.D., Paul, K.W., Sparks, D.L. & Kubicki, J.D. 2009. Quantum chemical study of the Fe(III)-desferrioxamine B siderophore complex—electronic structure, vibrational frequencies, and equilibrium Fe-isotope fractionation. Geochimica et Cosmochimica Acta, 73: 1–12.
- Durairaj, K., Velmurugan, P., Park, J.H., Chang, W.S., Park, Y.J., Senthilkumar, P., Choi, K.M., Lee, J.H. & Oh, B.T. 2017. Potential for plant biocontrol activity of isolated *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus stratosphericus* strains against bacterial pathogens acting through both induced plant resistance and direct antagonism. FEMS Microbiology Letters, 364(23): 1–8.
- Dworkin, M. & Foster, J.W. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. Journal of bacteriology, 75(5): 592–603.
- Eken, C. & Yuen, G. 2014. Biocontrol of common root rot of wheat with *Lysobacter enzymogenes* and binucleate *Rhizoctonia*. Romanian Agricultural Research, 31: 309–314.
- Fedel-Moen, R. & Harris, J.R. 1987. Stratified distribution of *Fusarium* and *Bipolaris* on wheat and barley with dryland root rot in South Australia. Plant Pathology, 36(4): 447–454.
- Fernandez, M.R., May, W.E. & Lafond, G.P. 2010. Effect of fungicide seed treatments on root pathogens of cereal crops under field conditions. Canadian Journal of Plant Science, 90: 905–917.
- Fiddaaman, P.J. & Rossal, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles. Journal of Applied Microbiology, 76(4): 345–405.
- Ganeshan, G. & Kumar, A.M. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. Journal of Plant Interactions, 1(3): 123–134.
- Ghazy, N. & El-Nahrawy, S. 2021. Siderophore production by *Bacillus subtilis* MF497446 and *Pseudomonas koreensis* MG209738 and their efficacy in Controlling *Cephalosporium maydis* in maize plant. Archives of Microbiology, 203(3): 1195–1209.
- Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Prakash, B., Sathya, A. & Vijayabharathi, R. 2015. Plant growth-promoting traits of *Pseudomonas geniculata* isolated from chickpea nodules. 3 Biotech, 5: 653–661.
- Gopalakrishnan, S., Upadhyaya, H.D. & Vadlamud, S. 2012. Plant growth-promoting traits of biocontrol potential bacteria isolated from rice rhizosphere. Springerplus, 1: 1–7.
- Govaerts, B., Mezzalama, M., Sayre, K.D., Crossa, J., Nicol, J.M. & Deckers, J. 2006. Long-term consequences of tillage, residue management, and crop rotation on maize/wheat root rot and nematode populations in subtropical highlands. Applied Soil Ecology, 32: 305–315.
- Gulyaeva, E., Yusov, V., Rosova, M., Mal'chikov, P., Shaydayuk, E., Kovalenko, N., Wanyera, R., Morgounov, A., Yskakova, G. & Rsaliyev, A. 2020. Evaluation of resistance of spring durum wheat germplasm from Russia and Kazakhstan to fungal foliar pathogens. Cereal Research Communications, 48: 71–79.
- Gupta, S. & Pandey, S. 2019. ACC deaminase producing bacteria with multifarious plant growth promoting traits alleviates salinity stress in French bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. Frontiers in Microbiology, 10: 1506.
- Hagedorn, C., Gould, W.D. & Berardinelli, R.T. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied Environmental Microbiology, 55(11): 2793–2797.
- Hajjam, Y., Thami-Alami, I., Udupa, S. & Cherkaoui, S. 2016. Isolation and evaluation of phosphate solubilizing Rhizobia from root nodules of faba bean (*Vicia faba* L.) in morocco. Journal of Materials and Environmental Science, 7(11): 4000–4010.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M. & del Carmen Orozco-Mosqueda, M. 2015. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. Biological Control, 81: 83–92.
- Hosseinzadeh, H., Behboudi, K. and Delkhah, Z. 2017. Interaction of *Pseudomonas fluorescens* UTP100, wheat cultivars and *Fusarium culmorum*. Iranian Journal of Plant Protection Science, 48(2): 327–339. (In Persian with English summary).
- Hsueh, P.R., Teng, L.J., Pan, H.J., Chen, Y.C., Sun, C.C., Ho, S.W. & Luh, K.T. 1998. Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bacteremia among oncology patients. Journal of Clinical Microbiology, 36: 2914–7.
- Kalayu, G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: Promising approach as biofertilizers. International Journal of Agronomy, 2019: 4917256.



- Karamian, F., Salari, M., Pirnia, M., Ahmadpour, A. & Javan Nikkhah, M. 2022. Mating type and fertility status in populations of *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of root and crown common rot of wheat in Iran. Iranian Journal of Plant Protection Science, 52(2):1–14. (In Persian with English summary).
- Kazan, K. & Gardiner, D.M. 2018. Fusarium crown rot caused by *Fusarium pseudograminearum* in cereal crops: Recent progress and future prospects. Molecular Plant Pathology, 19(7): 1547–1562.
- King, E.O., Word, M.K. & Raney, D.E. 1954. To simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 414: 301–307.
- Klein, T.A., Burgess, L.W. & Ellison, F.W. 1991. The influence and spatial patterns of wheat plants infected by *Fusarium graminearum* group 1 and the effect of crown rot on yield. Australian Journal of Agricultural Research, 42: 399–407.
- Klopper, J.W., Lifshitz, R. & Schroth, M.N. 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. ISI Atlas Sci.: Animal and Plant Sciences, 60–64.
- Köhl, J., Kolnaar, R. & Ravensberg, W.J. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science, 10: 845.
- Kremer, R.J. & Souissi, T. 2001. Cyanide production by rhizobacteria and potential for suppression of weed seedling growth. Current microbiology, 43(3): 182–186.
- Kumar, G.P., Mir Hassan Ahmed, S.K., Suseelendra Desai, S., Amalraj, E.L.D. & Abdul Rasul, A. 2014. *In vitro* screening for abiotic stress tolerance in potent biocontrol and plant growth promoting strains of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. International Journal of Bacteriology, 2014: 195946.
- Lagzian, A. Saberi Riseh, R., Khodaygan, P., Sedaghati, E. & Dashti, H. 2013. Introduced *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 as an important biocontrol agent for controlling *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* the causal agent of take-all disease in wheat. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 46: 2104–2116.
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z. & Barka, E.A. 2022. Biological control of plant pathogens: A global perspective. Microorganisms, 10(3): 596.
- Lanteigne, C., Gadkar, V.J., Wallon, T., Novinscak, A. & Fillion, M. 2012. Production of DAPG and HCN by *Pseudomonas* sp. LBUM300 contributes to the biological control of bacterial canker of tomato. Phytopathology, 102(10): 967–973.
- Lau, G.W., Hassett, D.J., Ran, H. & Kong, F. 2004. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. Trends in Molecular Medicine, 10: 599–606.
- Ledingham, R.J., Atkinson, T.G., Horricks, J.S., Mills, J.T., Piening, L.J. & Tinline, R.D. 1973. Wheat losses due to common root rot in the prairie provinces of Canada, 1969–71. Canadian Plant Disease Survey, 53: 113–22.
- Maleki, M., Mostafaei, 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: 676–683.
- Manasa, M., Ravinder, P., Gopalakrishnan, S., Srinivas, V., Sayyed, R.Z., El Enshasy, H.A., Yahayu, M., Kee Zuan, A.T., Kassem, H.S. & Hameeda, B. 2021. Co-inoculation of *Bacillus* spp. for growth promotion and iron fortification in sorghum. Sustainability, 13(21): 12091.
- Mansoori, B. & Pazhoumand, M. 2005. Field reaction of some wheat advanced lines and cultivars to common root and crown rot pathogens in Fars province. Seed and Plant Journal, 21:81–92. (In Persian with English summary).
- Mansoori, B., Ravanlu, A., Nurullahi, K., Azadbakht, N., Jafari, H. & Qalandar, M. 2002. Common root and crown rot disease of wheat in West Azarbaijan, Ilam, Lorestan, Zanjan and Markazi provinces. 15<sup>th</sup> Iranian plant protection Congress, Kermanshah (In Persian with English summary).
- Meyer, J.M., Geoffroy, V.A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. & Palleroni, N. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2745–53.
- Michelsen, C.F. & Stougaard, P. 2012. Hydrogen cyanide synthesis and antifungal activity of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* In5 from Greenland is highly dependent on growth medium. Canadian Journal of Microbiology, 58(4): 381–390.
- Moya-Elizondo, E.A., Rew, L.J., Jacobsen, B.J., Hogg, A.C. & Dyer, A.T. 2011. Distribution and prevalence of fusarium crown rot and common root rot pathogens of wheat in Montana. Plant Disease, 95(9): 1099–1108.
- O'Brien, P.A. 2017. Biological control of plant diseases. Australasian Plant Pathology, 46(4):293–304.
- Olanrewaju, O.S., Glick, B.R. & Babalola, O.O. 2017. Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 33(11): 197.
- Orozco-Mosqueda, M.D.C., Duan, J., DiBernardo, M., Zetter, E., Campos-García, J., Glick, B.R. & Santoyo, G. 2019. The production of ACC deaminase and trehalose by the plant growth promoting

- bacterium *Pseudomonas* sp. UW4 synergistically protect tomato plants against salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1392.
- Pankievicz, V.C.S., do Amaral, F.P., Ané, J.M. & Stacey, G. 2021. Diazotrophic bacteria and their mechanisms to interact and benefit cereals. *Molecular Plant–Microbe Interactions: MPMI*, 34(5): 491–498.
- Panpatte, D.G., Jhala, Y.K., Shelat, H.N. & Vyas, R.V. 2016. *Pseudomonas fluorescens*: A promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture; Springer: New Delhi, India.
- Persello–Cartieaux, F., David, P., Sarrobert, C., Thibaud, M.C., Achouak, W., Robaglia, C. & Nussaume, L. 2001. Utilization of mutants to analyze the interaction between *Arabidopsis thaliana* and its naturally root–associated *Pseudomonas*. *Planta*, 212: 190–198.
- Qostal, S., Kribel, S., Chliyeh, M., Serghat, S., KarimaSelmaoui, A.O.T., Zaarati, H., Benkirane, R. & Douira, A. 2019. Study of the fungal complex responsible for root rot of wheat and barley in the north–west of morocco. *Plant Archives*, 19(2): 2143–2157.
- Rijavec, T. & Lapanje, A. 2016. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1785.
- Rudrappa, T., Czymmek, K.J., Paré, P.W. & Bais, H.P. 2008. Root–secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148(3): 1547–1556.
- Salehpour, M., Etebarian, H.R., Roustaei, A., Khodakaramian, G. & Aminian, H. 2005. Biological control of common root rot of wheat (*Bipolaris sorokiniana*) by *Trichoderma* isolates. *Plant Pathology Journal*, 4(1): 85–90.
- Saremi, H. & Saremi, H. 2013. Isolation of the most common *Fusarium* species and the effect of soil solarisation on main pathogenic species in different climatic zones of Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 585–596.
- Sharifi, R., Ahmadzadeh, M., Sharifi–Tehrani, A. & Talebi–Jahromi, K. 2010. Pyoverdine production in *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 and its association with suppression of common bean damping off caused by *Rhizoctonia solani* (Kühn). *Journal of Plant Protection Research*, 50: 72–78.
- Smiley, R.W., Gourlie, J.A., Easley, S.A., Patterson, L.M. & Whittaker, R.G. 2005. Crop damage estimates for crown rot of wheat and barley in the Pacific Northwest. *Plant Disease*, 89(6): 595–604.
- Spaepen, S. & Vanderleyden, J. 2011. Auxin and plant–microbe interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(4): a001438.
- Stockwell, V.O. & Stack, J.P. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology*, 97(2): 244–249.
- Taheri, E., Tarighi, S. & Taheri, P. 2022. Isolation, identification, and characterization of bacterial endophytes in Iranian wheat cultivars. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(2): 91–108. (In Persian with English summary).
- Tariq, M.R., Shaheen, F., Mustafa, S., Ali, S., Fatima, A., Shafiq, M., Safdar, W., Sheas, M.N., Hameed, A. & Nasir, M.A. 2022. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from medicinal plants improve growth of mint. *PeerJ*, 10: e13782.
- Timofeeva, A.M., Galyamova, M.R. & Sedykh, S.E. 2022. Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants (Basel, Switzerland)*, 11(22): 3065.
- Tinline, R.D. 1977. Multiple infections of sub–crown internodes of wheat (*Triticum aestivum*) by common root rot fungi. *Canadian Journal of Botany*, 55: 30–34.
- Tunali, B., Nicol, J.M., Hodson, D., Uçkun, Z., Büyük, O., Erdurmuş, D., Hekimhan, H., Aktaş, H., Akbudak, M.A. & Bağcı, S.A. 2008. Root and crown rot fungi associated with spring, facultative, and winter wheat in Turkey. *Plant Disease*, 92(9): 1299–1306.
- Ullah, H., Yasmin, H., Mumtaz, S., Jabeen, Z., Naz, R. & Nosheen, A. 2020. Multitrait *Pseudomonas* spp. isolated from monocropped wheat (*Triticum aestivum*) suppress *Fusarium* root and crown rot. *Phytopathology*, 110: 582–592.
- Uzair, B., Kausar, R., Bano, S.A., Fatima, S., Badshah, M., Habiba, U. & Fasim, F. 2018. Isolation and molecular characterization of a model antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* divulging *in vitro* plant growth promoting characteristics. *BioMed Research International*, 2018: 6147380.
- Vacheron, J., Moënné–Loccoz, Y., Dubost, A., Gonçalves–Martins, M., Muller, D. & Prigent–Combaret, C. 2016. Fluorescent pseudomonas strains with only few plant–beneficial properties are favored in the maize rhizosphere. *Frontiers in plant science*, 7: 1212.
- Vanitha, S. & Ramjegathesh, R. 2014. Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against coleus root rot disease. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 5: 216.
- Verma, S.C., Ladha, J.K. & Tripathi, A.K., 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization from deep water rice. *Journal of Biotechnology*, 91: 127–141.
- Viterbo, A., Landau, U., Kim, S., Chernin, L. & Chet, I. 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth–promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiology Letters*, 305: 42–48.

- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & Dèfago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *The EMBO journal*, 8(2): 351–358.
- Wahyudi, A.T. & Astuti, R.I. 2011. Screening of *Pseudomonas* sp. isolated from rhizosphere of soybean plant as plant growth promoter and biocontrol agent. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6: 134–141.
- Wang, X., Zhou, X., Cai, Z., Guo, L., Chen, X., Chen, X., Liu, J., Feng, M., Qiu, Y., Zhang, Y. & Wang, A. 2020. A biocontrol strain of *Pseudomonas aeruginosa* CQ-40 promote growth and control *Botrytis cinerea* in Tomato. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10: 22.
- Wei, G., Klopper, J.W. & TuZun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81: 1508–1512.
- White, D.J., Chen, W. & Schroeder, K.L. 2019. Assessing the contribution of ethaboxam in seed treatment cocktails for the management of metalaxyl-resistant *Pythium ultimum* var. *ultimum* in Pacific Northwest spring wheat production. *Crop Protection*, 115: 7–12.
- Wildermuth, G.B., Tinline, R.D. & McNamara, R.B. 1992. Assessment of yield loss caused by common root rot in wheat cultivars in Queensland. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43: 43–58.
- Win, K.T., Kobayashi, M., Tanaka, F., Takeuchi, K., Oo, A.Z. & Jiang, C.J. 2022. Identification of *Pseudomonas* strains for the biological control of soybean red crown root rot. *Scientific Reports*, 12: 14510.
- Woomer, P., Bennet, J. & Yost, R. 1990. Overcoming the inflexibility of most-probable number procedures. *Agronomy Journal*, 82: 349–353.
- Xie, H., Pasternak, J. & Glick, B. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology*, 32: 67–71.
- Xu, W., Xu, L., Deng, X., Goodwin, P.H., Xia, M., Zhang, J., Wang, Q., Sun, R., Pan, Y., Wu, C. & Yang, L. 2021. Biological control of take-all and growth promotion in wheat by *Pseudomonas chlororaphis* YB-10. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(7): 903.
- Xu, F., Yang, G., Wang, J., Song, Y., Liu, L., Zhao, K., Li, Y. & Han, Z. 2018. Spatial distribution of root and crown rot fungi associated with winter wheat in the North China Plain and its relationship with climate variables. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1054.
- Yue, H.M., Wang, M., Gong, W.F. & Zhang, L.Q. 2018. The screening and identification of the biological control fungi *Chaetomium* spp. against wheat common root rot. *FEMS Microbiology Letters*, 365(22): fny242.

---

**Bioefficacy of fluorescent pseudomonads from wheat rhizosphere against wheat common root and crown rot caused by *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker**

Zhila Delkhah<sup>1</sup>, Keivan Behboudi<sup>2</sup>, Reza Maali-Amiri<sup>3</sup>

1., 2. Ph.D. Student, Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran.

3. Professor, Department of Agronomy & Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran

Corresponding author: Keivan Behboudi, behbodi@ut.ac.ir

Received: Jun., 21, 2023

10(1) 83–106

Accepted: Jul., 02, 2023

---

**Abstract**

Fluorescent pseudomonads control plant pathogens by producing siderophore and inhibitory metabolites, and increase plant growth by producing plant hormones, some enzymes and mineral elements solubilization. In this study, 10 isolates of fluorescent pseudomonads from wheat rhizosphere cv. Zagros and Chamran (Dezful) and cv. Kohdasht and Zagros (Parsabad) in early April 2016 and early June 2017 were isolated by cultivation and purification on King B medium and also based on the production of green and yellow fluorescence pigment under UV light at 365 nm. These isolates were evaluated in terms of some metabolic characteristics such as inorganic phosphate solubilization, production of IAA, siderophore, ACC deaminase, hydrogen cyanide and protease, as well as control of wheat common root and crown rot disease caused by *B. sorokiniana* and increase in length and biomass of wheat shoots and roots in a randomized complete design (RCD) with three replications for each treatment. The UTP105 isolate showed the highest inhibition rate of pathogen growth with 62.5% and 70% in dualculture and production of volatile metabolites tests, respectively. In the greenhouse, the severity of disease was estimated at 85.3%, and UTP104 and UTP105 isolates showed the highest rate of disease reduction with 64.5% and 62.3%, respectively. Also, UTP105 and UTP104 were the most effective in increasing the wheat root and shoot growth parameters, respectively. These isolates are efficient for use in agriculture due to having favorable metabolic characteristics, disease control and plant growth enhancement.

**Keywords:** ACC deaminase, IAA, phosphate solubilization, siderophore, wheat, biocontrol

---