

جداسازی و شناسایی مولکولی جدایه‌های محرک رشد گیاهی جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas*

رقیه زارع^۱، مهروز دزفولیان^۱، زهرا امینی^۲، ابراهیم کریمی^۲، اکرم صادقی^{۳*}، راضیه رحمتی^۳

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲. بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

۳. گروه فیزیولوژی گیاهی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۲/۲۱)

Isolation and molecular identification of isolates of plant growth promoting *Pseudomonas* and *Bacillus*

Roghayeh Zare¹, Mehrooz Dezfulian¹, Zahra Amini², Ebrahim Karimi², Akram Sadeghi^{3*}, Razieh Rahmati³

1. Department of Microbiology, College of basic sciences, Karaj branch, Islamic Azad university, Karaj, Alborz, Iran

2. Department of Microbial Biotechnology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3. Department of Biology, Payame Noor University, Tehran, Iran

(Received: Sep. 11, 2018 - Accepted: Mar. 11, 2019)

Abstract

The use of the synergistic effect of nitrogen-fixing bacteria and phosphate solubilizing bacteria is one of the newest biofertilizer production strategies. Rhizosphere soil samples were collected from tomato, cucumber and bell pepper commercial greenhouses and screened for *Pseudomonas* and *Bacillus* using selective media. One hundred and eight *Pseudomonas* and 92 *Bacillus* isolates with PGP activities were isolated and characterized. Fifty-three percent of *Pseudomonas* isolates and 25% of *Bacillus* were able to grow on N free medium. Ninety-six percent of *Pseudomonas* isolates were able to solubilize organic phosphate and 70% of them produce IAA, while none of the *Bacillus* had these two abilities. About 30% of *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates produces siderophore, although the ratio of orange halo diameter/colony diameter was greater for *Pseudomonas*. Only five *Bacillus* and 31 *Pseudomonas* isolates inhibited the growth of *Phytophthora melonis*. Based on these results, although PGP isolates of both genera were found in the rhizosphere soil of commercial greenhouses, these bacteria differed in PGP traits. A *Pseudomonas* isolate, P3-57 and a *Bacillus* isolate, C1BY-1 with 50% antagonistic activity against *P. melonis* which differed in PGP traits selected for future study in greenhouse conditions. Phylogenetic analyses of 16S rRNA gene sequence revealed that strains P3-57 and C1BY-1 are closely related to *P. putida* and *B. subtilis* respectively.

Keywords: Bell pepper, cucumber, phytopathogen, rhizobacteria, tomato

چکیده

استفاده از تأثیر سینرژیستیک باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و باکتری‌های محلول کننده فسفات از جدیدترین استراتژی‌های تولید کود زیستی است. نمونه‌های خاک رایزوسفری از گلخانه‌های تجاری خیار، گوجه‌فرنگی و فلفل دلمه‌ای واقع در استان‌های کرمان، یزد و اصفهان جمع‌آوری و با استفاده از محیط کشت‌های انتخابی برای *Pseudomonas* و *Bacillus* غربال شد. تعداد ۱۰۸ جدایه *Pseudomonas* و ۹۲ جدایه *Bacillus* با صفات PGP جداسازی و شناسایی شد. پنجاه و سه درصد از جدایه‌های *Pseudomonas* و ۲۵٪ از جدایه‌های *Bacillus* قادر به رشد بر روی محیط بدون نیتروژن بودند. نود و شش درصد از جدایه‌های *Pseudomonas* قادر به انحلال فسفات معدنی بودند و ۷۰٪ از آن‌ها اکسین تولید کردند در حالیکه هیچ یک از جدایه‌های *Bacillus* واجد این صفات نبودند. سی درصد از جدایه‌های هر دو جنس سیدروفور تولید کردند هر چند نسبت قطر هاله به کلنی جدایه‌های *Pseudomonas* بزرگ‌تر بود. تنها ۵٪ از جدایه‌های *Bacillus* و ۳۱٪ از جدایه‌های *Pseudomonas* از رشد بیمارگر *Phytophthora melonis* ممانعت کردند. بر اساس این نتایج، اگرچه جدایه‌های PGP از هر دو جنس در خاک رایزوسفری گلخانه‌های تجاری یافت شد اما این باکتری‌ها در صفات محرک رشدی متفاوت بودند. یک جدایه *Pseudomonas* بنام P3-57 و یک جدایه *Bacillus* به نام C1BY-1 با توان ممانعت از رشد بیمارگر به میزان ۵۰٪ که از نظر صفات محرک رشدی تفاوت داشتند برای مطالعه در شرایط گلخانه انتخاب شدند. بررسی تبارشناسی توالی ژن 16S rRNA نشان داد که سویه P3-57 و C1BY-1 به ترتیب شباهت زیادی با *P. putida* و *B. subtilis* دارند.

واژه‌های کلیدی: بیمارگر گیاهی، خیار، رایزوباکتری، فلفل دلمه‌ای، گوجه‌فرنگی.

مقدمه

مصرف بیش از اندازه کودها و سموم شیمیایی موجب خسارت‌های جبران ناپذیری در زمینه سلامت انسان، منابع آبی و محیط زیست شده است (Luet *et al.*, 2015). کاهش منابع آب در جهان بویژه کشور ایران توجه به سمت کشت گلخانه‌ای صیفی‌جات را افزایش داده است. استفاده از مقادیر بالای کود آلی و شیمیایی در گلخانه‌ها موجب افزایش بی‌رویه رشد رویشی بوته بدون افزایش عملکرد می‌شود که هزینه هرس مکرر را به هزینه‌های تولید اضافه می‌کند. علاوه بر آن مواد معدنی و ازت تجمع یافته در میوه، کیفیت و طعم آن را تحت تأثیر قرار داده و بازارپسندی آن را کم می‌کند (Malboubi & Habibpour Mehraban, 2018). مطالعات زیادی در زمینه کاهش مصرف کودهای شیمیایی و جایگزین کردن آن‌ها با انواع کودهای آلی و زیستی انجام شده است. کودهای زیستی حاوی تعداد کافی از یک یا چند گونه از باکتری‌های سودمند خاکزی هستند. این باکتری‌ها به طور طبیعی در خاک‌های کشاورزی وجود دارند اما به دلیل تنش‌های محیطی بلند مدت، استفاده بی‌رویه از عوامل شیمیایی و عدم حضور گیاه میزبان مناسب به مدت طولانی جمعیت آن‌ها کم می‌شود. اضافه کردن این باکتری‌ها به خاک، قبل و یا در طول کشت، موجب افزایش رشد و تولید محصولات کشاورزی می‌شود (Etesami & Maheshwari, 2018). ریزوسفر ناحیه‌ای از خاک است که تحت تأثیر ترشحات ریشه‌های گیاهی قرار می‌گیرد. باکتری‌ها برای اشغال این جایگاه اکولوژیکی غنی و استفاده از ترشحات ریشه‌ای به عنوان منبع کربن و انرژی رقابت دارند. ریزوسفر زیستگاه مناسبی برای تکثیر باکتری‌هایی است که باعث حفظ سلامت گیاه و حاصلخیزی خاک می‌شوند. این باکتری‌ها را به اختصار PGPR می‌نامند (Mhlongo *et al.*, 2018). از میان

PGPRهای شناخته‌شده، جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* بیشترین مطالعات را به خود اختصاص داده‌اند. هورمون گیاهی اکسین (IAA) موجب افزایش رشد و گسترش ریشه گیاهان می‌شود. تعدادی از استرین‌های باکتریایی خاکزی بواسطه سنتز اکسین، به صورت مستقیم فیزیولوژی گیاه را تنظیم کرده و طول و حجم ریشه را افزایش می‌دهند (Ahmed & Hasnain, 2014). برخی از این استرین‌ها قادرند نیتروژن و مواد معدنی مانند آهن، فسفات و پتاسیم در دسترس خاک را نیز افزایش داده و از این طریق باعث افزایش رشد و سلامت گیاه شوند (Lugtenberg & Kamilova, 2009). از آنجا که ریزوسفر خط مقدم دفاعی در برابر حمله بیمارگرها به ریشه است، باکتری‌های مستقر در این ناحیه چنانچه رشد عوامل بیمارگر را کنترل کنند موجب کاهش بیماری و افزایش سلامت گیاه می‌شوند. تأثیر برخی گونه‌های جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* در افزایش رشد و کنترل بسیاری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه اغلب گیاهان زراعی به اثبات رسیده است (Sivasakthi *et al.*, 2014). آلودگی گلخانه‌های خیار کشور به بیمارگر *Phytophthora melonis* Katsura در سال‌های اخیر گزارش شده است (Mostowfizadeh- Ghalamfarsa & Banihashemi, 2015). این بیمارگر موجب مرگ گیاهچه شده و خسارت زیادی به گلخانه‌های آلوده وارد می‌کند. استفاده از سموم شیمیایی به طور مکرر و در مقادیر بالاتر از حد مجاز به عنوان پیشگیری از شیوع این بیمارگر و سایر بیمارگرها رواج دارد (Shirzad *et al.*, 2012; Hatami *et al.*, 2013). این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های محرک رشد خیار از دو جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* با توانایی کنترل *P. melonis* از گلخانه‌های تجاری سه محصول صیفی و سبزی که بیشترین سطح کشت را

دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Huang et al., 2015).

در کشور به خود اختصاص داده شامل خیار، گوجه‌فرنگی و فلفل دلمه‌ای انجام شد.

آزمون تثبیت نیتروژن

جهت جداسازی باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن ۱۵ میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری با روش لکه‌گذاری روی محیط کشت انتخابی بدون نیتروژن وینوگرادسکی (0.2 g KH₂PO₄, 10.0 g glucose, 5.0 g CaCO₃, MgSO₄ 7H₂O and NaCl (pH7.0, 15 g agar, 0.1 g CaSO₄·2H₂O) کشت شد. پلیت‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Xu & Zheng, 1986). رشد و عدم رشد در مقایسه با محیط NA بررسی و ثبت شد. این آزمایش در سه تکرار و هر تکرار شامل یک پلیت انجام شد.

آزمون تولید هورمون اکسین

باکتری به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت NB حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان کشت شد. پنجاه میکرولیتر سوسپانسیون باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل شد. بعد از ۷۲ ساعت سوسپانسیون باکتری در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با ۲ میلی‌لیتر معرف سالکوسکی^۲ (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر FeCl₃·6H₂O نیم مولار) مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور آن در ۵۳۵ نانومتر قرائت شد (Bent et al., 2001). مقادیر تولید اکسین هر جدایه از فرمول $Y=48.64X+2.74(2-3)$ با توجه به منحنی استاندارد بر اساس غلظت‌های مختلف اکسین محاسبه شد. این آزمون دو بار تکرار شد. جذب هر نمونه سه بار توسط دستگاه خوانش شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری باکتری

نمونه‌برداری از خاک اطراف ریشه بوته‌های شاداب و پر محصول ۷ واحد گلخانه تجاری گوجه‌فرنگی، ۱۰ واحد گلخانه خیار و ۶ واحد گلخانه فلفل دلمه‌ای رنگی از سه استان کرمان، اصفهان و یزد انجام شد. مجموعاً ۲۹ نمونه خاک تهیه و در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شد. برای جداسازی باکتری‌های *P. fluorescens* مقدار ۱۰ گرم از خاک ریزوسفری همراه با قطعات ریشه به ظرف ارلن مایر حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (۰/۹٪ NaCl) استریل منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه (همراه با همزدن روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه) مخلوط شد. از این سوسپانسیون سریال رقت‌های ۱۰^{-۳}، ۱۰^{-۴} و ۱۰^{-۵} تهیه و بر روی محیط کشت اختصاصی PIA باکتری‌های پخش شد. عملیات خالص‌سازی *P. fluorescens* با استفاده از محیط کشت King B انجام شد. باکتری‌های رشد یافته بر اساس پرتو افشانی زیر لامپ UV انتخاب و جدایه‌هایی که خاصیت فلورسنت نداشتند حذف شدند (Keshavarz-Tohid et al., 2017). برای جداسازی *Bacillus*، سوسپانسیون تهیه‌شده از خاک قبل از تهیه سریال رقت به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن سری رقت‌های مختلف از سوسپانسیون خاک تهیه و بر روی محیط کشت NA (نوترینت آگار) برده شد. تست KOH و رنگ‌آمیزی اسپور برای جداسازی *Bacillus* گرم مثبت دارای اسپور استفاده شد. جدایه‌های منتخب پس از رشد ۲۴ ساعته در محیط NA، به مدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت در محیط غذایی مایع LB کشت شد. کشت باکتری به نسبت حجمی مساوی با گلیسرین ۷۰٪ استریل مخلوط و در درون میکروتیوب‌های استریل داخل فریزر در

روز در در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از هر جدایه بیمارگر یک بلوک نیز بر روی محیط بدون کشت باکتری در همان شرایط قرار داده شد و به عنوان شاهد جهت مقایسه اثر بازدارندگی باکتری استفاده شد. میزان بازدارندگی به صورت تفاضل شعاع رشد بیمارگر در پلیت شاهد (از مرکز به طرف کناره پلیت) از شعاع رشد بیمارگر در پلیت‌های حاوی باکتری و بیمارگر انجام شد (Sadeghi *et al.*, 2017). این آزمایش در سه تکرار و هر تکرار شامل یک پلیت انجام شد.

استخراج ماده وراثتی (DNA)

برای جداسازی DNA دوپست و پنجاه میکرولیتر سوسپانسیون باکتری در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۴۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲۵ میلی‌مولار EDTA، ۱ درصد SDS و ۱۰ $\mu\text{g/ml}$ پروتئیناز K) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۴۰۰ میکرولیتر آمونیوم استات ۷/۵ مولار به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۲ تا ۳ دقیقه تکان داده شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ سانتریفیوژ شد و ۷۵۰ میکرولیتر از رانشین به لوله جدید منتقل شد. حجم برابر ایزوپروپانول سرد به نمونه اضافه و تکان داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۵۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و رسوب حاصل با ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ شسته و سپس خشک شد. رسوب حاصل در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد (Tripathi & Rawal, 1998).

تکثیر ژن 16S rRNA

آغازگرهای (PAF) 5'- (AGAGTTTGATCCTGGCTCAGA-3' و

آزمون تولید سیدروفور

پانزده میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری با روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط جامد Chrome azurol S (CAS-Agar) کشت شد (Andrews & Duckworth, 2016). پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تولید سیدروفور باعث جدا شدن آهن از CAS می‌شود که نتیجه آن تولید یک هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتری است. قطر این هاله پس از سه روز ثبت و نسبت قطر هاله به قطر کلنی محاسبه شد. این آزمایش در سه تکرار و هر تکرار شامل یک پلیت انجام شد.

آزمون انحلال فسفات

پانزده میکرولیتر سوسپانسیون تازه باکتری با روش لکه‌گذاری روی پلیت‌های حاوی محیط جامد Pikovskayas (PKV) شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم تری‌کلسیم‌فسفات، ۰/۵ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۲ گرم NaCl، ۰/۲ گرم KCl، ۰/۱ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۵ گرم $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۵ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ و ۰/۵ گرم عصاره مخمر در یک لیتر آب مقطر است کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از آن نسبت قطر هاله به قطر کلنی محاسبه شد (Rashid *et al.*, 2004). این آزمایش در سه تکرار و هر تکرار شامل یک پلیت انجام شد.

آزمون آنتاگونیستی

جدایه‌های باکتریایی به صورت یک نوار باریک در یک طرف پلیت حاوی محیط PDA کشت شدند. به طور همزمان یک بلوک از بیمارگر گیاهی، *P. melonis* (تهیه شده از بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور) در وسط هر پلیت حاوی باکتری قرار داده شد. پلیت‌ها بمدت ۷

نتایج و بحث

جداسازی، شناسایی و ارزیابی *Pseudomonas* و *Bacillus*

در مجموع تعداد ۲۰۰ جدایه باکتریایی از دو جنس *Bacillus* (۹۲) و *Pseudomonas* (۱۰۸) گلخانه‌های مورد مطالعه در سه استان یزد، اصفهان و کرمان جداسازی شد (جدول ۱). با توجه به این که تعداد گلخانه‌های خیار بررسی شده بیشتر از دو محصول دیگر بود، بیشترین تعداد جدایه‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* از ریزوسفر خیار جداسازی شد.

جدول ۱. تعداد *Bacillus* و *Pseudomonas* جدا شده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی، فلفل دلمه‌ای و خیار در گلخانه‌های یزد، اصفهان و کرمان

| باکتری (تعداد کلنی) | | | | | | استان / محصول |
|---------------------|------|------|-----------------|------|------|---------------|
| <i>Pseudomonas</i> | | | <i>Bacillus</i> | | | |
| خیار | فلفل | گوجه | خیار | فلفل | گوجه | |
| ۲۵ | ۶ | ۶ | ۲۰ | ۶ | ۱۰ | یزد |
| ۲۰ | ۲۱ | ۱ | ۱۶ | ۱۰ | ۴ | اصفهان |
| ۱۱ | ۸ | ۱۰ | ۱۰ | ۱۱ | ۵ | کرمان |

تثبیت نیتروژن

پنجاه و سه درصد از مجموع جدایه‌های *Pseudomonas* و ۲۵ درصد از مجموع جدایه‌های *Bacillus* توانایی رشد بر روی محیط بدون ازت را داشتند. در شکل ۱ نسبت جدایه‌های دارای این قابلیت به مجموع جدایه‌ها و در شکل ۲ این نسبت به تفکیک میزبان نشان داده شده است. تعداد ۵۷ جدایه از مجموع *Pseudomonas* و همچنین ۲۳ جدایه از مجموع جدایه‌های *Bacillus* جدا شده از خیار توانایی تثبیت ازت را داشتند.

تولید هورمون اکسین

تولید هورمون اکسین در جدایه‌های *Pseudomonas* جدا شده از میزبان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. در کل ۷۰ درصد از

PAR) 5'-

(AAGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3'

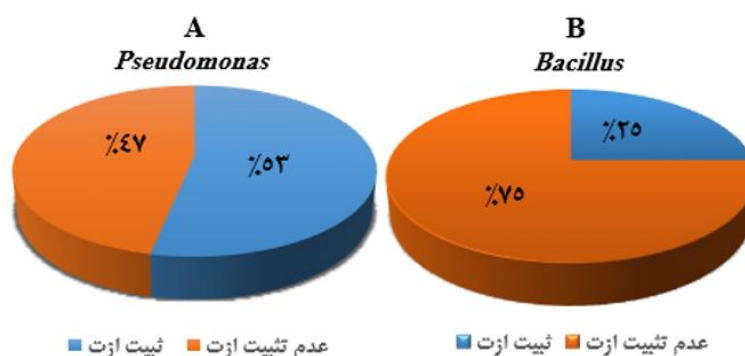
برای تکثیر ژن 16S rRNA از روی ماده وراثتی باکتری استفاده شد (Blanco et al., 2002). برای انجام واکنش PCR از مخلوط Master mix آماده با نام تجاری Amplicon در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت Bio-Rad با شرایط دمایی: ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طولیل شدن در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. قطعه تکثیر شده مورد نظر به طول ۱۵۰۰ bp از روی ژل آگاروز جدا و برای توالی‌یابی ارسال شد.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی و رسم تبارنما

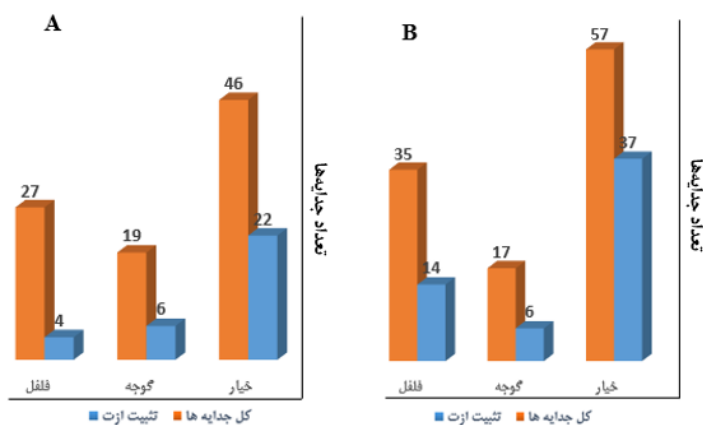
توالی حاصل پس از بررسی توسط نرم‌افزار DNASTAR جهت تعیین درصد همولوژی اولیه با سایر توالی‌های موجود در بانک داده NCBI استفاده شد. در نهایت برای تعیین میزان همولوژی توالی ژنومی 16S rRNA جدایه‌ها با سایر باکتری‌ها بر اساس میزان تشابه جفت باز از بانک داده (EzBioCloud) (<https://www.ezbiocloud.net>) استفاده شد. پس از هم‌ترازی توالی‌ها با استفاده از الگوریتم CLUSTAL W از نرم افزار MEGA5 (روش Neighbor-joining) جهت رسم درخت فیلوژنی استفاده شد. بررسی بوت استراپ (Bootstrap) جهت ارزیابی پایداری ضرایب هم بستگی بر پایه ۱۰۰۰ بار نمونه گیری تصادفی انجام شد (Tamura et al., 2011). از باکتری‌هایی از رده‌های دور به عنوان نمونه غیر خویشاوند استفاده شد.

C4-15 (جدا شده از رایزوسفر خیار) با تولید ۵۷/۶ میلی گرم در لیتر بیشترین و جدایه T3-66 با تولید ۱/۵ میلی گرم در لیتر کمترین میزان تولید هورمون اکسین را داشت. لازم به ذکر است میزان تولید اکسین جدایه های *Bacillus* در مقایسه با جدایه های *Pseudomonas* بسیار کمتر و بین صفر تا ۰/۵ میلی گرم در لیتر بود.

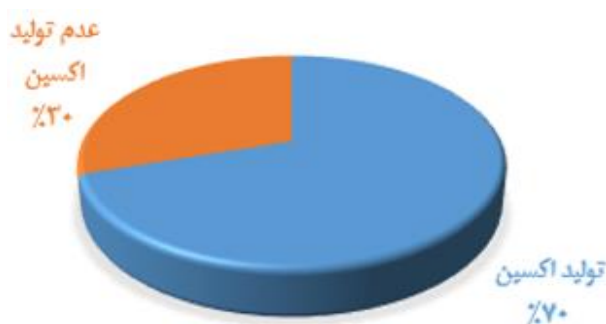
جدایه های *Pseudomonas* قابلیت تولید هورمون اکسین را داشتند (شکل ۳). تعداد ۴۶ جدایه از رایزوسفر خیار، ۲۵ جدایه از رایزوسفر فلفل و ۷ جدایه از رایزوسفر گوجه فرنگی توانایی تولید هورمون اکسین را داشتند. بیشترین درصد جدایه های با قابلیت تولید هورمون اکسین از میزبان خیار جداسازی شد. از بین جدایه های با قابلیت تولید هورمون اکسین، جدایه ی



شکل ۱. نسبت جدایه های باکتری با توانایی رشد بر روی محیط فاقد نیتروژن به تفکیک جنس باکتری



شکل ۲. تعداد جدایه های تثبیت کننده نیتروژن به تفکیک گیاه میزبان. (A) *Bacillus*, (B) *Pseudomonas*



شکل ۳. درصد جدایه های *Pseudomonas* با توانایی تولید هورمون اکسین

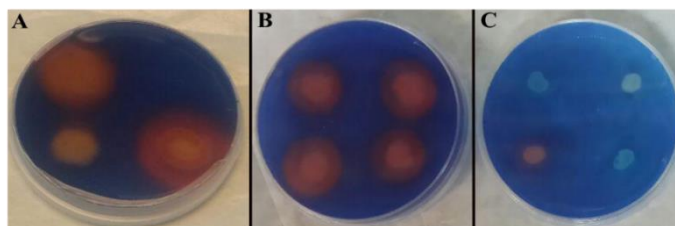
بیشترین تولید سیدروفور مربوط جدایه C5-14 از *Pseudomonas* با نسبت قطر هاله به کلنی ۲/۵ بر روی محیط CAS-Agar بود. این جدایه از ریزوسفر خیار جدا شده است.

انحلال فسفات

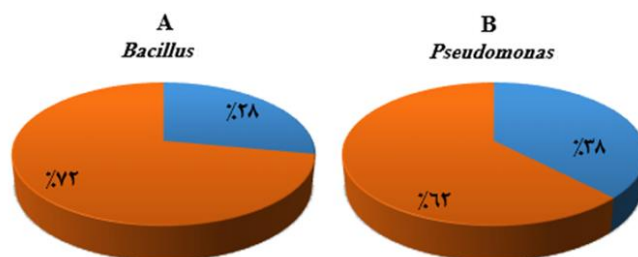
بر اساس نتایج به دست آمده هیچ یک از جدایه‌های *Bacillus* و ۹۶ درصد از جدایه‌های *Pseudomonas* توانایی تولید هاله و انحلال فسفات را داشتند (شکل ۷). اکثر جدایه‌های *Pseudomonas* جدا شده از ریزوسفر میزبان‌های مختلف توانایی انحلال فسفات را داشتند (شکل ۸).

تولید سیدروفور

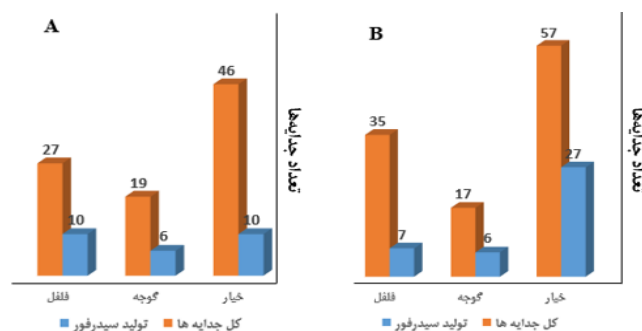
در مجموع ۶۶ جدایه *Bacillus* و *Pseudomonas* بر روی محیط CAS-Agar تولید هاله‌ی نارنجی رنگ کردند (شکل ۴)، که حاکی از تولید سیدروفور بود. بر این اساس بقیه جدایه‌ها قابلیت تولید سیدروفور را نداشتند. بیست و هشت درصد از جدایه‌های *Bacillus* و ۳۸ درصد از جدایه‌های *Pseudomonas* توانایی تولید سیدروفور را داشتند (شکل ۵). تعداد ۲۷ جدایه (۴۷٪) از مجموع جدایه‌های *Pseudomonas* و ۱۰ جدایه (۳۹٪) از مجموع جدایه‌های *Bacillus* به دست آمده از ریزوسفر خیار سیدروفور تولید کردند (شکل ۶).



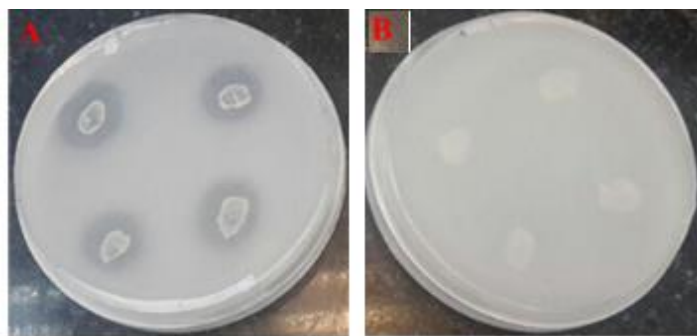
شکل ۴. ارزیابی تولید سیدروفور توسط باکتری. A و B) تشکیل و C) عدم تشکیل هاله نارنجی رنگ بر روی محیط CAS-Agar در اطراف کلنی باکتری.



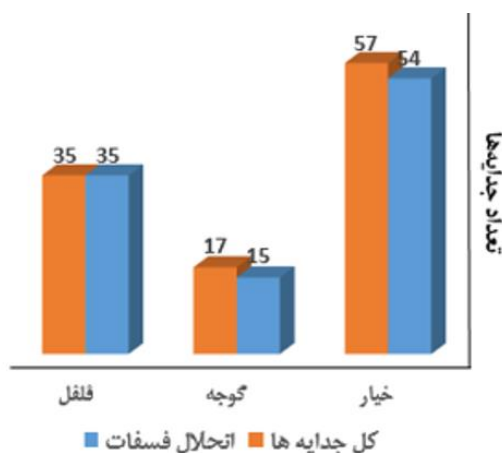
شکل ۵. نسبت جدایه‌های باکتری تولیدکننده سیدروفور به تفکیک جنس باکتری



شکل ۶. تعداد جدایه‌های *Bacillus* (A) و *Pseudomonas* (B) تولیدکننده سیدروفور به تفکیک گیاه میزبان



شکل ۷. ارزیابی انحلال فسفات معدنی توسط باکتری. (A) تشکیل هاله و (B) عدم تشکیل هاله در اطراف کلنی باکتری



شکل ۸. تعداد *Pseudomonas* با قابلیت انحلال فسفات به تفکیک گیاه میزبان

Bacillus از رایزوسفر گوجه و خیار یزد به دست آمده بودند. جدایه P3-57 از جنس *Pseudomonas* و جدایه C1BY-1 از جنس *Bacillus* به ترتیب با ۵۵ و ۵۰ درصد دارای بیشترین اثر بازدارندگی بودند که هر دو از رایزوسفر خیار جدا شده بودند (شکل ۹).

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

محصول حاصل از تکثیر ناحیه 16S rRNA بر روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی شد. یک قطعه DNA تکثیر شده به طول ۱۵۰۰ جفت باز (برای همه جدایه‌ها) مشاهده شد (شکل ۱۰). ترسیم تبارنما (درخت فیلوژنتیکی) با استفاده از توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و توالی‌های اخذ شده از بانک ژن انجام شد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی ناحیه 16S rRNA

اثر آنتاگونیستی باکتری‌های جدا شده روی عامل بیماریارگر *P. melonis*

باکتری‌هایی که قادر به رشد بر روی محیط بدون ازت بودند از نظر توانایی کنترل عامل بیماریارگر بررسی شدند. نتایج نشان داد تعدادی از جدایه‌های هر دو جنس دارای اثر بازدارندگی روی این عامل بیماریارگر بودند. تنها پنج جدایه از ۲۳ جدایه *Bacillus* بررسی شده رشد بیماریارگر را به میزان ۱۶-۵۰ کنترل کردند. تعداد ۵۷ جدایه از جنس *Pseudomonas* برای این صفت بررسی شد که از این تعداد ۳۱ جدایه به میزان ۱۰-۵۵ درصد توان مهارگری داشتند. جدایه‌های مهارگر *Pseudomonas* مربوط به رایزوسفر خیار گلخانه‌های دو استان یزد و اصفهان و فلفل اصفهان بودند در حالیکه جدایه‌های به دست آمده از رایزوسفر گوجه‌فرنگی این توانایی را نداشتند. پنج جدایه جنس

از خاک رایزوسفری صیفی‌جات گلخانه‌ای به دست آمد. این صفات شامل تثبیت نیتروژن، حلالیت فسفات معدنی، تولید سیدروفور، تولید هورمون اکسین و کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی است که به عنوان پتانسیلی مفید برای تحریک افزایش رشد گیاه و افزایش محصول زراعی بارها گزارش شده است (Mohamed et al., 2019; Majeed et al., 2019; Liu et al., 2018). حضور این باکتری‌ها در خاک گلخانه‌های تجاری کشور نشان می‌دهد با وجود نگرانی‌های زیادی که در رابطه با مصرف بیش از مقادیر استاندارد سموم شیمیایی در فضاهای گلخانه‌ای وجود دارد، باکتری‌های محرک رشد از دو جنس مورد مطالعه با این شرایط تطابق یافته و در فضاهای رایزوسفری وجود دارند. باکتری‌های بومی جزو ذخایر ژنتیکی ارزشمند هر کشور هستند که طی قرن‌ها تکامل با سایر میکروارگانیسم‌های خاک و گیاهان میزبان به همزیستی رسیده‌اند. حفظ و نگهداری این باکتری‌ها به صورت کلکسیون در بانک‌های میکروبی کشور و امکان دستیابی سایر پژوهشگران به آن‌ها تحقیقات بیشتر در این زمینه را آسان‌تر خواهد کرد. دویست جدایه به دست آمده در این مطالعه برای استفاده در برنامه‌های تولید کود و سموم زیستی در بانک میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران در شرایط مطلوب نگهداری می‌شوند. رایزوباکترهای افزایش‌دهنده رشد گیاه به علت توانایی تثبیت بیولوژیکی (زیستی) نیتروژن به عنوان یک روش سالم برای کاهش کودهای شیمیایی حاوی نیتروژن پیشنهاد می‌شوند (Bhat et al., 2015).

برای جدایه P3-57 از جنس *Pseudomonas* و جدایه C1BY-1 از جنس *Bacillus* رسم شد (شکل‌های ۱۱ و ۱۲). بر اساس درخت رسم شده جدایه P3-57 که از یک گلخانه در اصفهان و از رایزوسفر خیار جدا شده بود بیشترین شباهت را (۹۹٪) با *Pseudomonas putida* داشت. جدایه C1BY-1 نیز که از رایزوسفر خیار کشت شده در گلخانه تجاری واقع در یزد به دست آمده بود بیشترین شباهت را (۹۹٪) با *Bacillus subtilis* داشت. جدایه P3-57 با شماره MK503664 و جدایه C1BY-1 با شماره MK503666 در بانک اطلاعاتی NCBI ثبت شده‌اند. مشخصات کلی این دو سویه در جدول ۲ آورده شده است. این دو باکتری برای بررسی تأثیر بر رشد و عملکرد و همچنین توانایی بیوکنترل مرگ گیاهچه خیار در مطالعات گلخانه‌ای استفاده خواهد شد.

اگرچه سموم شیمیایی از خسارت آفات و بیماری‌ها جلوگیری می‌کنند اما اثرات آن‌ها بر روی میکروارگانیسم‌های مفید خاک را نمی‌توان نادیده گرفت. این اثرات متنوع و غیر قابل پیش‌بینی است. گزارش شده که در خاک آلوده با حشره‌کش *Methylparathion* دو باکتری *Pseudomonas stutzeri* و *Pseudomonas putida* جمعیت غالب باکتری‌های خاک را تشکیل می‌دهند (Lo, 2010). در حالی که سموم علف‌کش رشد سویه‌های *Pseudomonas* جدا شده از خاک کشاورزی را کاهش می‌دهند (Boldt & Jacobsen, 1998). در این مطالعه تعداد قابل توجهی باکتری از دو جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* که واجد صفات شاخص معرفی شده برای تحریک رشد گیاهان بودند

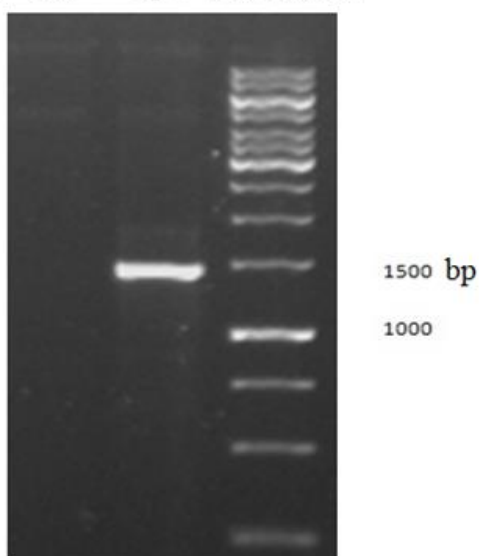
جدول ۲. مشخصات دو جدایه منتخب

| جدایه | بیشترین شباهت | میزبان | استان | تثبیت ازت | تولید سیدروفور | انحلال فسفات | تولید اکسین (mg/L) | ممانعت از رشد <i>P. melonis</i> (%) |
|--------|--------------------|--------|--------|-----------|----------------|--------------|--------------------|-------------------------------------|
| C1BY-1 | <i>B. subtilis</i> | خیار | یزد | + | - | - | - | ۵۰ |
| P3-57 | <i>P. putida</i> | فلفل | اصفهان | - | - | ۱ | ۸ | ۵۵ |

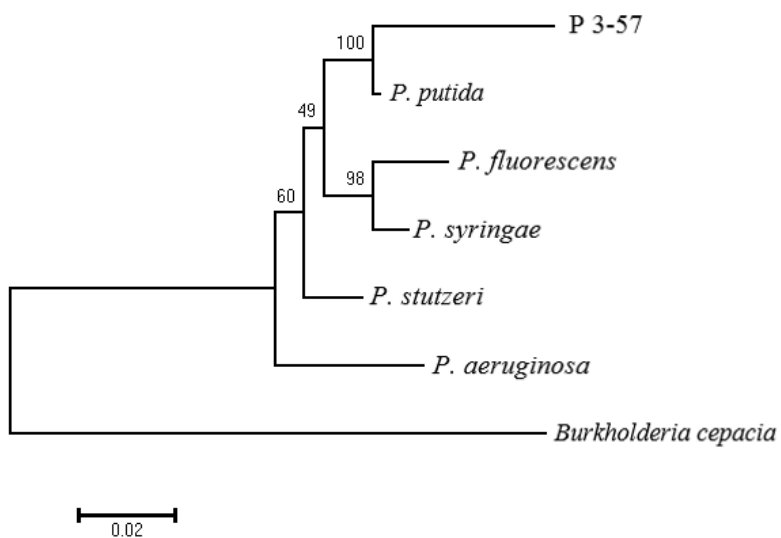


شکل ۹. ممانعت از رشد میسلیمی *P. melonis* توسط *P. putida* P3-57

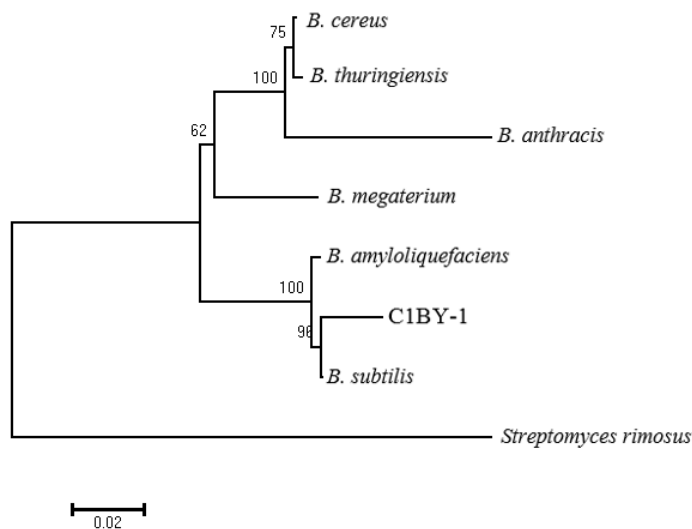
کنترل منفی نمونه 1kb ladder



شکل ۱۰. قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی حاصل از واکنش زنجیره ای پلیمرز ژن 16S rRNA بر روی ژل آگارز ۱٪



شکل ۱۱. درخت خویشاوندی *P. putida* P3-57



شکل ۱۲. درخت خویشاوندی *B. subtilis* C1BY-1

(Bargaz *et al.*, 2018). بنابراین در این مطالعه انتخاب باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و باکتری‌های محلول کننده فسفات و یا باکتری‌هایی که هر دو صفت را در کنار سایر صفات محرک رشدی داشتند در نظر گرفته شدند. براساس نتایج به دست آمده اکثر (۹۶ درصد) جدایه‌های *Pseudomonas* توانایی تولید هاله شفاف در محیط پیکوسکایا و انحلال فسفات را داشتند. در حالی که هیچ‌یک از جدایه‌های *Bacillus* این توانایی را نداشتند. لازم به ذکر است که جدایه‌های *Bacillus* بررسی شده در این مطالعه از استان‌ها و محصولات مختلف به دست آمده بودند. حذف یک گروه عملکردی از باکتری‌های خاک پدیده‌ای است که در دراز مدت موجب ضعف بیولوژیکی خاک می‌شود. استفاده از انواع سموم و کودهای شیمیایی و یا عدم رعایت تناوب کشت ممکن است علت حذف گروه‌های خاصی از *Bacillus* که این توانایی را دارند باشد. در آزمایشی که بر روی *P. putida* انجام شد مشخص شد سموم قارچ کش Tebuconazole، Hexaconazole، Metalaxyl و Kitazin در غلظت‌های بیش از مقادیر توصیه شده تأثیر معنی‌داری

در این مطالعه تمامی جدایه‌ها ابتدا از نظر توانایی رشد بر روی محیط فاقد نیتروژن مورد آزمایش قرار گرفتند. ۵۳ درصد از مجموع جدایه‌های *Pseudomonas* و ۲۵ درصد از مجموع جدایه‌های *Bacillus* توانایی رشد بر روی محیط بدون نیتروژن را داشتند. برای تولید کودهای زیستی تأمین کننده نیتروژن، از توباکتر همواره نقش اول را در میان باکتری‌های غیر همزیست تثبیت کننده نیتروژن داشته است. تأثیر مثبت این باکتری‌ها اغلب روی گندم که به مقادیر بالای نیتروژن نیاز دارد گزارش شده است (Bageshwar *et al.*, 2017). در مقابل، استفاده از از توباکترها برای افزایش رشد صیفی‌جات کمتر گزارش شده است. علت آن ممکن است ضعف این باکتری‌ها در سایر صفات محرک رشدی مانند عدم انحلال فسفات معدنی باشد. به عنوان مثال از ۳۱ جدایه از توباکتر به دست آمده از خاک‌های زراعی و غیر زراعی هیچ‌یک قادر به انحلال فسفات معدنی نبود (Rubio *et al.*, 2013). استفاده از تأثیر سینرژیستیک باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن و باکتری‌های محلول کننده فسفات از جدیدترین استراتژی‌های کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاهی است

انتقال فسفات به‌ویژه در شرایط کمبود فسفات نیز داشت. این سویه در مقایسه با سویه والد نه تنها رشد گیاه را در شرایط معمول افزایش داد بلکه موجب کاهش اثرات منفی تنش کمبود فسفات در گیاه نیز شد. بسیاری از جدایه‌های جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* توانایی تولید سیدروفورها که ترکیبات کلاته‌کننده آهن با میل ترکیبی بالا هستند را دارند (Tian et al., 2009). در این مطالعه ۲۸ درصد از جدایه‌های *Bacillus* و ۳۸ درصد از جدایه‌های *Pseudomonas* توانایی تولید سیدروفور را داشتند. بیشترین تولید سیدروفور مربوط به جدایه C5-14 از جنس *Pseudomonas* با نسبت قطر هاله به کلنی برابر با ۲/۵ بر روی محیط CAS-Agar بود. گونه‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زای *Pseudomonas* از این ترکیبات برای رقابت با سایر میکرو ارگانیسم‌ها و کلینزاسیون و استقرار خود بر روی بافت‌های میزبان‌های مختلف استفاده می‌کنند (Ringel & Brüser, 2018). رقابت بر سر جذب آهن موجود در محیط می‌تواند به حذف برخی از باکتری‌ها یا قارچ‌های منتهی شود. اگرچه ارتباط این مکانیسم شناخته‌شده با خصوصیات آنتاگونیستی باکتری‌ها بارها گزارش شده اما تأثیر سایر مکانیسم‌هایی که *Pseudomonas* از آن‌ها برای ممانعت از رشد سایر میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌کند نیز قابل توجه است. آنتی‌بیوتیک 2,4-DAPG (diacetylphloroglucinol) که توسط سویه‌های مختلف *P. fluorescens* تولید می‌شود قادر به کنترل انواع بیمارگرهای گیاهی است (Meyer et al., 2016). در این مطالعه برخی از باکتری‌های ممانعت‌کننده بیمارگر اوومیستی *P. melonis* تولید کننده سیدروفور بودند در حالی که برخی دیگر بدون تولید سیدروفور قادر به کنترل عامل بیمارگر بودند. دو سویه C8-29 و P3-53 از جنس *Pseudomonas*، هر دو به نسبتی برابر (۵۰٪) رشد *P. melonis* را کنترل کردند. سویه اول

بر کاهش توانایی انحلال فسفات توسط باکتری دارند (Ahemad & Khan, 2012). بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد بررسی سموم پرمصرف گلخانه‌ای از نظر تأثیر بر تنوع و جمعیت گروه‌های عملکردی میکروبی خاک یکی از ملاحظات است که قبل از ثبت و تأیید آن باید انجام شود.

هفتاد درصد از جدایه‌های *Pseudomonas* به‌دست‌آمده در این پژوهش قابلیت تولید هورمون اکسین را داشتند. از بین جدایه‌های با قابلیت تولید هورمون اکسین، ۱۱ جدایه مقادیری بیش از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تولید کردند که ۱۰ جدایه از رایزوسفر خیار و یک جدایه از رایزوسفر فلفل به‌دست‌آمده بود. جدایه C4-15 با تولید ۵۷/۶ میلی‌گرم در لیتر بیشترین میزان تولید هورمون اکسین را داشت. از رایزوسفر هر سه میزبان، جدایه‌های *Pseudomonas* تولید کننده اکسین به‌دست آمد. بیشترین تعداد جدایه تولید کننده اکسین از رایزوسفر خیار و کمترین تعداد متعلق به گوجه‌فرنگی بود. جدایه C4-15 که بیشترین مقدار اکسین را تولید کرد با یکی از بزرگترین هاله‌های شفاف اطراف کلنی (نسبت قطر هاله به کلنی برابر با ۲) از نظر انحلال فسفات معدنی نیز یکی از جدایه‌های برتر برای این صفت بود. همچنین ۱۰ جدایه برتر دیگر نیز دارای نسبت قطر هاله به کلنی بزرگتر یا برابر با ۱/۵ بودند. این نتایج و همچنین عدم انحلال فسفات معدنی و عدم تولید اکسین توسط جدایه‌های *Bacillus* این نظریه را تقویت می‌کند که بین این دو صفت محرک رشد گیاهی رابطه‌ای مثبت وجود دارد. این رابطه مثبت در نتایج سایر پژوهشگران نیز گزارش شده است (Bianco and Defez, 2010). مطالعه این پژوهشگران نشان داد سویه دستکاری ژنتیکی شده *Sinorhizobium meliloti* که مقادیر بیشتری اکسین نسبت به سویه والد تولید می‌کرد توانایی بیشتری برای انحلال و

روی سویه‌های *Pseudomonas* محرک رشد انجام شده پیروزی باکتری‌هایی با تعداد کمتری از صفات محرک رشدی در رقابت بر سر تصرف فضاهای نزدیک به ریشه ذرت را گزارش کرده است (Vacheron *et al.*, 2016). متأسفانه معمولاً باکتری‌هایی با تعداد کمتری از صفات محرک رشدی فاقد ارزش کافی شمرده شده و در تحقیقات کنار گذاشته می‌شوند. در این مطالعه کلیه باکتری‌ها بررسی شده برای مطالعات آینده در شرایط مطلوب نگهداری شده و هیچ یک از جدایه‌ها حذف نخواهند شد.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، جهت تأمین اعتبار مالی این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

قادر به تولید سیدروفور بود در حالیکه سویه دوم فاقد هاله نارنجی بر روی محیط CAS-Agar بود. این نتایج برای دو سویه آنتاگونیست از جنس *Bacillus* نیز مشاهده شد. سویه T1BY-36 که از نظر تولید سیدروفور مثبت ارزیابی شد و سویه C1BY-1 که برای این صفت منفی بود به ترتیب ۳۳٪ و ۵۰٪ از رشد بیمارگر ممانعت کردند. جدایه P3-57 از جنس *Pseudomonas* و جدایه C1BY-1 از جنس *Bacillus* به ترتیب بیشترین شباهت فیلوژنی را به *B. subtilis* و *P. putida* داشتند. خصوصیات بیوکنترلی و محرک رشدی این باکتری‌ها بر روی انواع گیاهان زراعی و سبزیجات گزارش شده است (Etesami & Maheshwari, 2018). این دو سویه اگرچه بالاترین میزان ممانعت از رشد عامل بیمارگر را نشان دادند اما واجد تمامی صفات محرک رشد گیاهی نیستند (جدول ۲). مطالعه‌ای که اخیراً بر

REFERENCES

- Ahemad M, Khan MS (2012) Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. *Chemosphere*. 86: 945-950.
- Ahmed A, Hasnain S (2014) Auxins as one of the factors of plant growth improvement by plant growth promoting rhizobacteria. *Pol. J. Microbiol.* 63: 261-266.
- Andrews MY, Duckworth O (2016) A universal assay for the detection of siderophore activity in natural waters. *Biometals*. 29: 1085-1095.
- Bageshwar UK, Srivastava M, Pardha-Saradh P, Paul S, Gothandapani S, Jaat RS, Shankar P, Yadav R, Biswas DR, Kumar PA, Padaria JC, Mandal PK, Annapurna K, Das HK (2017) An environment friendly engineered *Azotobacter* can replace substantial amount of urea fertilizer and yet sustain same wheat yield. *App. Environmental. Microbiol.* doi: 10.1128/AEM.00590-17
- Bargaz A, Lyamlouli K, Chtouki M, Zeroual Y, Dhiba D (2018) Soil microbial resources for improving fertilizers efficiency in an integrated plant nutrient management system. *Front. Microbiol.* doi: 10.3389/fmicb.2018.01606
- Bent E, Tuzun S, Chanway CP, Enebak S (2001) Alterations in plant growth and in root hormone levels of *lodgpole pines* inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 47:793-800.
- Bianco C, Defez R (2010) Improvement of phosphate solubilization and Medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. *App. Environmental. Microbiol.* 76: 4626-4632.

- Blanco MM, Gibello A, Vela AI, Moreno MA, Domínguez L, Fernandez-Garayzábal JF (2002) PCR detection and PFGE DNA macro restriction analyses of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Dis. Aquat. Org.* 50: 19-27.
- Boldt TS, Jacobsen CS (1998) Different toxic effects of the sulphonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. *FEMS. Microbiol. Lett.* 161: 29-35.
- Etesami H, Maheshwari DK (2018) Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156: 225-246.
- Hatami N, Aminae MM, Zohdi H, Tanideh T (2013) Damping-off disease in greenhouse cucumber in Iran. *Arch. Phytopathol. Plant. Protect.* 46: 796-802.
- Huang XF, Zhou D, Guo J, Manter DK, Reardon KF, Vivanco JM (2015) *Bacillus* spp. from rainforest soil promote plant growth under limited nitrogen conditions. *J. Appl. Microbiol.* 118: 672-684.
- Keshavarz-Tohid V, Taheri P, Muller D, Prigent-Combaret C, Vacheron J, Taghavi SM, Tarighi S, Moënné-Loccoz Y (2017) Phylogenetic diversity and antagonistic traits of root and rhizosphere pseudomonads of bean from Iran for controlling *Rhizoctonia solani*. *Res Microbiol.* 168: 760-772.
- Liu J, Tang L, Gao H, Zhang M, Guo C (2019) Enhancement of alfalfa yield and quality by plant growth-promoting rhizobacteria under saline-alkali conditions. *J. Sci. Food. Agric.* 99: 281-289.
- Lo CC (2010) Effect of pesticides on soil microbial community. *J. Environ. Sci. Health. B.* 45: 348-359.
- Lu Y, Song S, Wang R, Liu Z, Meng J, Sweetman AJ, Jenkins A, Ferrier RC, Li H, Luo W, Wang T (2015) Impacts of soil and water pollution on food safety and health risks in China. *Environ. Int.* 77: 5-15.
- Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 63: 541-556.
- Majeed A, Kaleem Abbasi M, Hameed S, Yasmin S, Hanif MK, Naqqash T, Imran A (2018) *Pseudomonas* sp. AF-54 containing multiple plant beneficial traits acts as growth enhancer of *Helianthus annuus* L. under reduced fertilizer input. *Microbiol. Res.* 216: 56-69.
- Malboubi MA, Habibpour Mehraban F (2018) Agricultural Biotechnology and Food Safety. *Strategic Research Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources.* 3: 103-112.
- Meyer SL, Everts KL, Gardener BM, Masler EP, Abdelnabby HM, Skantar AM (2016) Assessment of DAPG-producing *Pseudomonas fluorescens* for Management of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* on Watermelon. *J. Nematol.* 48: 43-53.
- Mhlongo MI, Piater LA, Madala NE, Labuschagne N, Dubery IA (2018) The chemistry of plant-microbe interactions in the rhizosphere and the potential for metabolomics to reveal signaling related to defense priming and induced systemic resistance. *Front. Plant. Sci.* doi: 10.3389/fpls.2018.00112
- Mohamed I, Eid KE, Abbas MHH, Salem AA, Ahmed N, Ali M, Shah GM, Fang C (2019) Use of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae to improve the growth and nutrient utilization of common bean in a soil infected with white rot

- fungi. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 171: 539-548.
- Mostowfizadeh-Ghalefarsa R, Banihashemi Z (2015) A Revision of Iranian *Phytophthora drechsleri* Isolates from Cucurbits Based on Multiple Gene Genealogy Analysis. *J. Agr. Sci. Tech.* 17: 1347-1363.
- Rashid M, Khalil S, Ayub N, Alam S, Latif F (2004) Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pak. J. Biol. Sci.* 7:187-196.
- Ringel MT, Brüser T (2018) The biosynthesis of pyoverdines. *Microb. Cell.* 5: 424-437.
- Rubio EJ, Montecchia MS, Tosi M, Cassán FD, Peticari A, Correa OS (2013) Genotypic characterization of azotobacteria isolated from Argentinean soils and plant-growth-promoting traits of selected strains with prospects for biofertilizer production. *Sci. World J.* doi: 10.1155/2013/519603
- Sadeghi A, Koobaz P, Azimi H, Karimi E, Akbari AR (2017) Plant growth promotion and suppression of *Phytophthora drechsleri* damping-off in cucumber by cellulase-producing *Streptomyces*. *BioControl.* 62: 805-819.
- Shirzad A, Fallahzadeh-Mamaghani V, Pazhouhandeh M (2012) Antagonistic potential of fluorescent *Pseudomonads* and control of crown and root rot of cucumber caused by *Phytophthora drechsleri*. *Plant. Pathol. J.* 28:1-9.
- Sivasakthi S, Usharani G, Saranraj P (2014) Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR)-*Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Agric. Res.* 9: 1265-1277.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L, Du B (2009) Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Braz. J. Microbiol.* 40: 276-284.
- Tripathi G, Rawal, SK (1998) A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from *Streptomyces aureofaciens*. *Biotechnol. Tech.* 12: 629-631.
- 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. *Front. Plant. Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.01212
- Xu GH, Zheng HY (1986) Handbook of analytical method on soil microorganism. Agricultural Press. Beijing.