

معرفی، بررسی مکانیسم‌های عمل و توصیف ژنومی باکتری پروبیوتیک گیاهی *Bacillus velezensis*

سونیا سیفی<sup>۱</sup>، کیوان بهبودی<sup>۲\*</sup>، روح الله شریفی<sup>۳</sup> و جیمز شپلیگ<sup>۴</sup>  
 ۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج  
 ۳. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه  
 ۴. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه کرنل، ایالت نیویورک  
 (تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۳/۲۵)

## چکیده

باکتری *Bacillus velezensis* یکی از عوامل پروبیوتیک گیاهی می‌باشد که اخیراً به‌عنوان یکی از ابزارهای قوی بیوکنترل مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این پژوهش معرفی و بررسی برخی از خصوصیات باکتری *B. velezensis* می‌باشد که از ریزوسفر گوجه‌فرنگی شهرستان کرمانشاه جداسازی شد. در این پژوهش باکتری *B. velezensis* به‌ترتیب موجب افزایش ۷۸/۸۶، ۵۶/۸۷ و ۴۵/۸۳ درصدی طول شاخساره، طول ریشه و وزن خشک گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه و درصد جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر در شرایط آزمایشگاهی گردید. علاوه بر این، برخی از خصوصیات پروبیوتیکی این جدایه از جمله تولید سیدورفور، سیانید هیدروژن و اندول استیک اسید در آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفتند. اثر بازدارندگی این سویه روی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* به روش کشت متقابل و ترکیبات فرار ضدقارچی به‌ترتیب به میزان ۸۳ و ۵۸ درصد بود. در بررسی‌های گلخانه‌ای نیز باعث کاهش بروز ۸۷/۵ درصدی علائم بیماری گردید. در نهایت ژنوم کامل باکتری با استفاده از تکنولوژی ایلومینا تعیین توالی گردید. سپس در پایگاه RAST مکان‌های ژنومی و توالی‌های رمزگردان مشخص گردید و در پایگاه NCBI با توالی‌های موجود مقایسه شد. نتایج نشان داد که این جدایه با احتمال ۱۰۰ درصد متعلق به گونه *B. velezensis* است. اندازه ژنوم این جدایه ۴۱۳۲۸۶۸ جفت باز و شامل ۴۳۲۹ توالی رمزگردان می‌باشد. این تحقیق اثباتی بر معرفی گونه *B. velezensis* به‌عنوان باکتری پروبیوتیک گیاهی است.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی، کنترل بیولوژیک، *Bacillus velezensis*.

Introduction, mechanisms of action and genomic description in plant probiotic bacterium *Bacillus velezensis*

Sonia Seifi<sup>1</sup>, Keivan Behboudi<sup>1\*</sup>, Rouhallah Sharifi<sup>2</sup> and James. P. Shapleigh<sup>3</sup>

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

3. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

4. Associate Professor, Department of Microbiology, Cornell University, Ithaca, New York, USA

(Received: Feb. 16, 2019 - Accepted: Jun. 15, 2019)

## ABSTRACT

*Bacillus velezensis* is one of the plant probiotic bacteria that has been recently considered as one of the most powerful biocontrol agents. The purpose of this study is to introduce and investigate some of the characteristics of *B. velezensis* bacterium, which has been isolated from tomato rhizosphere in Kermanshah Province. In this study, *B. velezensis* increased shoot length, root length and dry weight of tomato plants by 78.86%, 56.68%, and 45.83%, respectively in comparison to uninoculated control; it also promoted seed germination percentage and seed vigor index under *in vitro* condition. Furthermore, some of the biocontrol properties of this strain such as the production of siderophore, HCN, and indole-3-acetic acid and solubilization of phosphate were evaluated. Biocontrol bioassay of this strain against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* under *in vitro* condition revealed that this strain can inhibit the mycelial growth in both dual culture and volatile compounds methods about 83% and 58%, respectively. The pot experiment results showed that *B. velezensis* caused a reduction in disease symptoms up to 87%. Finally, the whole genome sequence of this strain was identified using Illumina HiSeq2500 technology. Then genomic locations and coding sequences were identified in RAST database. In addition, the sequencing data were compared with existing sequences in the NCBI database. Results showed that this isolate has high similarity to (%100) *B. velezensis*. The genome of this isolate contains 4132868bp and 4329 CDs. The results suggest that *B. velezensis* has a good potential to be introduced as a plant probiotic bacterium.

**Keywords:** Biological control, *Bacillus velezensis*, Tomato fusarium wilt disease.

\* Corresponding author E-mail: behbodi@ut.ac.ir

*B. methylophilus*, *B. siamensis*, *B. oryzicola* و *B. vanillea* دیده شده است که توسط Wang et al. (2007) به‌عنوان *Bacillus velezensis* پیشنهاد گردیده است. باکتری *B. velezensis* گونه‌ای غیر بیماری‌زا، گرم مثبت، میله‌ای شکل و یکی از پروبیوتیک‌های گیاهی با پتانسیل بیوکنترل بالا است (Dunlap et al., 2016). این باکتری متعلق به Terrabacteria، راسته Bacillales، خانواده Bacillaceae و متعلق به گروه *Bacillus amyloliquefaciens* می‌باشد (Wang et al., 2007). از خصوصیات بارز این گونه می‌توان به تولید لیپوپپتیدهای متنوعی همچون سورفکتین، لیچنین، ایتورین‌ها بخصوص ایتورین A و E باسیلومایسین، میکوسوبتیلین، فنجاسین، پلیپاستاتین، پلی‌کتیدها مانند ماکرولاکتین، باسیلائین، دیفیسیدین (Liu et al., 2017) باکتریوسین‌هایی مانند آمیلولیزین و آمیلوسایکلین (Palazzini et al., 2016) و سایر متابولیت‌هایی مانند لانتی‌پپتیدها و ترپن‌ها اشاره نمود که در بسیاری از مطالعات اثر مهارکنندگی آنها روی بیمارگرهای گیاهی اثبات شده است. از بین جدایه‌های باکتری *B. velezensis* تنها ۴۷ سویه به‌طور کامل ترتیب توالی گردیده است که در این بین تنها ۲۰ سویه به‌طور کامل گردایش<sup>۲</sup> شده‌اند. طبق تحقیقات انجام گرفته، گونه *B. velezensis* پتانسیل بالایی در کنترل بیمارگرهای *Rhizoctonia solani*، *Glomerella glycines*، *Blumerella graminis*، *Fusarium oxysporum* f.sp. *Alternaria alternata* *graminis* و *Gaeumannomyces graminis* داشته است (Cai et al., 2013; Yang et al., 2014). علاوه بر تولید متابولیت‌های متنوع ثانویه با فعالیت‌های ضد میکروبی و ضد باکتریایی، برخی از سویه‌های *B. velezensis* توانایی کلنیزاسیون ریشه گیاه میزبان را دارند. توانایی کلنیزاسیون و تشکیل بیوفیلم روی ریشه گیاه و استقرار مناسب باکتری یکی از مهم‌ترین شاخص‌های فعالیت بیوکنترلی پروبیوتیک‌های گیاهی می‌باشد (Zhang et al., 2007). از مزایای تشکیل بیوفیلم پتانسیل کلنیزاسیون

## مقدمه

نگرانی‌های زیست‌محیطی، غذای سالم و مقاومت به سموم شیمیایی توجه جامعه علمی را به روش‌های دوستدار محیط زیست از جمله استفاده از عوامل بیوکنترل معطوف کرده است. در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از ریزوباکترهای تحریک‌کننده رشد گیاه (PGPR) و تأثیرات مفید آنها بر رشد گیاهان، بسیار مورد توجه جوامع بشری قرار گرفته است. این ریزوباکتری‌ها تأثیر خود را بر رشد گیاه به‌صورت مستقیم از طریق تولید فیتوهورمون‌ها، افزایش حلالیت عناصر غذایی، تثبیت ازت و به‌صورت غیرمستقیم از طریق مهار و یا کاهش اثر عوامل بیماری‌زا با استفاده از مکانیسم‌هایی مانند رقابت بر سر غذا و مکان با بیمارگر، القای مقاومت سیستمیک در گیاه و افزایش سطح تحمل گیاه به تنش‌های غیر زیستی اعمال می‌کنند (Borriss et al., 2011; Cai et al., 2013). در بین این ریزوباکتری‌ها، گونه‌های غیر بیماری‌زای باسیلوس به‌عنوان یک ابزار قوی بیوکنترل مورد توجه قرار گرفته است. اکثر گونه‌های جنس باسیلوس به لحاظ تولید متابولیت‌های بیوکنترلی مانند لیپوپپتیدهای حلقوی، انواع لانتی‌بیوتیک<sup>۱</sup> و آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین افزایش رشد گیاهان در شرایط گلخانه و مزرعه در جایگاه مطلوبی قرار دارند (Liu et al., 2013; Cai et al., 2016) علاوه بر این قابلیت تولید اندوسپور، مقاومت به تنش‌های محیطی و سازگاری آنها با محیط این جنس را به‌عنوان یک باکتری پروبیوتیک گیاهی با قابلیت تجاری سازی معرفی کرده است (Borriss et al., 2011; Yang et al., 2014). تنوع زیاد بین گونه‌های جنس باسیلوس باعث شده که تفاوت‌های زیادی در ایجاد صفات مختلف در بسیاری از گونه‌های این جنس مشاهده گردد. حتی برخی از گونه‌ها دارای مشخصات فنوتیپی و فیزیولوژیکی مشابه با هم بوده و جهت تفکیک آنها نمی‌توان صرفاً به‌ترتیب توالی 16S rRNA اکتفا کرد. نمونه بارز آن در گونه‌های *B. amyloliquefaciens*

2. Assamble

1. Lantibiotic

نهایتاً تشتک‌های کشت داده‌شده در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. کلنی‌هایی که از نظر شکل و رنگ در محیط آگار مغذی متفاوت بودند انتخاب شده و پس از خالص‌سازی در لوله‌های آزمایش حاوی آگار مغذی در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

بررسی توانایی آنتاگونیستی سویه باکتری در برابر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در

شرایط آزمایشگاه

کشت متقابل

در این آزمایش سویه باکتری به صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک پتری و به فاصله یک سانتی‌متر از حاشیه آنها از چهار طرف تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA مایه زنی شدند. سپس یک قرص به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت پنج روزه جدایه استاندارد ۰۰۴ (FOL) *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* به‌طور جداگانه در مرکز تشتک کشت داده شد و پس از نگهداری تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سلسیوس، قبل از رسیدن میسلیوم قارچ به لبه تشتک پتری شاهد فاصله کلنی باکتری تا حاشیه پرگنه قارچ اندازه‌گیری شد (Hagedorn et al., 1989). در تشتک پتری شاهد به جای باکتری از آب مقطر سترون استفاده گردید.

اثر ترکیبات فرار ضد قارچی

بررسی تأثیر ترکیبات فرار ضد قارچی باکتری در جلوگیری از رشد *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* بر اساس روش Fiddaman & Rossall (1993) انجام گردید. در ابتدا سوسپانسیونی به غلظت CFU/ml  $1 \times 10^9$  از کشت تازه سویه باکتری تهیه و میزان  $200$  میکرولیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت آگار مغذی کشت داده شد. پس از نگهداری تشتک‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، قرصی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ بیمارگر در مرکز تشتک حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. با رعایت شرایط سترون تشتک‌های حاوی قارچ بیمارگر به‌صورت وارونه روی

بافت‌های داخلی ریشه و همچنین بیان ژن‌های ایتورین A سنتتاز در بین اندام‌های گیاهی می‌باشد که توسط Cai et al. (2016) با استفاده از ژن گزارش‌گر GFP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری اندوفیت *B. velezensis* علاوه بر سطوح خارجی ریشه، توانایی کلنیزه کردن بافت‌های کورتکس، آوندهای چوبی و استوانه مرکزی ریشه را نیز دارد (Kang et al., 2018). از طرف دیگر، در سال ۲۰۱۶ باکتری *B. velezensis* به‌عنوان قارچکش بیولوژیک و یکی از بهترین مهارکنندگان عواملی بیماری‌زای قارچی دوستدار محیط زیست توسط وزارت کشاورزی جمهوری خلق چین معرفی گردید (Pan, 2017).

هدف از این پژوهش جداسازی و معرفی گونه گیاهی و بررسی پتانسیل‌های بیوکنترلی و افزایش دهندگی رشدی آن در سطح ژنوم و کاربرد این جدایه بومی در گلخانه‌ها و مزارع به‌عنوان یک عامل پروبیوتیک گیاهی موفق و نقش آن در توسعه کشاورزی ارگانیک کشور می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

به‌منظور جداسازی باکتری، بر اساس مدل توصیه‌شده توسط Baker & Cook (1974) ۱۰۰ گرم از ریشه و خاک اطراف ریشه بوته‌هایی که دارای رشد بیشتری بوده و در صورت حضور بیماری در مزرعه، آلودگی کمتر یا فاقد آلودگی بودند، از منطقه ریزوسفر گیاهان گوجه‌فرنگی استان کرمانشاه با مختصات جغرافیایی  $33^{\circ}41'$  تا  $35^{\circ}17'$  عرض شمالی و  $45^{\circ}24'$  تا  $48^{\circ}06'$  طول شرقی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. سپس نمونه‌های خاک جمع‌آوری‌شده از هر منطقه را با یکدیگر مخلوط و از هر نمونه خاک یک گرم برداشته شد. نمونه خاک در ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط و از آن رقت‌های مختلف سریالی تهیه گردید. یکصد میکرولیتر از رقت‌های پنج و شش تهیه و با استفاده از میکروپیپت‌های سترون بر روی محیط کشت آگار مغذی<sup>۱</sup> منتقل و کشت داده شد.

1. NA

که با استفاده از 50% KOH به pH ۷ رسانده شد) رشد داده شدند. سپس سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی جدا شد. ۳۵ میکرولیتر از مایع جذب آن، مقدار مساوی دیگری از همان مایع رویی دوباره به چاهک‌ها اضافه شد. تشتک‌های پتری به مدت هشت ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند و قطر هاله نارجی اطراف چاهک‌ها اندازه‌گیری شد (Sharifi et al., 2017).

جهت اندازه‌گیری مقدار هورمون اندول استیک اسید تولیدشده توسط باکتری، از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از کشت تازه باکتری رشد یافته در محیط مایع آگار مغذی به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه آگار مغذی دارای ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان منتقل و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور دقیقه و دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ کردن در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. پس از حذف سلول‌ها، یک میلی‌لیتر از مایع رویی را با چهار میلی‌لیتر معرف سالکوفسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۷/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن سه آبه ۰/۵ مولار) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و پس از گذشت این زمان با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نوری آن در طول موج نوری ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید. میزان تولید اندول استیک اسید با مقایسه جذب نوری آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد (Patten & Glick, 2002).

توانایی تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش Alstrom & Burns (1989) انجام شد. برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بر روی محیط آگار مغذی دارای ۴/۴ میلی‌گرم در لیتر گلاسیین تلقیح گردید. سپس یک کاغذ صافی آغشته به معرف کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵

تشتک حاوی باکتری قرار داده شد و فاصله لبه تشتک‌ها توسط پارافیلیم کاملاً مسدود گردید. تشتک‌های پتری به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس درصد بازدارندگی از رشد میسلیم با اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ اندازه‌گیری شد.

### تولید متابولیت‌های میکروبی

به منظور بررسی تولید سیدروفور، از آزمون CAS-AD استفاده شد (Sharifi et al., 2017). این آزمون دارای دو محلول معرف Fe-CAS و محلول بافر می‌باشد که به صورت جداگانه تهیه گردید.

### محلول معرف Fe-CAS

این محلول از اختلاط ۱۰ میلی‌لیتر  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  یک میلی‌مولار (در اسیدکلریدریک ۱۰ میلی‌مولار) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول CAS (۱/۲۱ میلی‌گرم در لیتر) تهیه گردید. محلول ارغوانی تیره حاصله به آرامی تکان داده شده و به ۴۰ میلی‌لیتر محلول HDTMA (۱/۸۲ میلی‌گرم در لیتر) اضافه گردید. در نهایت محلول راکه به رنگ آبی تیره تبدیل شده بود اتوکلاو کرده و در دمای محیط تا ۵۰ درجه سلسیوس خنک شد.

### محلول بافر

۳۰/۲۴ گرم بافر PIPES در ۷۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۰/۵ گرم NaCl و ۱/۰ گرم  $\text{NH}_4\text{Cl}$  تهیه شد و PH آن با KOH ۵۰ درصد به ۶/۸ رسانده شد. قبل از اتوکلاو، به محلول فوق ۱۵ گرم آگار اضافه و با افزودن آب مقطر حجم آن به ۸۰۰ میلی‌لیتر رسید. پس از اتوکلاو کردن محیط تا دمای ۵۰ درجه سلسیوس سرد شد.

بعد از ریختن محیط درون تشتک پتری، چاهک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر در تشتک‌های پتری حاوی CAS-Agar ایجاد شد. باکتری‌ها به مدت ۴۰ ساعت، در دمای ۲۷ درجه سلسیوس داخل محیط کشت سوکسینات (۶ گرم بر لیتر  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ، ۳ گرم بر لیتر  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۰/۲ گرم بر لیتر  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، یک گرم بر لیتر  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  و ۴ گرم بر لیتر سوکسینیک‌اسید

تبدیل نیترات به مشتقات دیگر نیتروژنی باشد. در تأیید عدم احیای نیترات به نیتريت، مقدار بسیار جزئی گرد روی به لوله‌ها اضافه گردید. تغییر رنگ محیط به ارغوانی، دال بر فقدان آنزیم احیای نیترات در باکتری مورد مطالعه است (Schaad et al., 2001).

#### آغشته سازی بذر با باکتری

بذور گوجه‌فرنگی رقم فلات (تهیه‌شده از مؤسسه تحقیقات و اصلاح بذر کرج) به مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد ضد عفونی سطحی و با سه بار شست‌وشو در آب مقطر، هیپو کلریت آن زدوده شد. به منظور آغشته‌سازی بذور به سویه آنتاگونیست از روش Weller et al. (1993) استفاده گردید. یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته سویه باکتری روی محیط آگار مغذی به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع مغذی منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفت. سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ (به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه) رسوب داده شد و چند بار با محلول سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم ۰/۹ درصد) برای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی شست‌وشو انجام گرفت (Weller et al., 1993). سپس سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ مجدد از این محلول جداسازی شده و پس از تعیین جمعیت سوسپانسیون به غلظت  $10^9$  واحد تشکیل‌دهنده کلونی در میلی‌لیتر (CFU/ml) در محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز و با استفاده از رابطه (۱) تهیه گردید.

$$D_1V_1 + D_2V_2 = D_T(V_1 + V_2) \quad \text{رابطه (۱)}$$

$D_1$  = غلظت سوسپانسیون موجود

$V_1$  = حجم سوسپانسیون اولیه

$D_2$  = غلظت باکتری در محلول اضافه‌شده (در اینجا چون محلول CMC بدون باکتری اضافه‌شده  $D_2=0$  می‌باشد).

$D_T$  = غلظت سوسپانسیون نهایی

$V_2$  = حجم محلول اضافه‌شونده

تعداد ۲۰ بذر گوجه‌فرنگی درون سوسپانسیون باکتری ریخته شده و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر انکوباتور (۷۰ دور در دقیقه و دمای ۲۷ درجه سلسیوس)

درصد در قسمت درب پتری قرار داده شد و در نهایت تشتک‌های پتری به وسیله نوار پارافیلیم مسدود گردید. پتری‌ها به صورت واژگون به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری گردیدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد رنگ به ترتیب کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ می‌یابد (Alstrom & Burns, 1989).

توانایی تولید فسفاتاز به روش Pikovskaya (1948) انجام شد. برای انجام این آزمون از کشت تازه باکتری به صورت لکه‌ای بر روی محیط جامد پایکوفسکی حاوی: (گلوکز (۱۰ گرم در لیتر) - آگار (۱۵ گرم در لیتر) - عصاره مخمر (۰/۵ گرم در لیتر) - کلسیم فسفات (۵ گرم در لیتر) - آمونیوم سولفات (۰/۵ گرم در لیتر) - سدیم کلرید (۰/۲ گرم در لیتر) - پتاسیم کلرید (۰/۲ گرم در لیتر) - منیزیم سولفات هفت آبه (۰/۱ گرم در لیتر) - آهن سولفات هفت آبه (۰/۰۰۲ گرم در لیتر) - منگنز سولفات آبدار (۰/۰۰۲ گرم در لیتر) کشت گردید. سپس نمونه‌ها به مدت چهار روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. توانایی تولید آنزیم با تشکیل هاله شفاف اطراف محل رشد باکتری ارزیابی شد (Pikovskaya, 1948).

به منظور بررسی توانایی باکتری در احیای نیترات، پس از انتقال کشت تازه باکتری به محیط مایع حاوی نیترات و نگهداری باکتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور دقیقه به مدت ۴۸ ساعت، پنج قطره از معرف‌های محلول‌های A (هشت گرم اسیدسولفانلیک در هزار میلی‌لیتر اسید استیک پنج نرمال) و B (پنج گرم آلفانفتیل آمین در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک پنج نرمال) به میزان مساوی به باکتری‌های رشدیافته در محیط نیترات اضافه گردید. این مخلوط به مدت سه دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و پس از گذشت این زمان مشاهده رنگ ارغوانی در لوله‌ها، نشانگر وجود فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز در باکتری مورد بررسی بوده و تست مثبت تلقی می‌شود. عدم مشاهده رنگ ارغوانی در محیط کشت می‌تواند به علت عدم احیای نیترات و یا

هوایی و وزن خشک ریشه، ارتفاع ریشه و ارتفاع شاخساره اندازه‌گیری گردید.

#### تهیه مایه تلقیح بیمارگر

قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* با شماره مرجع ۰۰۴ (اهدایی دکتر مهدی ارزنلو، دانشگاه تبریز) تهیه گردید. جدایه مذکور پس از خالص‌سازی از طریق تک اسپور نمودن به مدت هشت روز روی محیط کشت PDA رشد داده شد. سپس مطابق روش Maurhofer *et al.* (1994) مایه تلقیح بیماری آماده گردید. به این ترتیب که ۱۰۰ گرم بذر ارزن در ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک ارزن ۲۵۰ میلی‌لیتری و به مدت ۲۴ ساعت خیس شده و در دو روز متوالی اتوکلاو شد. سپس چهار قرص پنج میلی‌متری از حاشیه کشت چهار روزه قارچ به آن اضافه نموده و به مدت ۲۶ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری گردید (Maurhofer *et al.*, 1994).

ارزیابی قدرت آنتاگونیستی جدایه باکتری در شرایط گلخانه در این مرحله ریشه گیاهچه‌های ۳-۴ برگی رقم فلات درون سوسپانسیون جدایه باکتری با جمعیت CFU/ml  $1 \times 10^9$  به مدت یک ساعت غوطه‌ور شدند. سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌هایی یک کیلوگرمی که دو سوم حجم آن با خاک سترون و یک سوم باقیمانده قسمت بالایی آن با مخلوط خاک سترون و نسبت ۱:۱۰ وزنی مایه تلقیح حاوی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (بذور ارزن پوشیده‌شده با قارچ بیمارگر) کشت گردیدند. سه روز بعد مجدداً سوسپانسیون باکتری با غلظت  $10^8$  CFU/gr خاک به گلدان‌های حاوی گیاهچه‌های کشت شده اضافه و در گلخانه در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری و هر دو روز یک بار آبیاری شدند. یادآور می‌شود که گلدان‌های شاهد نیز در دو گروه طبقه‌بندی شدند: (۱) گیاهچه تیمار شده با جدایه باکتری در خاک سترون بدون قارچ بیمارگر، (۲) گیاهچه کشت‌داده‌شده در خاک آلوده به قارچ بیمارگر بدون تیمار باکتری. گیاهچه‌ها هر روز

قرار داده شدند. در تیمار شاهد بذور درون آب مقطر سترون فاقد باکتری غوطه‌ور شدند. بذور تلقیح‌شده تحت تأثیر جریان ملایم باد در زیر هود خشک شدند.

#### اثر باکتری بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گوجه‌فرنگی

تعداد ۱۰ بذر تیمار شده با باکتری درون هر تشتک پتری حاوی کاغذ صافی سترون و مرطوب شده با آب مقطر سترون قرار گرفته و درون اتاقک رشد با دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس و رطوبت ۳۷ درصد نگهداری شدند. تشتک‌های پتری هر روز مورد بررسی قرار گرفته و تعداد بذور جوانه‌زده یادداشت و در نهایت پس از ۷ روز ارتفاع ریشه‌چه و ساقه‌چه اندازه‌گیری شد و درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، متوسط زمان جوانه‌زنی، متوسط جوانه‌زنی روزانه و شاخص بنیه بذر مطابق روابط ۲، ۳ و ۴ محاسبه گردید.

$$\sum GR = \frac{N_i}{T_i} \quad \text{رابطه ۲) سرعت جوانه‌زنی:}$$

$N_i$ : تعداد بذر جوانه‌زده در هر روز،  $T_i$ : تعداد روزهای سپری‌شده از شروع آزمایش.

رابطه ۳) درصد جوانه‌زنی:

$$PG = (n/N) 100 \quad n$$

$n$ : تعداد بذور جوانه زده در هر روز،  $N$ : تعداد کل بذور. رابطه ۴) شاخص بنیه بذر میانگین طول گیاهچه (Hampton & Tekrony, 2008).

$$V_i = \frac{L_s \times P_g}{100}$$

#### آزمایشات گلخانه‌ای

ارزیابی افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی توسط سویه باکتری برای بررسی نقش باکتری، در میزان افزایش رشد گیاه، آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی شرایط گلخانه انجام گرفت. ۳۰۰ گرم خاک مزرعه سترون‌شده به همراه یک سوم حجمی آن از پرلیت به گلدان‌ها اضافه شد. سه عدد بذر گوجه‌فرنگی که طبق روش گفته شده در بالا با سویه باکتری تلقیح شده بودند در هر گلدان کاشته شد. گلدان‌های کاشته شده در در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس در شرایط گلخانه نگهداری و هر دو روز یکبار آبیاری انجام شد. ۳۵ روز بعد از کاشت، گیاهان برداشت‌شده و فاکتورهای رشدی آنها شامل وزن خشک اندام‌های

فاصله‌های موجود در توالی‌های هم‌ردیف‌شده از GapFiller 1.11 استفاده گردید. گردایش داده‌های مراحل قبل توسط نرم‌افزارهای SPAdes Vo. 3.13.1 RAST و PATRIC بارگذاری گردیده و در قسمت Prokaryotic Genomes Automatic (Annotation Pipeline) تفسیر و سپس پیش‌بینی پروتئین صورت گرفت. تمامی نرم‌افزارها در تارنمای بخش بیوتکنولوژی دانشگاه کرنل موجود است (BioHPC cloud, 2017).

### تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات با نرم‌افزار MSTATC و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت و میانگین‌ها در سطح احتمال یک و پنج درصد از یکدیگر جدا گردید.

### نتایج

به‌منظور دستیابی به باکتری پروبیوتیک گیاهی با توانایی بیوکنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی نمونه‌برداری‌های متعددی از ریزوسفر و ریشه گوجه‌فرنگی به‌عمل آمد. از بین حدود ۵۴۷ جدایه تعداد ۲۵ جدایه موجب افزایش شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی گردیده و به‌طور قابل ملاحظه‌ای درصد جوانه‌زنی بذر و همچنین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه را در آزمون کشت گیاهچه‌ها درون تشتک پتری افزایش دادند (نتایج منتشر نشده). بر اساس آزمون غربالگری اولیه جدایه منتخب که JPS19 نامگذاری گردید، حداکثر توان تولید سیانید هیدروژن (شکل C-1)، افزایش شاخص‌های رشدی بذر و گیاه و بیشترین میزان ممانعت کنندگی از پرگنه قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را در غربالگری ثانویه داشت.

بررسی توانایی آنتاگونیستی جدایه JPS19 در شرایط آزمایشگاه

در آزمون کشت متقابل، جدایه *Bacillus JPS19*

مورد بررسی قرار گرفته و نشانه‌های ظاهری و تعداد گیاهچه‌های سالم و بیمار و درصد پژمردگی هر گیاهچه یادداشت‌برداری شد. علایم و شدت بیماری سه هفته پس از مایه‌زنی بر اساس سیستم نمره‌دهی (Kamal et al. 2009) و (Amini 2009) با در نظر گرفتن معیارهای زیر مورد ارزیابی قرار گرفت:

۰= گیاه سالم و مصون از هرگونه علایم

۱= ظهور علایم در برگ‌ها اعم از کلروز، پیچیدگی، ... ظهور علایم به میزان ۲۵ درصد

۲= ظهور علایم به میزان ۵۰-۲۶ درصد

۳= ظهور علایم به میزان ۷۵-۵۱ درصد

۴= ظهور علایم به میزان ۱۰۰-۷۶ درصد

علاوه بر این، وزن خشک ریشه، اندام‌های هوایی و نیز ارتفاع ریشه و شاخساره نیز اندازه‌گیری گردید.

### شناسایی و ترتیب توالی کل ژنوم باکتری

استخراج DNA کل، از ۱۰ میلی‌لیتر کشت ۴۸ ساعته باکتری در محیط مایع آگار مغذی توسط کیت کپان آمریکا مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس کمیت و غلظت مناسب اسید نوکلئیک با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ND800 تعیین گردید. DNA استخراج‌شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. ترتیب توالی کل ژنوم باکتری منتخب با استفاده از تکنولوژی Illumina Hiseq2500 صورت گرفت. جهت انجام مراحل آماده‌سازی نمونه با کیت‌های ایلومینا (TruSeq DNA free- PCR)، بارکدگذاری اختصاصی، حذف توالی آداپتور و نهایتاً توالی‌یابی کل ژنوم، نمونه به بخش بیوکنترل دانشگاه کرنل منتقل شد. بعد از اتمام مراحل فوق توالی‌های نوکلئوتیدی خام با استفاده از ابرکامپیوترهای ۶۴ هسته‌ای Intel Xeon E7-Dell بخش بیوتکنولوژی دانشگاه کرنل جهت پردازش مراحل بعدی توالی نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گرفتند. سپس توالی‌های کوتاه، توالی‌های جفت‌نشده و آداپتورها (در صورت وجود) با Trimmomatic Vo.30 و seqPrep 2013-12-17 Vo. از داده‌های خام بارگذاری شده حذف گردیدند. جهت هم‌ردیفی داده‌ها از نرم‌افزار dimond Vo. 0.9.24 و سپس جهت حذف

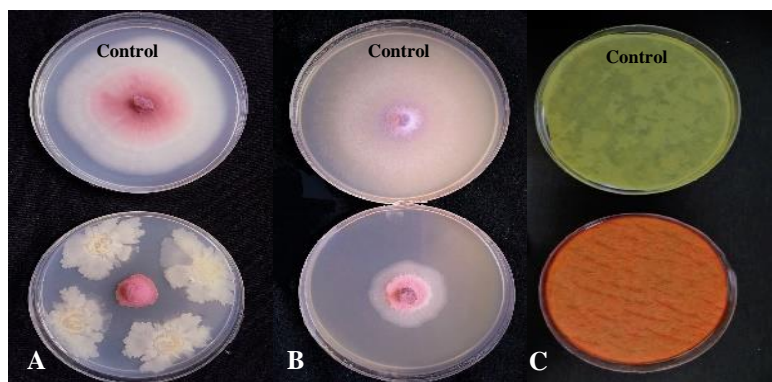
تغییر رنگ کاغذ معرف از زرد به آجری دارای حداکثر توان تولید سیانید هیدروژن می‌باشد (شکل C-۱). ازدیاد تولید ریشه فرعی (شکل C-۲) در مراحل اولیه ریشه‌زایی و همچنین افزایش رشد گیاه، معلول تولید اندول استیک اسید می‌باشد که میزان آن در این جدایه چهار میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری شد.

نتایج حاصل از تولید آنزیم‌ها نشان داد که این باکتری توانایی انحلال فسفات معدنی در محیط اختصاصی پایکوفسکی (شکل B-۲) را داشت. فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز و توانایی احیای نیترات نیز با مشاهده رنگ ارغوانی پس از اضافه کردن معرف‌های آلفانفتیل آمین و سولفانلیک اسید در این جدایه اثبات گردید.

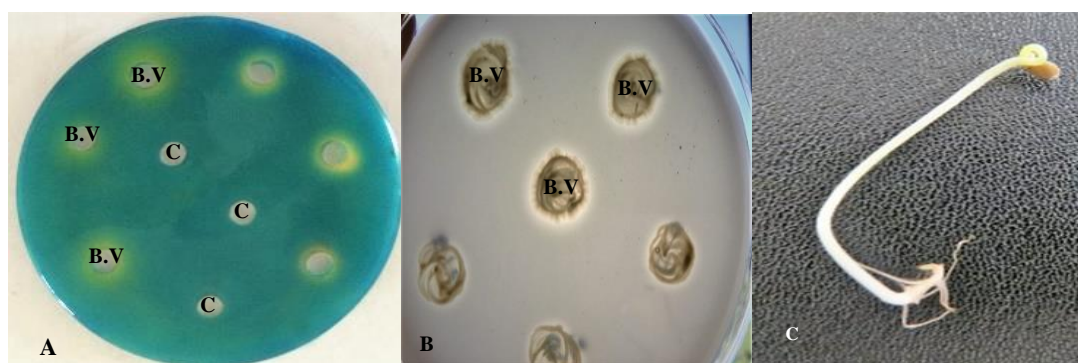
*velezensis* تأثیر قابل‌توجهی در قارچ ایستایی *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi* (شکل A-۱) و باعث ممانعت ۸۳ درصدی قارچ بیمارگر درون تشتک پتری گردید. در بررسی تأثیر ترکیبات فرآر ضد قارچی نیز جدایه JPS19 توانست به میزان ۶۹ درصد موجب بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر درون تشتک پتری گردد (شکل B-۱).

#### تولید متابولیت‌های میکروبی

در ارزیابی تولید سیدروفور، میانگین میزان هاله نارنجی رنگ ایجاد شده در اطراف چاهک‌های محیط CAS-AD، ۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد (شکل A-۲). نتایج حاصل از تولید سیانید هیدروژن نشان داد که جدایه JPS19 با



شکل ۱. A) آزمون کشت متقابل جهت بررسی تأثیر ممانعت از رشد پرگنه قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopercisi* (FOL) توسط گونه *B. velezensis*. B) آزمون تأثیر ترکیبات فرآر ضدقارچی، جدایه JPS19 بر پرگنه قارچ FOL. C) تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه JPS19. Figure 1. A) Dual Culture assay for mycelial growth inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *Lycopercisi* (FOL) by *B. velezensis*. B) Effect of *B. velezensis* JPS19 volatile compounds on inhibition of FOL mycelial growth. C) HCN production by *B. velezensis* JPS19.



شکل ۲. A) تولید سیدروفور در اطراف چاهک‌های محیط CAS-AD توسط جدایه JPS19. B) ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی باکتری *B. velezensis* (B.V) روی محیط پایکوفسکی. C) ایجاد ریشه‌های فرعی در بذور تیمار شده با باکتری *B. velezensis* در مراحل اولیه جوانه‌زنی بذر.

Figure 2. A) Siderophore production in CAS-AD agar plate. B) Clear halo production around the *B.velezensis* (B.V) JPS19 colonies on Pikovskaya medium. C) Lateral root development in tomato seeds treated with B.V in early stages of seed germination.



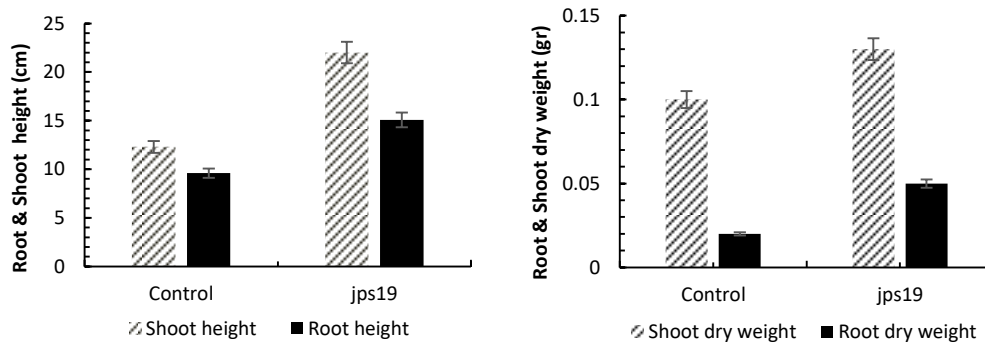
بذور تیمارشده با باکتری بود که در هیچ یک از تکرارهای شاهد دیده نشد.

### آزمایش‌های گلخانه‌ای

ارزیابی افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی توسط جدایه باکتری نتایج حاصل از شاخصه‌های مورد ارزیابی شامل طول شاخساره، طول ریشه، وزن خشک گیاهچه تفاوت معنی‌داری را در سطح ۵ درصد با شاهد نشان داد. تیمار نشاء با استفاده از جدایه JPS19 توانست به میزان ۴۵/۸۳ درصد میانگین صفت وزن خشک بوته نسبت به شاهد را افزایش دهد. مقایسه مقادیر میانگین طول شاخساره و طول ریشه به ترتیب افزایش ۷۸/۸۶ و ۵۶/۸۷ درصدی را نسبت به شاهد داشت (شکل ۱ و جدول ۱).

### اثر باکتری بر روی شاخص‌های جوانه‌زنی بذر گوجه‌فرنگی

مقایسه میانگین‌های به‌دست‌آمده از شاخص‌های جوانه‌زنی بذور گوجه‌فرنگی رقم فلات در بررسی‌های روزانه، طی یک هفته مشخص کرد که تیمار بذور با باکتری باعث افزایش ۶۶/۶ و ۸۷ درصدی جوانه‌زنی به ترتیب در روزهای سوم و پنجم درمقایسه با شاهد شدند. به‌طور کلی تیمار بذور با باکتری موجب افزایش ۳۳/۸ درصدی جوانه‌زنی بذر گردید. میانگین شاخص بنیه بذر در شاهد ۱/۴۴ بود که کاربرد باکتری موجب افزایش این شاخص به ۲/۹۶ گردید. مقایسه میانگین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه در روز هفتم در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری با شاهد داشته و به ترتیب موجب افزایش ۵۸ و ۵۵ درصدی آنها گردید. نکته قابل توجه دیگر، مشاهده ریشه فرعی (شکل C-۲) در



شکل ۱. تأثیر جدایه باکتری *Bacillus velezensis* در افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی  
Figure 1. Effect of *Bacillus velezensis* on improving the tomato plant growth

جدول ۱. میانگین مرتب‌ات اثر باکتری JPS19 *Bacillus velezensis* بر روی شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی  
Table 1. Mean Square of *Bacillus velezensis* JPS19 on growth indexes of tomato plant

Source of variation	df	Mean square								
		Root dry weight	Shoot dry weight	Root height	Shoot height	Radice height	Plumule height	Vigor index	Germination rate	Germination percentage
Treatment	1	0.001**	0.001**	44.827**	141.135**	6.827**	7.150**	3.450**	0.002 ns	601.201**
Error	4	0.00002	0.000025	0.872	0.745	0.277	0.043	0.040	0.027	14.896
C.V	-	5.40%	14.59%	7.57%	5.03%	10.66%	4.72%	9.05%	3.37%	8.47%

\*\* و ns: اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد و نبود اختلاف معنی‌دار.  
\*\* , ns: Significant at the probably level of 1% of probability levels, and non significant.

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر جدایه JPS19 *Bacillus velezensis* بر شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی در حضور بیمارگر  
Table 2. Effect of *B. velezensis* isolate JPS19 on tomato plant growth indices in presence of FOL

Treatment	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Shoot height (cm)	Root Height (cm)	Disease severity
JPS19+ FOL	0.188 a	0.03667 a	13.330 ab	12.000 a	0.5 b
Healthy control	0.1243 b	0.02100 b	14.670 a	10.000 b	0 b
Infected control	0.0513 c	0.001 c	10.330 b	2.667 c	4 a

\* میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح پنج درصد آزمون چند دامنه‌ای دانکن با هم اختلاف معنی‌داری دارند.  
\* Means with common letters in each column are not significantly different (P≤0.05).

## شناسایی و ترتیب توالی کل ژنوم باکتری

پس از دریافت نتیجه توالی‌یابی، داده‌های خام پردازش شده و با استفاده از نرم‌افزار FastQc از نظر کیفی، کنترل گردید. نمودار تک‌نمایی و مقارن با چولگی و کشیدگی صفر در جدایه مورد مطالعه نشان‌دهنده کیفیت مطلوب ژنوم برای انجام مراحل بعدی شناسایی ژنوم بود. سپس خوانش‌های کوتاه حذف، توالی مورد نظر گردایش و از نظر میزان آلودگی مورد بررسی قرار گرفت. تمامی مراحل در محیط لینوکس و با استفاده از فرامین مربوط به هر قسمت اجرا شد. در نهایت داده‌ها در پایگاه RAST و PATRIC بارگذاری گردید. توالی‌های رمزگردان و مکان‌های ژنومی مشخص و تفسیر<sup>۱</sup> گردید. محصول ژن‌های دخیل در بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه که پیش‌تر به‌عنوان عوامل افزایش‌دهنده رشد یا سرکوب قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی شناخته شده بودند (Weber *et al.*, 2015). در جدایه JPS19 پس از حذف توالی‌های غیرکدکننده توسط نرم‌افزار SPAdes و BBDuck، چهار چوب‌های خوانش باز (ORF) فراخوان گردید و بعد از ترجمه توالی‌های رمزگردان (CDs) توسط Prodigal (Vo. 2.6, 2017) پروتئین‌ها پیش‌بینی<sup>۲</sup> شدند. در نهایت توالی نوکلوتیدی جدایه JPS19 در بانک اطلاعاتی NCBI و SEED بارگذاری و با توالی‌های موجود مقایسه شد. نتایج نشان داد که این جدایه به احتمال ۱۰۰ درصد متعلق به گونه *Bacillus velezensis* می‌باشد (جدول ۳). مشخصات کلی ژنوم جدایه JPS19 در جدول ۳ آمده است.

جدول ۳. مشخصات کلی تفسیر ژنوم جدایه *Bacillus velezensis* JPS19

Table 3. Genome features of the *Bacillus velezensis* isolate JPS19

Featured	Value
Genome size(bp)	4132868
Contig numbers	29
G+C content (%)	46
Total number of genes	4329
rRNA genes	7
tRNA genes	58
N50	420122
L50	4

N50: Number of contigs, L50: Length of Contigs

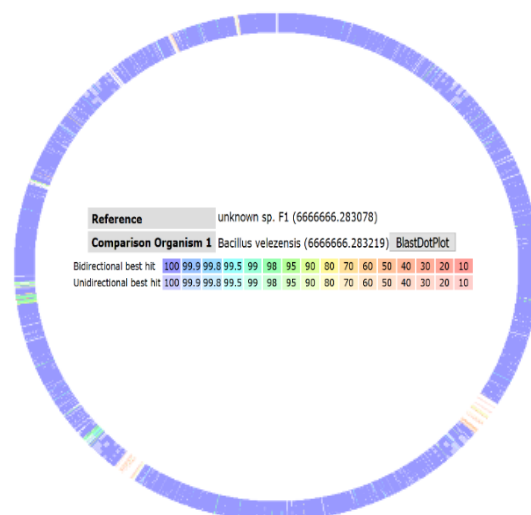
کلاسترهای ژنی متعددی در ارتباط با این جدایه

1. Annotate
2. Predict protein

یافت گردیدند که به‌صورت مستقیم در سنتز پپتیدها و پلی‌کتیدهایی که توسط پپتیدهای غیرریبوزومی (NRPS) سنتز می‌شوند دخیل هستند. تعداد و مشخصات زیرساخت‌های ژنومی موجود در این جدایه در شکل ۴ آمده است. در بین این کلاسترهای ژنی، باسیلاسیپین شناسایی گردید. اندازه این کلاستر ژنی در سویه JPS19 دارای ۱۱۸۲ جفت باز بود که در موقعیت ۱۴۱۹۹۱-۱۴۰۸۱۰ ژنوم این سویه قرار گرفته است. به‌علاوه یک کلاستر ژنی که در ارتباط با سنتز لانتی‌بیوتیک می‌باشد نیز در مجموع ژن‌ها یافت گردید. همچنین ژن‌های کدکننده سیدروفورهای باسیلی‌باکترین و آنترآچلین در مجموعه ژنی این باکتری یافت شد. از دیگر ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های ضد قارچی این جدایه ژن‌های بتا-۱-۳ و ۱-۴ گلوکاناز می‌باشند که به‌ترتیب ۱۵۰۰ (در موقعیت ۷۱۱۳۴۸-۷۱۲۸۴۷) و ۷۳۳ (در موقعیت ۲۶۴۵۰۳-۲۶۵۲۳۶) جفت باز دارند. در مورد ژن‌های دخیل در افزایش رشد و ایمنی گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زای گیاهی، ژنوم سویه JPS19 شامل مجموعه‌ای از ژن‌های دخیل در کلونیزاسیون و تشکیل بیوفیلم از جمله *TasA* می‌باشد که این ژن شامل ۱۸۳ جفت باز و در موقعیت ۱۴۶۸۲۴-۱۴۶۶۴۲ از ژنوم جدایه JPS19 قرار گرفته است. این جدایه در برگیرنده ژن‌های مورد نیاز در سنتز اندول استیک اسید (*yhcX*, *dhaS*) می‌باشد. علاوه بر این ژن‌های *alsS* و *alsR* مربوط به سنتز استوئین و بوتاندیول است که به‌ترتیب شامل ۱۸۰۹ و ۱۴۰۱ جفت باز می‌باشد. بررسی‌های ژنومی نشان داد که جدایه JPS19 از باکتری *B. velezensis* قادر به تولید لانتی‌بیوتیک است. به‌طور کلی ژنوم این سویه از باکتری *B. velezensis* دارای ۲۷ زیر مجموعه می‌باشد (شکل ۴).

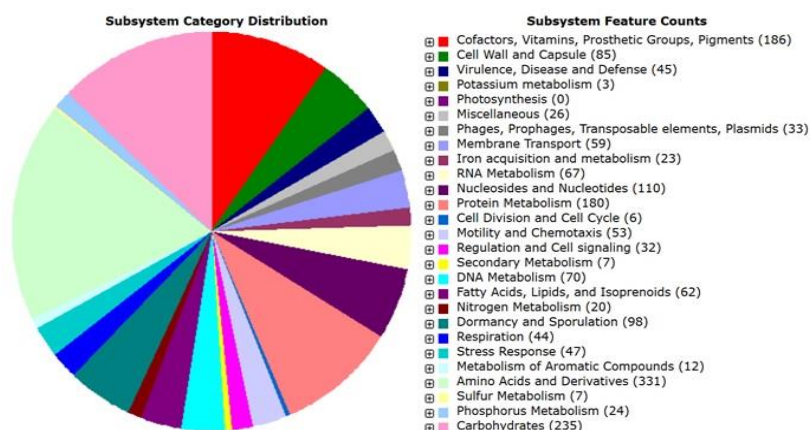
## بحث

در میان عوامل بیوکنترل، گونه‌های باسیلوس به دلیل توانایی در تولید متابولیت‌های ثانویه به‌خصوص پپتیدهای ضد قارچی، سیدروفور و آنتی‌بیوتیک‌های دخیل در کنترل بیولوژیک، توانایی القای مقاومت در گیاه و همچنین تولید هورمون‌های گیاهی مؤثر در افزایش رشد، دارای اهمیت فراوانی جهت کنترل عوامل بیماری‌زا گیاهی می‌باشند (Ahmad & Khan, 2008).



شکل ۳. مقایسه توالی ژنومی جدایه JPS19 با سایر توالی‌های موجود در پایگاه ژنومی RAST. (رنگ بنفش نشان‌دهنده بیشترین درصد تشابه با توالی انتخاب‌شده در پایگاه ژنومی می‌باشد).

Figure 3. Comparison of the *Bacillus velezensis* JPS19 genome with the complete genome of *B. velezensis* strains in RAST database



شکل ۴. تعداد و مشخصات زیرساخت‌های ژنومی متابولیت‌های ثانویه و قابلیت‌های تفسیرشده جدایه JPS19 در پایگاه ژنومی RAST

Figure 4. Gene function annotation of *B. velezensis* JPS19 and its Subsystem feature counts in RAST databa

جداسازی و تشخیص دقیق باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی و همچنین اطلاع از سیستم‌های دخیل در جدایه‌های مفیدی که علاوه بر تولید متابولیت‌های ضد میکروبی، همزمان توانایی افزایش رشد گیاهان را داشته باشند در انتخاب جدایه برتر از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش، گونه *Bacillus velezensis* اولین بار از ریزوسفر گوجه‌فرنگی در ایران جداسازی گردید. ترتیب توالی کل ژنوم و پیش‌بینی محصولات ژنی باکتری *B. velezensis* نشان می‌دهد که این گونه واجد تعداد زیادی ژن‌های دخیل در افزایش رشد گیاه و همچنین ترکیبات ضد میکروبی

جدایه‌های مفید باسیلوس به‌علت دارا بودن قابلیت‌های فوق‌الذکر و همچنین تولید اسپور برای پوشش‌دهی بذر کاربرد داشته و به‌عنوان ترکیبات تجاری محافظ گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی و افزایش و ارتقای رشد گیاه از اهمیت به‌سزایی برخوردار می‌باشد (Fira et al., 2018). در بین گونه‌های باسیلوس گونه *B. velezensis* به‌عنوان یکی از ترکیبات تجاری افزایش‌دهنده رشد گیاهان و آنتاگونیست موفق در کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته است (Borriss et al., 2011; Chen et al., 2007; Dunlap et al., 2016).

فرآر تولیدشده توسط باکتری‌های جنس باسیلوس تأکید داشته و آن‌ها را عامل مؤثری بر افزایش تولید و تعداد ریشه‌های فرعی بیان نمودند (Sharifi & Ryu, 2018a). Zhang *et al.* (2007) نیز ازدیاد ریشه‌های فرعی را در گیاهان تیمار شده با سویه *Bacillus subtilis* GB03 به ترکیبات فرآر باکتریایی تولیدشده در این باکتری و نقش آن‌ها در مسیرهای وابسته به اکسین نسبت دادند. با توجه به این‌که جدایه JPS19 توانایی احیاء نیترات را تا مرحله نیتریک اکسید دارد می‌توان وجود ریشه‌های فرعی (شکل C-۲) در مرحله ریشه‌چه را علاوه بر تولید اکسین به این مولکول حدواسط نیز نسبت داد. به‌طور کلی دو فرضیه در نقش و همکاری نیتریک اکسید با اکسین وجود دارد که عبارت است از: نیتریک اکسید به‌عنوان فرم فعال اکسیژن، آنتی‌اکسیدان‌هایی را در محیط تولید می‌کند که اکسین را از اکسیداسیون محافظت می‌کند و همچنین نیتریک اکسید به‌عنوان تنظیم‌کننده ژن‌های چرخه سلولی یا فعالیت‌های آنزیمی درگیر در انتقال سیگنال اکسین عمل می‌کند. (Aragunde *et al.*, 2004) در حقیقت نیتریک اکسید به‌عنوان بخشی از مجموعه پیام‌رسانی هورمون‌های گیاهی نقش ایفا می‌کند. مطالعه Sharifi & Ryu (2018b) مؤید آن است که نیتریک اکسید با منشأ باکتریایی قابلیت جذب و اثر گذاری در گیاه را دارد.

محمتم است که این ترکیبات هورمونی به سبب نقش افزایش‌دهی که در فعالیت‌های رشدی گیاه و همچنین جایگزینی ریشه‌های فرعی جدید با ریشه‌های آسیب‌دیده گیاه دارند، نقش مهمی در محتمل کردن گیاه به بیماری‌های ریشه گیاه نیز داشته باشند.

یکی دیگر از دلایل اصلی اثربخشی باکتری در افزایش رشد گیاه را می‌توان توانایی باکتری در انحلال فسفات معدنی بیان نمود. میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات قادرند از طریق مکانیسم‌هایی مانند ترشح اسیدهای آلی، آزادسازی یون‌های هیدروژن در سطح خارج سلولی باکتری و تولید اسیدهای غیرآلی سبب آزادسازی فسفر از ترکیبات نامحلول معدنی خاک گردد. در مطالعاتی که بر روی سویه‌های S499 و FZB42 *Bacillus amyloliquifaciens* (این سویه‌ها

می‌باشد (Liu *et al.*, 2016; Meng *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2017).

یکی از اثرات قابل‌توجه پروبیوتیک‌های گیاهی، تأثیر آنها در افزایش رشد گیاه میزبان است. این گروه از باکتری‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی مانند توانایی باکتری در حل فسفات، تثبیت نیتروژن و تولید هورمون‌هایی نظیر اکسین، سیتوکینین و بازداری از سنتز اتیلن نقش مهمی در افزایش رشد، توسعه ریشه و متعاقب آن بهبود جذب آب و عناصر غذایی توسط ریشه گیاه می‌گردد (Borriss *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2013). بررسی نتایج تیمار بذر با جدایه JPS19 نشان داد که این جدایه نقش مؤثری بر سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه بذر، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه دارد که نشان دهنده قدرت رشد گیاهچه بذر می‌باشد. نتایج اثر سویه *B. velezensis* BAC03 بر افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی نیز با نتایج حاصل از آزمون‌های گلخانه‌ای انجام‌شده در این مطالعه مطابقت دارد (Meng *et al.*, 2016). این محققین اذعان نمودند که توانایی باکتری در تولید اندول استیک اسید، آمونیوم و ACC-دامیناز<sup>۱</sup> نقش مهمی در گسترش ریشه و افزایش رشد گیاه دارد. گسترش ریشه‌های فرعی و توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه یکی از روش‌های غلبه بر ناتوانی تحرک گیاه به سمت آب و منابع غذایی می‌باشد که در این بین اکسین تولیدشده توسط باکتری به‌عنوان القاکننده انشعابات ریشه‌ای عمل کرده و موجب افزایش توسعه افقی ریشه در خاک می‌گردد که در نتیجه موجب افزایش عملکرد گیاه می‌گردد (Zhang *et al.*, 2007). علاوه بر این، ترکیبات فرآر باکتریایی موجب افزایش رونوشت‌های مربوط به سنتز و پاسخ به هورمون‌های اکسین می‌گردد (Sharifi & Ryu, 2018b). استعمال ایندول‌های فرآر تولیدشده توسط باکتری *Proteus vulgaris* در غلظت بهینه ۰/۶۳ نانوگرم در پلیت‌های ۴۴/۱۸ سانتی‌متر مربع موجب افزایش ۴۰ درصدی شاخص بنیه بذر در گیاه کلم چینی می‌گردد (Sharifi & Ryu, 2018a). Gutierrez-Luna *et al.* (2010) نیز بر نقش ترکیبات

1. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

برانگیختگی پاسخ‌های دفاعی در گیاهان و متعاقب آن مقاومت‌های بعدی در مقابل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی خواهد شد که در مطالعه Xu et al. (2016) نیز به توانایی این گونه در تولید برخی از متابولیت‌های فوق‌الذکر و نقش آنها در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی اشاره شده است. لانتی بیوتیک‌ها پپتیدهای ضد میکروبی از گروه باکتریوسین‌ها هستند که به‌صورت ریبوزومی سنتز می‌شوند. در تبیین این موضوع مطالعات متعددی در مورد نقش لانتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان عامل مؤثر در کنترل عوامل بیماری‌زا انجام گرفته است که از آنها می‌توان نقش لانتی بیوتیک تولیدشده توسط سویه *B. velezensis* RC218 در کنترل بیماری فوزاریومی سنبله گندم (*Fusarium graminearum*) را نام برد (Palazzini et al., 2016). حضور لانتیونین در ساختار لانتی‌بیوتیک‌ها باعث بروز طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی می‌گردد (Lorraine et al., 2013). اگرچه در اکثر مطالعات انجام‌شده بر روی سویه‌های این گونه از باسیلوس حضور لیپوپپتیدهای ایتورین، سورفکتین و فنجایسین را به‌عنوان بازدارنده کلیدی در کنترل بیمارگرهای گیاهی ذکر کرده‌اند (Cai et al., 2013). ولیکن باید خاطر نشان کرد که حضور این سری از لیپوپپتیدها در مجموع کلاسترهای ژنی جدایه JPS19، فاقد توالی‌های کدکننده لیپوپپتیدهای حلقوی مانند: ایتورین و فنجایسین می‌باشد. یکی دیگر از متابولیت‌های دخیل در بروز خصوصیات آنتاگونیستی تولید سیدروفور می‌باشد. بررسی‌های انجام گرفته در این تحقیق نشان داد که این باکتری توانایی تولید سیدروفور را دارد (شکل ۲-A). که در بررسی محصول ژنومی و در بخش مربوط به متابولیسم‌های مرتبط با آهن مشخص شد که سیدروفورهای تولید شده توسط جدایه JPS19 از نوع کاتکولات و مشخصاً باسیلی‌باکتین و آنتراچلین می‌باشد. مضافاً اینکه باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی تولید کننده سیدروفور در رقابت برای کسب آهن با بیمارگر مهاجم، مانع از رشد و حمله آنها به ریشه می‌شوند. مشخص شده است که محلول سازی آهن از طریق سیدروفورهای میکروبی و انتقال آن به گیاه

به گونه *B. velezensis* انتقال یافته‌اند) انجام‌شده، مشاهده گردید که این باکتری‌ها قابلیت تولید آنزیم‌های فسفاتاز و فیتاز را در شرایط محدودیت فسفات دارند (Ameen et al., 2017). در این پژوهش قابلیت تولید آنزیم فسفاتاز با ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی در محیط پایکوفسکی (شکل ۲-B) مشاهده شد که حضور کلاسترهای ژنی مرتبط با متابولیسم فسفر، در جدایه JPS19 این توانایی را تأیید نمود. دومین مؤلفه در گزینش یک عامل بیوکنترل، داشتن قابلیت مهار عامل بیمارگر به‌عنوان آنتاگونیست می‌باشد که با استناد به نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای و همچنین پیش‌بینی پروتئین و محصول ژن‌های دخیل در آن می‌توان به این مهم دست یافت. با توجه به این‌که تشکیل هاله بازدارنده بین پرگنه قارچ و عامل بیوکنترل در آزمایشگاه منعکس‌کننده فعالیت ترشحات خارج سلولی آنتاگونیست علیه عامل بیمارگر بوده و قطر هاله بازدارندگی و همچنین ممانعت از رشد پرگنه قارچ در آزمون ترکیبات فرار ضدقارچی نیز به‌عنوان مقیاسی برای انتخاب جدایه برتر بیوکنترل می‌باشد، باید در نظر داشت که صرف انجام آزمون‌های آزمایشگاهی نمی‌توان سویه‌ای را به‌عنوان عامل بیوکنترل معرفی نمود. باکتری *Bacillus velezensis* JPS19 علاوه بر بررسی‌های آزمایشگاهی، در آزمون‌های گلخانه‌ای نیز اثر ممانعت‌کنندگی بالایی در رشد قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* نشان داد که دلیلی بر اثبات توانمندی بالای این جدایه در کنترل بیماری می‌باشد. در بررسی چارچوب‌های خوانش باز و پیش‌بینی‌های پروتئینی انجام شده توسط نرم‌افزار Prodigal و همچنین تفسیر مسیرهای متابولیسمی و یافتن قلمروهای پروتئینی<sup>۱</sup> در پایگاه ژنومی RAST مشخص گردید که سویه JPS19 دارای ظرفیت‌های بسیاری در مهار عوامل بیماری‌زای گیاهی، اعم از تولید سیدروفور، سیانید هیدروژن، لانتی بیوتیک، باسیلایسین و آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتیناز و گلوکوناز می‌باشد که موجب تجزیه دیواره بیمارگر قارچی شده و علاوه بر این باعث

1. Protein domain

ردیابی گردید. Cai *et al.* (2016) با کاربرد نشانگر GFP به همراه سویه *B. velezensis* CC09 ضمن تأکید بر نقش کلونیزاسیون در توانایی بیوکنترل یک سویه باکتری، خاطر نشان کردند که این باکتری نه تنها توانایی تولید بیوفیلم بر سطح ریشه، بلکه توانایی کلونیزاسیون قسمت‌های داخلی ریشه مانند: پوست، استوانه مرکزی و آوندچوبی را نیز دارد. علاوه بر مطالب فوق‌الذکر، مولکول‌های ال-مالیک اسید موجود در ترشحات ریشه گوجه‌فرنگی به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق هیستیدین کیناز KinD شناسایی شده و سبب تحریک تشکیل بیوفیلم روی ریشه گوجه‌فرنگی می‌گردد (Chen *et al.*, 2012b). حسگر این نوع هیستیدین کیناز در مجموعه محصول ژنی تفسیر شده جدایه JPS19 با اندازه ۶۳۶ جفت باز شناسایی گردید که شباهت بسیاری به حسگر هیستیدین کیناز در استرین ۱۶۸ باکتری *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* دارد. (Ameen *et al.*, 2017) نیز ترجیحاً منابع سوکروز، گلوتامین، مالتوز و مالیک اسید استخراج‌شده از ترشحات ریشه گوجه‌فرنگی را به‌عنوان منبع قندی جهت تولید ماتریکس پلی ساکارید خارج سلولی و محرک تولید بیوفیلم سویه *B. velezensis* FZB42 عنوان نمودند. نتایج مطالعات مختلف بر روی این گونه حاکی از توانایی *B. velezensis* در تشکیل بیوفیلم و بلاخص نقش آن در خاصیت افزایش دهنده رشد گیاه میزبان و خصوصیات بیوکنترلی آن می‌باشد (Cai *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2017).

در مجموع با توجه به نتایج عملی و ژنومی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که سویه *B. velezensis* JPS19 این پژوهش دارای پتانسیل زیادی در تولید متابولیت‌های ثانویه ضد میکروبی و عوامل دخیل در افزایش رشد گیاه مانند تولید سیدروفور، اندول استیک اسید و آنزیم‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد که نقش مؤثر و مهمی در مهار عوامل بیماری‌زای گیاهی و افزایش رشد گیاه خواهند داشت. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و همچنین محصول ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های بیوکنترلی در مجموعه ژنی این سویه در مقایسه با سویه‌های تجاری شده باکتری *B. velezensis* مانند: 9912D

سبب افزایش رشد محصولات زراعی می‌گردند (Saha *et al.*, 2016). با استناد به پژوهش‌های انجام شده روی سیدروفورها و نقش آن‌ها در القای مقاومت سیستمیک در گیاه (Fernandez Scavino & Pedraza, 2013)، می‌توان مقاومت سیستمیک (ISR) القاء شده متأثر از تولید سیدروفور را به‌عنوان یکی از احتمالات مهار عامل بیمارگر در نظر گرفت.

پیش‌بینی پروتئین و تفسیر محصولات ژنی نشان داد که این جدایه در مجموعه ژنی خود دارای ژن‌های دخیل در تولید استوئین و بوتانیدیول می‌باشد که پژوهش‌های متعددی استوئین و ۲ و ۳ بوتانیدیول تولید شده توسط باکتری را به‌عنوان عامل القای مقاومت سیستمیک در مقابل بیمارگرهای گیاهی و عامل افزایش رشد گیاهان عنوان کردند (Yi *et al.*, 2016) گزارش‌های متعددی وجود دارد که نشان دادند استوئین باعث القای مسیرهای سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید و متعاقب آن القای مقاومت در گیاه میزبان می‌گردد (Ryu *et al.*, 2003). از دیگر ژن‌های مرتبط با فعالیت‌های ضد قارچی این جدایه، ژن‌های کدکننده آنزیم‌های هیدرولیتیک بتا ۱-۳ و ۱-۴ گلوکاناز می‌باشند که موجب تجزیه دیواره بیمارگر قارچی شده و علاوه بر این باعث برانگیختگی پاسخ‌های دفاعی در گیاهان و متعاقب آن مقاومت‌های بعدی در مقابل آلودگی‌های قارچی و باکتریایی خواهد شد. در مطالعات متعددی به نقش و حضور آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره عوامل بیماری‌زای قارچی در گونه *B. velezensis* اشاره شده است (Xu *et al.*, 2016).

پیش‌شرط اعمال همه مکانیسم‌های فوق‌الذکر، قدرت کلونیزاسیون مؤثر ریشه و دوام باکتری در ریزوسفر و متعاقب آن محافظت گیاه و بروز فعالیت‌های بیوکنترلی مناسب می‌باشد. تشکیل بیوفیلم با کلونیزاسیون ارتباط تنگاتنگی داشته و اولین گام جهت القای فعالیت بیوکنترل می‌باشد (Chen *et al.*, 2012a). تشکیل بیوفیلم توسط ژن‌های تولیدکننده ماتریکس خارج سلولی، که نگهدارنده سلول‌ها در کنار هم می‌باشد کنترل می‌گردد (Chen *et al.*, 2012b). وجود ژن *TasA* که کنترل‌کننده تشکیل بیوفیلم می‌باشد در مجموعه ژنی سویه مورد آزمایش

## سپاسگزاری

از جناب آقای دکتر مهدی ارزنلو که با در اختیار گذاشتن *Fusarium oxysporum* f.sp. قارچ ۰۰۴ استاندارد و همچنین از آقای دکتر جیمز شپلیگ از بخش میکروبیولوژی دانشگاه کرنل به دلیل حمایت مالی جهت تعیین توالی کل ژنوم باکتری *Bacillus velezensis* JPS19 و همکاری در تفسیر داده‌های ژنومی این جدایه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

RC218 و HYEB5-6, FZB42, CC09, BAC03 Meng *et al.*, 2016; Palazzini *et al.*, 2016; Cai *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2017) مویید کارآمد بودن این سویه به‌عنوان یک گونه پروبیوتیک گیاهی مناسب با قدرت بازدارندگی بالای عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی می‌باشد. این اولین گزارش از وجود باکتری *B. velezensis* در ایران می‌باشد.

## REFERENCES

- Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M. S. (2008). Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, (163), 173-181.
- Alström, S. & Burns, R. G. (1989). Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, (7), 2323-238.
- Ameen, A., Davel, J., Krier, F., Béchet, M. & Ongena, M. (2017). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, (10), 1007-1018.
- Amini, K. (2009). Physiological race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Kurdistan Province of Iran and reaction of some tomato cultivars to race 1 of pathogen. *Plant Pathology*, (8), 68-73.
- Aragunde, N. C., Graziano, M. & Lamattia, L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, (218), 900-905.
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B. & Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, (8), 63-73.
- Baker, K. F. & Cook, R. J. (1974). Biological control of plant pathogens. *American Phytopathology Society*. St. Paul, Minn. 433pp.
- BioHPC cloud [computer software]. (2017). BioHPC lab software from <https://biohpc.cornell.edu/lab/lab.aspx>
- Borriss, R., Chen, X.H., Rueckert, C., Blom, J., Becker, A., Baumgarth, B., Fan, B., Pukall, R., Schumann, P., Sproer, C., Junge, H., Vater, J., Puhler, A. & Klenk, H.P. (2011). Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7Tand FZB42T: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International Journal of Systemic and Evolutionary*, (61), 1786-1801.
- Cai, X., Li, H., Xue, Y. & Liu, Ch. (2013). Study of endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 and its antifungal cyclic lipopeptides. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, (1), 1-5.
- Cai, X., Kang, X., Xi, H., Liu, Ch. & Xue, Y. (2016). Complete genome sequence of the endophytic biocontrol strain *Bacillus velezensis* CC09. *Genome Announcements*, 4(5), 1016-1048.
- Cai, X., Liu, Ch., Wang, B. T. & Xue, R. Y. (2017). Genomic and metabolic traits endow *Bacillus velezensis* CC09 with a potential biocontrol agent in control of wheat powdery mildew disease. *Microbiological Research*, (196), 89-94
- Chen, X., Koumoutsi, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G. & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, (25), 1007-1014.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Clardy, J., Kolter, R., Guo, J. & Losick, R. (2012a). Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. *Environmental Microbiology*, (15), 848- 864.
- Chen, Y., Yan, F., Chai, Y., Clardy, J., Losick, R. & Guo, J. (2012b). A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the root of tomato plant. *Molecular Microbiology*, (85), 418-430.
- Dunlap, C., Kim, S., Kwon, S. & Rooney, A. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systemic Evolutionary Microbiology*, (66), 1212-1217.

17. Fernandez Scavino, A. & Pedraza, R.O. (2013). The role of siderophores in plant growth-promoting bacteria. *Bacteria in Agrobiology: Crop Productivity*, 265-285.
18. Fiddaman, P. J. & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, (74), 395-405.
19. Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J. & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, (285), 44-55.
20. Gutiérrez-Luna, F. M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., Homero, R. C. & Macías-Rodríguez, L. (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*, 51, 75-83.
21. Hagedorn, C., Gould, W. D. & Bardinelli, T. R. (1989). Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, (55), 2793-2797.
22. Hampton, J. G. & Tekrony, D. M. (1995). Handbook of vigour test methods. *International. Seed Testing Association*, Zurich, Switzerland.
23. Honda, N., Hirai, M., Ano, T. & Shoda, M. (1998). Antifungal effect of a heterotrophic nitrifier *Alcaligenes faecalis*. *Biotechnology Letters*, (20) 703-705.
24. Kamal, A., Elyousr, A. & Mohamed, H. M. (2009). Biological control of Fusarium wilt in tomato by Plant Growth Promoting Yeast and Rhizobacteria. *Plant Pathology Journal*, 25(2), 199-204.
25. Kang, X., Zhang, W., Cai, X., Zhu, T., Xue, Y. & Liu, Ch. (2018). *Bacillus velezensis* CC09: A Potential 'Vaccine' for controlling wheat diseases. *Molecular Plant-Microb Interaction*, (31), 623-632.
26. Liu, Z., Budiharjo, A., Wang, P., Shi, H., Fang, J., Borriss, R., Zhang, K. & Huang, X. (2013). The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (97), 10081-10090.
27. Liu, G., Kong, Y., Fan, Y., Geng, D. P. & Sun, M. (2017). Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology*, (249), 20-24.
28. Lorraine, D., Cotter, C. & Paul, R. (2013). The two peptide lantibiotic lacticin 3147 acts synergistically with polymyxin to inhibit gram negative bacteria. *BMC Microbiology*, 13(3), 212-220.
29. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Defago, G. (1995). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology*, (44), 40-50.
30. Meng, Q., Jiang, H. & Hao, J. (2016). Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*, (98), 18-26.
31. Palazzini, H. J., Dunlap, Ch. A., Bowman, M. J. & Chulze, S. N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce Fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, (192), 30-36.
32. Pan, H., Li, L., Q. & Hu, J. Ch. (2017). The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial biological fungicide agent. *Journal of Biotechnology*, (247), 25-28.
33. Patten, C. L. & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole- acetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, (68), 3795-3801.
34. Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus and soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologii*, (17), 362-70.
35. Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Wei, H. X., Pare, P. W. & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Proceeding National Academy of Sciences U.S.A*, (100), 4927-4932.
36. Ryu, C. M., Allen, R., Melo, I. S. & Pare, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. *Planta*, (226), 839-851.
37. Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S. & Tribedi, P. (2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (3), 245-253. (in Farsi)
38. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001). Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria. third edition. *The American phytopathological society*, Minnesota USA.
39. Sharifi, R., Alizadeh, H., Ahmadzade, M. & Rasouli Sadaghiani, M. (2017). Investigation of different methods in siderophore measurement in indigenous fluorescent pseudomonads. *Biological Journal of Microorganism*, 6(21), 97-106.
40. Sharifi, R. & Ryu, M. C. (2018a). Revisiting bacterial volatile-mediated plant growth promotion: lessons from the past and objectives for the future. *Annals of Botany*, (20), 1-10.
41. Sharifi, R. & Ryu, M. C. (2018b). Sniffing bacterial volatile compounds for healthier plants. *Current Opinion in Plant Biology*, (44), 88-97.



42. Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, Ch. J. & Yokota, A. (2007). Reclassification of *Bacillus axarquiensis* Ruiz-García *et al.* 2005 and *Bacillus malacitensis* Ruiz-García *et al.* 2005 as later heterotypic synonyms of *Bacillus Mojavensis* Roberts *et al.* 1994. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, (57), 1663-1667.
43. Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Brucoleri, R., Lee, S. Y., Fischbach, M. A., Muller, R., Wohlleben, W., Breitling, R., Takano, E. & Medema, M. H. (2015). antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genemining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Research*, (43), 237-243.
44. Xu, T., Zhu, T. & Li, Sh. (2016). B-1, 3-1, 4 glucanase gene from *Bacillus velezensis* ZY20 exerts antifungal effect on plant pathogenic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(26), 1-9.
45. Yang, H., Xue, Y., Yu, X. & Liu, C. (2014). Colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 in wheat leaf and its biocontrol effect on powdery mildew disease. *Microbiology China*, 30, (4), 481-488.
46. Yu, X., Ai, C., Xin, L. & Zhou, G. (2011). The siderophore producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, (47), 138-145
47. Zhang, H., Kim, M. S., Krishnamachari, V., Payton, P., Sun, Y., Grimson, M., Farag, M. A., Ryu, C. M., Allen, R., Melo, I. S. & Pare, P. W. (2007). Rhizobacterial volatile emissions regulate auxin homeostasis and cell expansion in Arabidopsis. *Planta*, (226), 839-851.