کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۷، شمارهٔ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۷ (۱۶-۱)
DOI: 10.22059/jbioc.2018.263489.237

ارزیابی اثر بیوپرایمینگ بذر بر کنترل زیستی بیماری لکه برگی گوجه‌فرنگی و فاکتورهای رشدی گیاه

مریم خضری[۱*]، افسانه عباس‌پور انبی[۲] و فرزانه محمدسور[۲]
۱. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۱۶- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۲۳)

چکیده

بیماری لکه برگی باکتریایی گوجه‌فرنگی ناشی از باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* یکی از عوامل مشکل‌ساز مهم برای تولید این محصول در گلخانه و مزرعه است. در این مطالعه، تاثیر سویه‌هایی از ریزوباکتری‌های پروبیوتیک بر شاخص‌های بذر، فاکتورهای رشدی گیاه و کنترل بیولوژیک عامل بیماری لکه برگی سیرینگایی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری‌های بیماری‌زا و پروبیوتیک از مزارع گوجه‌فرنگی استان آذربایجان‌غربی جداسازی شدند. شناسایی ریزوباکتری‌های مفید با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی انجام شد. توانایی ۲۱ سویه ریزوباکتری منتخب از گونه‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* در تولید متابولیت‌های ثانویه با استفاده از روش‌های نقطه‌گذاری سوسپانسیون فیلتر شده و قرار دادن باکتری پروبیوتیک در چاهک ارزیابی شد. همچنین سویه‌ها از نظر تولید آنزیم‌های لیپاز، پروتئاز و پروتئاز قلیایی مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های ریزوباکتری در هر دو روش موجب کاهش رشد باکتری بیماری‌زا در آزمایشگاه شدند و آنزیم‌های هیدرولیتیک توسط کلیه سویه‌ها تولید شدند. برخی از سویه‌های باکتری موجب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای گوجه‌فرنگی شدند. در گلخانه، سویه‌های منتخب باعث افزایش فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی شدند. بیشترین تاثیر در مورد سویه‌های **Pf23** و **Bs11** دیده شد. باکتری‌های پروبیوتیک موجب کاهش بیماری بین ۲۵ و ۸۱/۲۵ درصد نسبت به شاهد شدند. در گلخانه، سویه **Bs11** با ۸۱/۲۵٪ و سویه‌های**Bs6** و **Pf23** با ۶۱/۵۰٪ کاهش بیماری نسبت به شاهد، بیشترین تاثیر را در کاهش لکه‌های ایجاد شده روی برگ نشان دادند. سویه‌های **Bs11** و **Pf23** به عنوان سویه‌های برتر این مطالعه در تاثیر روی فاکتورهای رشدی گیاه و کاهش بیماری لکه‌برگی سیرینگایی گوجه-فرنگی انتخاب شدند.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*، کنترل بیولوژیک، سودوموناس فلورسنت، باسیلوس سابتیلیس.

Evaluation of seed biopriming on tomato leaf spot biocontrol and plant growth factors

Maryam Khezri[1*], Afsaneh Abbaspour Anbi[2], Farzaneh Mohammad Sour[2]
[1.] Assistant professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[2.] Msc. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
(Received: August 7, 2018 - Accepted: October 15, 2018)

ABSTRACT

Tomato bacterial leaf spot caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is a serious problem for tomato production in the greenhouse and field. In this study, effect of some probiotic rhizobacteria evaluated on seed indexes, plant growth factors and biocontrol of syringae leaf spot in the laboratory and greenhouse. All probiotic and pathogenic bacteria isolated from tomato fields in West Azarbaijan. Identification of beneficial rhizobacteria carried out via phenotypic and molecular methods. Ability of 21 selected rhizobacteria of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* strains in secondary metabolites production was investigated via two methods. In first method, filtered suspension spotted on medium, and in second one bacterial cell was poured in wells created on medium. In addition, the strains were studied for lipase, protease and alkaline protease production. In both methods, studied strains reduced the pathogenic bacterial growth in the laboratory, and hydrolytic enzymes produced by all strains. Some of the studied strains increased percentage and speed of tomato seed germination. Selected strains increased the growth factors of tomato plants in greenhouse. The greatest effect was observed in Pf23 and Bs11 strains. The probiotic bacteria reduced the disease between 25 and 81.25% compared to the control. In the greenhouse, Bs11 with 81.25% and Bs6 and Pf23 with 61.50% disease decreasing compared to control, showed the most effect in reducing leaf spots. Bs11 and Pf23 were selected as the best strains in effect on tomato growth factors and biocontrol of syringae leaf spot.

Keywords: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Biological control, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*.

* Corresponding author E-mail: m.khezri@urmia.ac.ir

تازه های تحقیق

در این تحقیق از سویه‌های باکتری‌های پروبیوتیک جداسازی شده از ریزوسفر و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی از مزارع استان آذربایجان غربی جهت کنترل بیولوژیک بیماری لکه برگی سیرینگایی گوجه‌فرنگی که بیماری مهم در منطقه می‌باشد، استفاده شد. سویه‌های مورد بررسی دارای پتانسیل بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه و آنزیم-های هیدرولیتیک بودند. کاربرد سویه‌ها به صورت پرایمینگ بذر موجب افزایش فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی شد. استفاده از سویه‌های منتخب به صورت اسپری روی اندام هوایی گیاه موجب کاهش تعداد و اندازه لکه‌های نکروزه روی برگ‌ها گردید. شدت بیماری بین ۲۵ و ۸۱/۲۵ درصد نسبت به شاهد کاهش نشان داد.

مقدمه

باکتری گرم منفی و میله‌ای شکل *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall 1902 (Pss)، از باکتری‌های مهم همراه گیاه است که موجب بیماری‌های مختلفی در گیاهان دولپه و تک‌لپه می‌شود. سویه‌های این باکتری به بیش از ۱۸۰ گونه گیاهی در جنس‌های مختلف حمله کرده و بیماری‌های مهمی مانند شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار، بلاست مرکبات، بلایت برگی گندم و جو، نوار قرمز نیشکر و لکه قهوه‌ای لوبیا را ایجاد می-نمایند (Bultreys and Kaluzna 2010, Kaluzna *et al.* 2010, Khezri *et al.* 2010, Dariush *et al.* 2012).

باکتری Pss در گیاه گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.)، موجب بیماری لکه‌برگی سیرینگایی می‌شود. این باکتری در مراحل اولیه رشد گیاه وارد عمل شده و در شرایط محیطی مساعد، موجب بروز خسارات اقتصادی قابل توجه در این محصول پرمصرف می‌گردد (Jones *et al.* 1991). علایم اولیه بیماری به صورت لکه‌های ۳-۲ میلی‌متری آبسوخته روی ساقه و دمبرگ است که می‌توانند به زخم‌های قهوه‌ای تا سیاه با قطر یک سانتی‌متر تبدیل شوند. گاهی اوقات زخم‌ها از ساقه و دمبرگ به برگ‌ها توسعه پیدا کرده، موجب پژمردگی و در نهایت مرگ گیاه در طول چند روز می‌گردند (Garibaldi *et al.* 2007). دمای بهینه توسعه بیماری بین ۲۰-۱۵ درجه سلسیوس بوده و بیماری در این طیف دمایی به شدت افزایش می‌یابد ولی دمای سی درجه سلسیوس موجب کاهش بیماری می-شود. وجود زخم و رطوبت نسبی بالا در دمای مناسب، از عوامل اصلی موثر در توسعه و افزایش شدت بیماری هستند (Gullino *et al.* 2009).

از آنجایی که بیماری‌های باکتریایی گوجه‌فرنگی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول پرمصرف در مناطق کشت آن می‌باشند و خسارات کمی و کیفی حاصل از آن‌ها در برخی سال‌ها موجب رها نمودن مزارع می‌گردد، مدیریت این بیماری‌ها با در نظر گرفتن کمترین آسیب به اکوسیستم‌های کشاورزی و منابع طبیعی ضروری به‌نظر می‌رسد. در سال‌های اخیر، استفاده از عوامل میکروبی پروبیوتیک که قابلیت‌های بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه دارند و از طرق مختلف موجب کنترل یا کاهش بیماری می‌شوند، مورد توجه محققان دوستدار سلامت طبیعت قرار گرفته است. استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید همراه گیاه جهت کنترل‌زیستی بیماری‌های گیاهی و افزایش فاکتورهای رشدی گیاهان، به‌عنوان جایگزینی مناسب برای سموم و کودهای شیمیایی مطرح است. افزایش تقاضا برای مصرف مواد غذایی سالم و ارگانیک، تمایل به استفاده از این عوامل کم‌خطر و فرآورده‌های تولید شده توسط آن‌ها را افزایش داده است (Raza *et al.* 2016).

بررسی فاکتورهای رشدی، معیار مناسبی در سنجش سلامت و توان گیاه می‌باشد. یکی از عواملی که موجب افزایش رشد و ارتقا سلامت گیاهان می‌شود، کودهای بیولوژیک می‌باشند. کودهای بیولوژیک که معمولا حاوی باکتری‌هایی از جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Serratia*، *Azosprillium* و *Enerobacter* هستند، قادرند عناصر مورد نیاز گیاه را از فرم غیرقابل دسترس به شکل قابل استفاده تبدیل نموده و با قرار دادن آن‌ها در اختیار گیاه، موجب رشد و تقویت گیاه شوند (Khezri 2017, Gouda *et al.* 2018). از ویژگی‌های مهم این عوامل میکروبی می‌توان به تولید فرآورده‌های زیستی متعدد، سرعت بالای رشد و تحصیل نواحی مناسب جهت کلنیزه نمودن گیاه که لازمه موفقیت در رقابت با سایر عوامل میکروبی خاک است، اشاره نمود (Saraf *et al.* 2014). در واقع باکتری‌های PGPR، باکتری‌های همراه گیاه هستند که به‌طور مستقیم و غیرمستقیم موجب افزایش رشد گیاهان می‌شوند. از مهم‌ترین راهکارهای این باکتری‌ها می-

توان به تثبیت نیتروژن، افزایش حلالیت فسفر و افزایش رشد گیاه با تنظیم و تغییر تولید هورمون‌های اکسین، سیتوکینین، جیبرلین و آبسزیک‌اسید اشاره نمود (Ahmadzadeh 2013, Ahemad and Kibret 2014, Panwar *et al.* 2014). درک تعاملات ریزوباکتری‌ها با گیاهان و نقش میکروارگانیسم‌ها در چرخه زندگی گیاهان، در رسیدن به اهداف کشاورزی پایدار اهمیت زیادی دارد. به همین دلیل مطالعات مرتبط با روابط موجود بین ریزوباکتری‌ها و گیاهان به سرعت در حال افزایش است (Szentes *et al.* 2013).

میکروارگانیسم‌های مختلفی از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها به‌عنوان عوامل کنترل‌زیستی و افزایش‌دهنده رشد گیاه معرفی شده‌اند که مهم‌ترین آن‌ها در جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Streptomyces* و *Trichoderma* قرار دارند (Ahmadzadeh 2013, Szentes *et al.* 2013). از بین عوامل کنترل‌زیستی باکتریایی، گونه‌هایی از جنس *Pseudomonas* شامل *P. putida*، *P. chlororaphis*، *P. aeruginosa*، *P. aureofaciens* و بویژه *P. fluorescens* از نظر تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف از قبیل انواع آنتی‌بیوتیک، آنزیم‌های تجزیه‌کننده هیدرولیتیک، سیدروفور و متابولیت‌های فرار مانند سیانیدهیدروژن از اهمیت بالایی برخوردارند. القا مقاومت سیستمیک در گیاهان، همچنین رقابت موفق برای به‌دست آوردن مواد غذایی و مکان‌های مناسب جهت کلنیزه نمودن ریشه، توسط سویه‌های مختلف *P. fluorescens* گزارش شده است (Ahmadzadeh 2013, Murthy *et al.* 2014, Sun *et al.* 2017). مطالعات متعددی کاهش خسارات ناشی از قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر گیاهی مانند *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*، *F. graminearum*، *P. syringae* pv. *tomato*، *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* و *Ralstonia solanacearum* توسط سویه‌های مختلف این باکتری را نشان می‌دهد (Weller *et al.* 2012, Lingaiah and Umesha 2013, Szentes *et al.* 2013, Raza *et al.* 2016, Shahbazi *et al.* 2016).

گونه‌های مختلفی از جنس باسیلوس مانند *B. subtilis*، *B. cereus*، *B. licheniformis* و *B. thuringiensis* به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک موفق معرفی شده‌اند (Fousia *et al.* 2016, Shafi *et al.* 2017). گونه *B. subtilis* از ریزوسفر بیشتر گیاهان قابل جداسازی است. این باکتری با داشتن انواع متابولیت‌های ثانویه از جمله طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها و بیوسورفکتانت‌ها به‌عنوان یکی از عوامل برتر در کنترل‌زیستی بیماری‌های گیاهی مطرح می‌باشد. سویه‌های مختلف این باکتری موجب افزایش رشد گیاه شده و بسیاری از بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط قارچ‌ها و باکتری‌ها را کنترل می‌نماید. علاوه بر تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف، القا مقاومت در گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا از دیگر قابلیت‌های سویه‌های مختلف این باکتری است (Ongena *et al.* 2007, Fousia *et al.* 2016, Ardalan *et al.* 2017, Wang *et al.* 2018).

این پژوهش با هدف بررسی پتانسیل ریزوباکتری‌های پروبیوتیک جداسازی شده از ریزوسفر و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در استان آذربایجان‌غربی در کاهش شدت بیماری لکه‌برگی سیرینگایی گوجه‌فرنگی در آزمایشگاه و گلخانه انجام شد. همچنین تاثیر این ریزوباکتری‌ها بر شاخص‌های بذر و فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به بیماری، در مقایسه با شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی، شناسایی فنوتیپی و مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک

تعداد ۱۴۲ جدایه ریزوباکتری از خاک ریزوسفر و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی فاقد علایم بیماری از استان آذربایجان‌غربی در طی سال‌های ۹۶-۱۳۹۴ جداسازی شدند. غربال‌گری اولیه با در نظر گرفتن ممانعت از رشد باکتری بیماری‌زای Pss با روش نشت متابولیت‌های ثانویه در آگار انجام شد. تعداد ۲۱ سویه ریزوباکتری پروبیوتیک منتخب در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی این سویه‌ها بر اساس کلیدهای معتبر شناسایی باکتری‌های گیاهی انجام شد (Schaad *et al.* 2001, Lelliot and Stead 1987).

جهت شناسایی مولکولی سویه‌ها، دی‌ان‌آ ژنومی باکتری‌ها با روش لوپ و همکاران استخراج شد (Llop

et al. 1999). تکثیر ژن 16S rRNA در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای عمومی (-5' fD1 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و (-5' rP2 (ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' انجام شد (Weisburg *et al.* 1991). مخلوط واکنش PCR در ۲۵ میکرولیتر تهیه شد. این مخلوط حاوی دوازده میکرولیتر PCR Master Mix Red - $Mgcl_2$:1.5 mM (Ampliqon) 180301-50، ده پیکومول از هر آغازگر، صد نانوگرم دی‌ان‌آ ژنومی باکتری و آب مقطر سترون بود. تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت‌بازی با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Gradient Palm Cycler ^{TM}، ساخت شرکت Corbett Life Science کشور استرالیا) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله حرارتی °C ۹۴ به‌مدت سی دقیقه، سپس یک برنامه ۳۵ چرخه‌ای که هر چرخه شامل سه مرحله به‌ترتیب °C ۹۴ به‌مدت چهل ثانیه، °C ۶۲ به‌مدت یک دقیقه و °C ۷۲ به‌مدت ۱/۵ دقیقه و در پایان یک مرحله برای بسط نهایی با دمای °C ۷۲ به‌مدت ده دقیقه بود. بررسی محصول PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و رنگ‌آمیزی ژل انجام شد. تعیین ترادف محصول PCR با ارسال قطعه تکثیر شده و آغازگرهای استفاده شده توسط شرکت ماکروژن کره‌جنوبی انجام شد. تجزیه و تحلیل مولکولی توالی‌ها با جستجو در پایگاه اطلاعاتی NCBI و استفاده از نرم‌افزار CLC MainWorkbench8 انجام شد.

دو سویه باکتری بیمارگر Pss مورد استفاده در این پژوهش، در تابستان ۱۳۹۵ از مزارع گوجه‌فرنگی اشنویه، واقع در استان آذربایجان‌غربی جداسازی شدند. این دو سویه، پس از اثبات بیماری‌زایی با استفاده از روش‌های فنوتیپی و مولکولی شناسایی شدند.

شرایط رشد و نگه‌داری سویه‌های باکتری

از باکتری‌های کشت شده روی محیط جامد نوترینت آگار (NA) در تشتک پتری یا درون محیط مایع لوریا برتانی براث (LB) در °C ۲۷، برای آزمایش‌های جاری استفاده شد. نگهداری طولانی مدت سویه‌ها، با استفاده از محلول سترون گلیسرول ۲۵٪ (v/v) در محیط مایع LB انجام شد. نمونه‌ها در فریزر °C ۲۰- نگهداری گردیدند.

ردیابی فعالیت ضدباکتریایی ریزوباکتری مفید در آزمایشگاه

به‌منظور بررسی اثرات آنتاگونیستی ریزوباکتری‌ها از دو روش استفاده شد. در روش اول، ریزوباکتری‌ها در محیط مایع نوترینت براث (NB) به‌مدت یک هجده هشت ساعت روی شیکر با سرعت ۱۵۰ rpm در دمای سی درجه سلسیوس رشد داده شدند. سپس به‌مدت ده دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. به منظور حذف کامل سلول‌های باکتری، محلول رویی از فیلتر ۰/۲۲ میکرونی عبور داده شد. سویه‌های باکتری بیمارگر نیز به مدت هجده ساعت با شرایط ذکر شده، در محیط NB رشد داده شدند. مقدار یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون $CFUml^{-1}$ $۱×۱۰^۶$ باکتری‌های بیمارگر روی محیط جامد NA پخش شد. پس از پنج دقیقه، سوسپانسیون اضافه حذف شد و تشتک‌های پتری به مدت ده دقیقه خشک شدند. مقدار ده میکرولیتر از محلول فاقد باکتری فیلتر شده، روی محیط کشت نقطه‌گذاری شد. پس از ۴۸ ساعت بر اساس هاله روشن ایجاد شده، میزان بازدارندگی از رشد باکتری بیمارگر تعیین شد. از دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (ده میکروگرم) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Mezaini *et al.* 2009).

در روش دوم، میزان توان کنترل‌زیستی باکتری-های آنتاگونیست با روش نشت متابولیت‌های ثانویه در آگار ارزیابی شد. برای این منظور، مقدار یکصد میکرولیتر سوسپانسیون $CFUml^{-1}$ $۱×۱۰^۶$ باکتری بیماری‌زا روی محیط NA حاوی ۰/۷۵٪ آگار پخش شد. چاهک‌هایی به فاصله دو سانتی‌متر روی محیط کشت ایجاد شد. درون چاهک‌ها یکصد میکرولیتر سوسپانسیون $CFUml^{-1}$ $۱×۱۰^۹$ باکتری‌های مفید ریخته شد و پس از دو روز قطر هاله بازدارنده از رشد اندازه‌گیری شد (El-Hendawy *et al.* 2005).

تولید آنزیم لیپاز

جهت تعیین قابلیت تولید آنزیم لیپاز توسط سویه‌های مورد بررسی از محیط کشت لیپاز (پپتون ده گرم، کلرید سدیم پنج گرم، کلرید کلسیم ۰/۱ گرم، آگار

پانزده گرم، توپین۸۰ به میزان ۲٪ در یک لیتر آب) استفاده شد. سویه‌های باکتری به صورت خطی روی محیط آزمون لیپاز کشت گردیدند. تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ ساعت در دمای °C ۲۷ نگه‌داری شدند. سپس سویه‌ها از نظر وجود یا عدم وجود رسوب کدر در اطراف پرگنه باکتری ارزیابی شدند (Schaad *et al.* 2001).

تولید آنزیم پروتئاز

تولید آنزیم پروتئاز توسط سویه‌های ریزوباکتری پروبیوتیک در محیط SMA (پودر شیر بدون چربی۱٪، سدیم آزاید ۰/۰۲٪ و آگار ۲٪) بررسی شد. در این آزمون، کلیه سویه‌ها در محیط NB به مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۳۷ روی شیکر با دور rpm ۱۸۰ رشد داده شدند. سپس سلول‌های باکتری با سانتریفوژ rpm ۱۰۰۰۰ به مدت پنج دقیقه در °C چهار رسوب داده شدند. محلول رویی به‌عنوان محلول حاوی آنزیم پروتئاز برداشت شد و پنج میکرولیتر از آن روی محیط SMA نقطه‌گذاری شد. تشتک‌های پتری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای °C ۲۷ نگهداری شدند. تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف پرگنه باکتری به‌عنوان فعالیت آنزیم پروتئاز در نظر گرفته شد (Chantawannakul *et al.* 2002).

تولید آنزیم پروتئاز قلیایی

قابلیت تولید آنزیم پروتئاز قلیایی در ریزوباکتری‌های مورد مطالعه با استفاده از محیط مربوطه (پپتون دو گرم، عصاره مخمر پنج گرم، گلوکز یک گرم، فسفات دی پتاسیم ۰/۲ گرم، کربنات سدیم بیست گرم، آگار پانزده گرم در یک لیتر آب) انجام شد. پرگنه باکتری روی محیط نقطه‌گذاری شد. پس از ۴۸ ساعت تشتک‌های پتری از نظر تولید هاله روشن اطراف پرگنه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند (Schaad *et al.* 2001).

تاثیر ریزوباکتری‌ها بر شاخص‌های بذر

پس از تعیین قوه نامیه بذر گوجه‌فرنگی، تاثیر ریزوباکتری‌های مورد مطالعه بر دو شاخص درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی بذر در آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت تعیین قوه نامیه بذر، ضدعفونی سطحی دویست بذر گوجه‌فرنگی رقم Early urbana Y با استفاده از هیپوکلریت سدیم سه درصد به‌مدت ده دقیقه انجام شد. پس از چهار بار شستشوی بذرها با آب مقطر سترون، تعداد پنجاه بذر روی کاغذ صافی سترون مرطوب درون تشتک پتری قرار داده شد. تشتک‌های پتری به‌مدت ده روز در دمای °C ۲۵ نگهداری شد. شمارش بذرهای جوانه‌زده از روز دوم تا دهم انجام گردید. با شمارش بذرهای جوانه‌زده در روزهای مختلف، شاخص‌های درصد جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی بررسی شدند (ISTA 2003). جهت تعیین تاثیر سویه‌های باکتری مفید روی درصد جوانه‌زنی بذر از دویست بذر استفاده شد. در هر تشتک پتری تعداد پنجاه بذر روی محیط آب آگار قرار داده شد. پس از ده روز، تعداد بذرهای جوانه‌زده شاهد و بیوپرایم شده با ریزوباکتری‌ها شمارش شدند. درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرها با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Gupta 2005, Naik and Sreenivasa 2009).

۱۰۰× کل بذر/تعداد بذر جوانه‌زده= درصد جوانه‌زنی بذر

سرعت جوانه‌زنی بذر = $E_1/N_1+E_2/N_2+……+E_n/N_n$

E_n: تعداد گیاهچه‌های سبز شده در n_{th} شمارش روزانه

N: شماره روز

بیوپرایمینگ بذر و محلول‌پاشی اندام هوایی گوجه‌فرنگی با ریزوباکتری‌ها

تعداد هفت ریزوباکتری پروبیوتیک از هر دو گونه مورد آزمایش، با توان متفاوت در کنترل‌زیستی باکتری‌های بیمارگر در آزمایشگاه، جهت انجام بررسی‌های گلخانه-ای انتخاب شدند (شکل ۳). سویه‌های باکتری به‌مدت هجده ساعت در محیط NB در دمای سی درجه سلسیوس روی شیکر با rpm ۱۵۰ رشد داده شدند. جهت جمع‌آوری سلول‌های باکتری، سانتریفیوژ rpm ۶۰۰۰ به‌مدت ده دقیقه انجام شد. سوسپانسیون $CFUml^{-1}$ $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$ سلول‌های باکتری در محلول یک درصد متیل سلولز تهیه شد. ضدعفونی سطحی بذرهای گوجه‌فرنگی رقم Early urbana Y با هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت سه دقیقه انجام شد. سپس بذرها سه بار با آب مقطر سترون کاملا شستشو شدند و به-مدت دو ساعت در محلول یک درصد متیل سلولز

حاوی سلول‌های باکتری قرار داده شدند. بذرهای پرایمینگ شده به‌مدت دوازده ساعت در جریان هوای سترون زیر هود، کاملا خشک شدند و جهت آزمایش-های گلخانه‌ای استفاده گردیدند (Kempf and Wolf 1989).

چهار هفته پس از کشت، محلول‌پاشی اندام هوایی بوته‌های گوجه‌فرنگی با سوسپانسیون 1×10^{8} CFUml^{-1} سویه‌های ریزوباکتری مفید در بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH: 7.0)، جهت بررسی کاهش بیماری توسط ریزوباکتری‌ها انجام شد. سوسپانسیون باکتری بر سطح رویی و زیرین برگ و بخش‌های مختلف اندام هوایی اسپری شد، طوری که تمام بخش‌ها به خوبی با سوسپانسیون باکتری مفید پوشش داده شدند. جهت حفظ رطوبت، بوته‌ها به‌مدت بیست و چهار ساعت زیر پوشش پلاستیکی نگهداری شدند (Wilson *et al.* 2002).

کنترل‌زیستی بیماری توسط ریزوباکتری‌های پروبیوتیک منتخب

آلوده‌سازی بوته‌های گوجه‌فرنگی در مرحله ۵-۴ برگی، با خراش دادن سطح برگ با استفاده از پودر کاربوراندوم و اسپری سوسپانسیون 1×10^{5} CFUml^{-1} باکتری بیماری‌زا روی اندام هوایی انجام شد. پس از چهارده روز تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست، که ۲۴ ساعت قبل از تلقیح باکتری بیماری‌زا طبق روش توصیف شده در بخش بیوپرایمینگ روی گیاه اسپری شده بودند، در کاهش بیماری نسبت به تیمار شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. شدت بیماری با استفاده از شاخص صفر تا ۴ به صورت زیر انجام شد. صفر) بدون زخم و نکروز، ۱) ۱-۳ درصد لکه نکروزه در سطح برگ، ۲) ۳-۶ درصد لکه نکروزه در سطح برگ، ۳) ۶-۱۲ درصد لکه نکروزه در سطح برگ و ۴) بیش از دوازده درصد لکه نکروزه در سطح برگ (Lawson and Summers 1984). درصد کنترل‌بیماری توسط ریزوباکتری‌های مورد استفاده، با در نظر گرفتن شاخص بیماری ایجاد شده روی بوته‌های گوجه‌فرنگی و کسر نمودن درصد بیماری از عدد یکصد محاسبه شد.

بررسی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی

فاکتورهای رشدی شامل طول، وزن تر و وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی تلقیح شده با باکتری عامل بیماری و ریزوباکتری‌های پروبیوتیک، ۳۵ روز پس از کاشت بذرهای بیوپرایم شده مورد ارزیابی قرار گرفت. گیاهچه‌ها به آرامی از بستر خاک خارج و ریشه‌ها توسط آب روان شستشو شدند. جهت اندازه‌گیری طول اندام هوایی، از محل طوقه تا انتهای گیاهچه و جهت اندازه‌گیری طول ریشه از طوقه تا انتهای بلندترین ریشه در نظر گرفته شد. پس از اندازه‌گیری وزن تر ریشه و اندام هوایی، نمونه‌ها تا زمان تثبیت شدن وزن خشک، در آون با دمای هفتاد درجه سلسیوس قرار داده شدند، سپس توزین گردیدند (Al-Amri 2013, Farghaly and Nafady 2015).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شد. گروه‌بندی تیمارها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش توکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS (version 23) انجام شد. همبستگی بین صفات مطالعه شده در آزمایشگاه و گلخانه با استفاده از ضریب همبستگی پیرسون مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

این مطالعه با هدف ارزیابی توان کنترل بیولوژیک بیماری لکه‌برگی سیرینگایی گوجه‌فرنگی توسط ۲۱ سویه باکتری پروبیوتیک جداسازی شده از ریزوسفر و ریشه گیاهان گوجه‌فرنگی سالم و فاقد هرگونه علایم بیماری در استان آذربایجان‌غربی انجام شد.

مطالعات آزمایشگاهی

پس از جداسازی و انتخاب ۲۱ سویه با توان کنترل بیولوژیک عامل بیماری‌زا در آزمایشگاه، خالص‌سازی سویه‌ها در سه مرحله انجام شد. شناسایی فنوتیپی باکتری‌های پروبیوتیک بر اساس آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی موجود در متون معتبر باکتری‌شناسی انجام شد. باکتری‌های منتخب در دو گروه سویه‌های گرم منفی و سویه‌های

گرم مثبت قرار گرفتند. باکتری‌های گرم منفی، میله‌ای شکل، هوازی اجباری، تولیدکننده رنگدانه پایووردین روی محیط کینگ‌ب، اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند. این سویه‌ها قادر به تولید گاز از گلوکز و تولید اندول نبودند اما گلوکز، مالات، سوربیتول و سیترات را مصرف نمودند. آزمون‌های احیای نیترات، اورآز، متیل‌رد منفی ولی آزمون هیدرولیز ژلاتین مثبت بود. سویه‌ها در برخی آزمون‌ها مانند بتا-گلوکوزیداز، آرژنین دهیدرولاز و مصرف برخی قندها نتایج متغیر داشتند (جدول ۱).

باکتری‌های گرم مثبت، باسیلوسی‌شکل، هوازی اجباری، متحرک و تولیدکننده اندوسپور در مرکز سلول بودند. این سویه‌ها قادر به رشد در دمای چهل درجه سلسیوس بودند و در آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، احیاء نیترات، مصرف سیترات، لستیناز و رشد در چهل درجه سلسیوس مثبت بودند. همه سویه‌ها قادر به رشد در محیط حاوی کلرید سدیم پنج و هفت درصد بودند، همچنین روی محیط با اسیدیته ۵/۷ و ۶/۸ رشد نمودند. ویژگی‌های فنوتیپی سویه‌های مورد بررسی، در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی سویه‌های باکتری پروبیوتیک استفاده شده در این پژوهش.

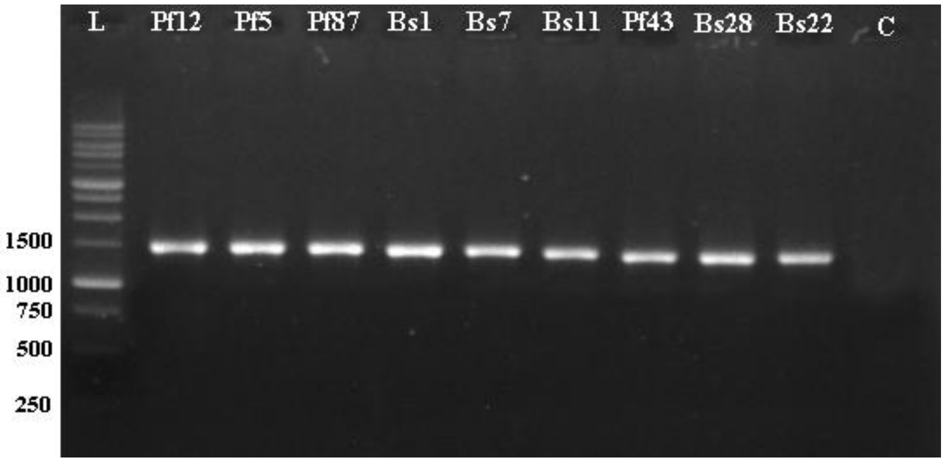
Table 1- *Phenotypic characteristics* of probiotic bacteria used in this study.

Phenotypic traits	Gram-negative strains	Gram-positive strains	Phenotypic traits	Gram-negative strains	Gram-positive strains
Cell morphology	Rod-shaped	Bacilli form	Starch hydrolysis	-	-
Aerobic growth	+	+	5% NaCl tolerance	+	+
Anaerobic growth	-	-	7% NaCl tolerance	-	+
Endospore production	N	+ (Central)	Nitrate reduction	-	-
Hypersensitive reaction	-	-	Lecithinase	+	+
Motility	+	+	3- *Keto* lactose formation	-	+
Fluorescent pigment on KB	+	N	Urease	-	N
Oxidase	+	+	Methyl red	-	N
Catalase	+	+	Utilization of:	-	+
Growth at 4 °C	-	-	Citrate	+	+
Growth at 40 °C	-	+	Sorbitol	+	+
Indole	-	N	D- Glucose	+	+
Gas from glucose	-	N	D- Arabinose	V	+
Gelatin hydrolysis	+	+	D- Xylose	+	+
Aesculin hydrolysis	V	N	D- Manitol	V	+
Casein Hydrolysis	N	+	D- Mannose	V	V

-: نتایج آزمون در۸۰٪ سویه‌ها منفی بود. +: نتایج آزمون در ۸۰٪ سویه‌ها مثبت بود. N: این آزمون برای سویه‌های این ستون انجام نشد. V: نتایج این آزمون در سویه‌های مورد بررسی متغیر بود.

-: Results of the experiment was negative for 80% of strains. +: Results of the experiment was positive for 80% of strains. N: This test has not been conducted for strains of this column. V: Results of the experiment was variable in studied strains.

جهت شناسایی ژنوتیپی سویه‌های مورد مطالعه، از تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی استفاده شد. همه سویه‌ها قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی را تکثیر کردند (شکل ۱). قطعه تکثیر شده هر سویه باکتری توالی‌یابی شد. توالی‌ها در برنامه BLAST با سایر توالی-های ثبت شده در پایگاه اطلاعات ژنومی NCBI مقایسه شدند. توالی‌های ژن 16S rRNA در باکتری‌های گرم منفی بین ۹۹ تا ۱۰۰ درصد با توالی‌های ثبت شده باکتری *P. fluorescens* از سایر نقاط دنیا مشابهت نشان دادند. با توجه به نتایج بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، این سویه‌ها به‌عنوان باکتری *P. fluorescens* شناسایی شدند. در مورد باکتری‌های گرم مثبت نیز همین فرایند انجام شد و توالی قطعات تکثیر شده، صد درصد با توالی‌های ثبت شده باکتری *B. subtilis* در پایگاه اطلاعاتی NCBI شباهت نشان دادند. این سویه‌ها نیز با توجه به نتایج آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی به‌عنوان باکتری *B. subtilis* شناسایی شدند (جدول ۱).

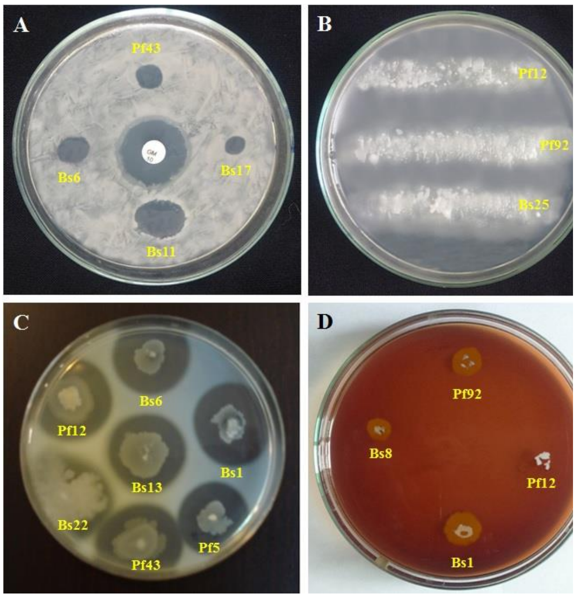


شکل ۱- قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی تکثیر شده ناحیه 16S rRNA توسط سویه‌های ریزوباکتری مورد مطالعه در واکنش زنجیره‌ای پلی- مراز. L) مارکر نردبانی 1Kb، Pf) *Pseudomonas fluorescens*، Bs) *Bacillus subtilis* و C) کنترل منفی.

Figure 1- Amplified fragments of 1500 pb related to 16S rRNA region by studied rhizobacteria via PCR. L) 1 Kb Ladder, Pf) *Pseudomonas fluorescens*, Bs) *Bacillus subtilis* and C) negative control.

جهت غربالگری اولیه، توان تولید متابولیت‌های ثانویه سویه‌های ریزوباکتری مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی ایجاد هاله بازدارنده از رشد باکتری بیمارگر، به دو روش نقطه‌گذاری محیط کشت تلقیح شده با سوسپانسیون حاوی متابولیت‌های ثانویه و نشت متابولیت‌ها در آگار انجام شد (شکل ۲A). در این دو آزمون، دیسک آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (ده میکروگرم)، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج آزمون نقطه‌گذاری سوسپانسیون فیلتر شده حاوی متابولیت‌های ثانویه نشان داد، همه سویه‌های مورد بررسی توان تولید متابولیت‌های ثانویه بازدارنده رشد باکتری را داشتند. باکتری‌های مورد بررسی در ایجاد هاله بازدارنده تنوع بالایی نشان دادند و از نظر آماری در یازده گروه قرار گرفتند. بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد مشاهده شد. قطر هاله بازدارنده ایجاد شده بین ۲/۵ و ۲۳ میلی‌متر متغیر بود. بیشترین تاثیر مربوط به سویه‌های Bs11، Bs1 و Bs25 به ترتیب با هاله ۲۳، ۲۰ و ۱۴ میلی‌متری و کمترین اثر بازدارندگی مربوط به Bs13، Pf14 و Bs7 با ۲/۵، ۳ و ۳ میلی‌متر هاله بازدارنده بود (جدول ۲). در روش دوم، سویه‌های Bs11، Bs1، Bs6 و Pf92 به ترتیب با ایجاد هاله ۱۶، ۱۳، ۱۰ و ۱۰ میلی‌متر بیشترین تاثیر را در کاهش رشد باکتری بیمارگر نشان دادند. کمترین تاثیر مربوط به باکتری‌های Pf12، Pf14 و Bs7 با ۱/۲، ۱/۵ و ۱/۵ میلی‌متر هاله بازدارنده بود (جدول ۲). بین نتایج حاصل از این دو روش همخوانی وجود داشت، بطوری‌که سویه‌هایی مانند Bs1 و Bs11 بیشترین ممانعت از رشد باکتری‌های بیمارگر را نشان دادند و سویه Pf14 و Bs13 در هر دو روش عملکرد ضعیفی داشتند. بازدارندگی از رشد باکتری‌های بیماری‌زا توسط باکتری‌های پروبیوتیک در روش نقطه‌گذاری، که فقط متابولیت‌های ثانویه مورد استفاده قرار گرفت، بیشتر بود. توان تولید متابولیت‌های ثانویه بویژه آنتی‌بیوتیک‌ها و بیوسوفکتانت‌ها که معمولا در ارتقای ویژگی‌های بیوکنترلی موثر هستند، به‌عنوان ابزار مفیدی در غربالگری اولیه کاربرد دارد. نتایج مطالعات مختلف بیانگر تولید این ترکیبات توسط گونه‌های مختلف سودوموناس و باسیلوس می‌باشند (Daes *et al.* 2010). در مطالعه‌ای که با هدف جداسازی عوامل آنتاگونیست باکتری *P. viridiflava*، عامل پوسیدگی میوه خیار، از فیلوسفر بوته‌های سالم خیار انجام شد آزمون نشت متابولیت‌های ثانویه در آگار به خوبی موجب تفکیک باکتری‌های آنتاگونیست *P. fluorescens* که پتانسیل بالایی در تولید سیدروفور داشتند، از سایر باکتری‌های مورد بررسی شد (Al-Karablieh *et al.* 2017). تولید آنزیم لیپاز توسط ریزوباکتری‌ها، از دیگر ویژگی‌های مورد بررسی در این پژوهش بود (شکل ۲B). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، همه سویه‌ها قادر به تولید

آنزیم لیپاز بودند. سویه‌های Bs11، Bs1 و Bs25 با تولید هاله کدر به قطر سیزده، ده و ده میلی‌متری بیشترین آنزیم لیپاز را تولید نمودند. کمترین مقدار مربوط به سویه‌های Pf12 و Pf43 بود (جدول ۲). پروتئاز یکی دیگر از آنزیم‌های مهم تجزیه‌کننده است که توسط برخی از عوامل کنترل بیولوژیک تولید و ترشح می‌گردد. آنزیم‌های پروتئاز و پروتئاز قلیایی که کاربردهای زیادی در صنعت و کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دارند، توسط گونه‌های مختلف باسیلوس تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها مقاومت بالایی در برابر تغییرات pH، دمای بالا، مواد شوینده و اکسیدکننده‌ها دارند (Contesini *et al.* 2017). در این مطالعه، همه سویه‌ها کم و بیش قادر به تولید آنزیم‌های پروتئاز و پروتئاز قلیایی بودند (شکل‌های ۲C و ۲D و جدول ۲).



شکل ۲- هاله بازدارنده رشد سلول‌های باکتری بیماری‌زا توسط سوسپانسیون فیلتر شده باکتری پروبیوتیک (A)، رسوب کدر اطراف پرگنه باکتری ناشی از تولید آنزیم لیپاز (B)، هاله روشن اطراف پرگنه باکتری به دلیل تولید آنزیم پروتئاز (C) و هاله روشن اطراف پرگنه باکتری ناشی از تولید آنزیم پروتئاز قلیایی (D).

Figure 2- Inhibition zone of pathogenic bacteria by filtered suspension of probiotic bacteria (A), opaque zone around bacteria colony due to lipase production (B), clear halo around bacterial colony because of protease production (C) and clear halo around bacterial colony due to alkaline protease production (D).

بیشترین میزان تولید آنزیم پروتئاز و پروتئاز قلیایی مربوط به سویه‌های Bs1، Bs11 و Bs6 بود. میزان تولید آنزیم پروتئاز در سویه‌هایی از *P. fluorescens* نیز قابل توجه بود (جدول ۲). در مطالعاتی که با هدف امکان کنترل‌زیستی نماتود ریشه گرهی گوجه‌فرنگی با استفاده از جدایه‌هایی از جنس باسیلوس انجام شد، تولید آنزیم-های پروتئاز، پروتئاز قلیایی، لیپاز و کیتیناز به عنوان معیارهای اصلی جهت غربال‌گری اولیه باکتری‌های آنتاگونیست در نظر گرفته شد (Ramezani Moghadam *et al.* 2013, Mota *et al.* 2017). نتایج تحقیق کنترل بیولوژیک قارچ‌های بیماری‌زای خاک‌زاد آووکادو نشان داده است سویه‌های *B. subtilis* موفق، توانایی بالایی در تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک پروتئاز و گلوکاناز، همچنین آنتی‌بیوتیک‌های مانند ایتورین‌آ و فنجایسین داشته‌اند (Cazorla *et al.* 2007).

در این مطالعه، قدرت نامیه بذرهای مورد استفاده ۹۴٪ تعیین شد. نتایج تاثیر ریزوباکتری‌ها روی شاخص درصد جوانه‌زنی بذر نشان داد بذرهای پرایم شده با سویه‌های ریزوباکتری بین ۸۸ تا ۹۹٪ جوانه‌زنی داشتند. سویه‌های مورد بررسی از نظر درصد جوانه‌زنی در ده گروه آماری قرار گرفتند. میزان درصد جوانه‌زنی بذر در غالب تیمارها بالاتر از شاهد بود. بیشترین تاثیر در

سویه‌های Bs6، Bs28 و Pf5 دیده شد (جدول ۳). در بررسی تاثیر سویه‌های باکتری روی سرعت جوانه‌زنی بذر، سویه‌ها تنوع زیادی نشان دادند و در دوازده گروه آماری قرار گرفتند.

جدول ۲- تولید متابولیت‌های ثانویه باکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه در آزمایشگاه.

Table 2- Production of secondary metabolites by studied probiotic bacteria, *in vitro*.

Strains	Inhibition zone, filtered suspension method (cm)	Inhibition zone, well method (cm)	Lipase production (cm)	Protease production (cm)	Alkaline protease production (cm)
Pf5	0.7±0.09 $^{d-g}$	0.3±0.09 $^{h-l}$	0.5±0.04 $^{e-f}$	1.77±0.13 ^{cd}	0.15±0.02 $^{e-g}$
Pf12	0.32±0.06 $^{f-h}$	0.12±0.06 $^{k-l}$	0.17±0.02 ^{fg}	1.35±0.09 ^{de}	0.075±0.04 ^{fg}
Pf14	0.3±0.09 ^{gh}	0.15±0.09 $^{j-l}$	0.47±0.13 $^{e-f}$	1.45±0.14 ^{de}	0.35±0.11 $^{b-c}$
Pf 23	1.37±0.11 ^{ab}	0.72±0.10 $^{d-g}$	0.97±0.08 $^{a-d}$	1.52±0.06 ^{ab}	0.57±0.04 ^{ab}
Pf43	0.95±0.10 $^{a-d}$	0.4±0.09 $^{g-l}$	0.2±0.04 ^{fg}	0.85±0.11 ^{fg}	0.17±0.02 $^{e-g}$
Pf87	0.65±0.09 $^{d-g}$	0.45±0.06 $^{g-k}$	0.55±0.07 $^{d-f}$	0.7±0.04 ^{fg}	0.12±0.06 $^{e-g}$
Pf92	1.12±0.9 $^{a-c}$	1.05±0.06 $^{c-e}$	0.4±0.10 $^{e-g}$	1.6±0.09 ^{e}	0.45±0.02 $^{a-d}$
Pf96	0.72±0.13 $^{d-g}$	0.65±0.15 $^{e-h}$	0.67±0.04 $^{b-e}$	0.8±0.04 ^{fg}	0.27±0.02 $^{d-f}$
Bs1	2±0.00 ^{a}	1.3±0.10 ^{bc}	1.07±0.04 ^{ab}	2.2±0.09 ^{bc}	0.62±0.04 ^{a}
Bs6	1.35±0.11 ^{ab}	1.07±0.04 ^{cd}	0.82±0.04 $^{b-e}$	2.27±0.16 ^{c}	0.55±0.06 $^{a-c}$
Bs7	0.3±0.07 ^{gh}	0.15±0.02 $^{j-l}$	0.62±0.16 $^{b-f}$	0.7±0.04 ^{fg}	0.12±0.06 $^{e-g}$
Bs8	0.77±0.09 $^{d-g}$	0.6±0.10 $^{f-i}$	0.72±0.13 $^{b-e}$	0.77±0.06 ^{fg}	0.1±0.00 $^{e-g}$
Bs 11	2.32±0.11 ^{a}	1.67±0.11 ^{ab}	1.3±0.10 ^{a}	2.85±0.10 ^{a}	0.67±0.06 ^{a}
Bs13	0.25±0.06 ^{gh}	0.2±0.04 $^{i-l}$	0.42±0.04 $^{e-g}$	1.07±0.04 ^{ef}	0.17±0.04 $^{e-g}$
Bs17	0.5±0.04 $^{e-h}$	0.2±0.04 $^{i-l}$	0.55±0.06 $^{d-f}$	0.57±0.04 ^{g}	0.3±0.00 $^{c-f}$
Bs20	0.85±0.25 $^{c-f}$	0.77±0.09 $^{d-g}$	0.7±0.10 $^{b-e}$	0.75±0.06 ^{fg}	0.15±0.02 $^{e-g}$
Bs22	0.77±0.04 $^{d-g}$	0.55±0.06 $^{f-j}$	0.57±0.13 $^{c-f}$	0.47±0.04 ^{g}	0.2±0.04 $^{d-g}$
Bs25	1.45±0.13 ^{b}	0.9±0.04 $^{c-f}$	1.02±0.10 $^{a-c}$	0.57±0.09 ^{g}	0.55±0.08 $^{a-c}$
Bs28	0.95±0.06 $^{a-d}$	0.55±0.06 $^{f-j}$	0.72±0.04 $^{b-e}$	0.52±0.06 ^{g}	0.17±0.04 $^{e-g}$
Bs30	0.52±0.08 $^{e-h}$	0.45±0.06 $^{g-k}$	0.67±0.10 $^{b-e}$	0.65±0.05 ^{fg}	0.25±0.02 $^{d-g}$
Bs31	0.45±0.06 $^{e-h}$	0.52±0.08 $^{f-k}$	0.82±0.04 $^{b-e}$	0.85±0.02 ^{fg}	0.17±0.02 $^{e-g}$
Control	0±0.00 ^{h}	0±0.00 ^{l}	0±0.00 ^{g}	0±0.00 ^{h}	0±0.00 ^{g}
Gentamicin	2±0.00 ^{a}	2±0.00 ^{a}	-	-	-

- حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشند.

- Pf (*Pseudomonas fluorescens*)، Bs (*Bacillus subtilis*) و Control (تیمار شاهد).

- Different characters in each column indicate statistically significant difference at 1% level according to Tukey's multiple range tests.

- Pf (*Pseudomonas fluorescens*), Bs (*Bacillus subtilis*) and Control (control treatment).

بیشترین تاثیر مربوط به سویه‌های Pf12، Pf43 و Bs11 بود (جدول ۳). از آنجایی که برخی از عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد قادر به بیماری‌زایی روی بذرهای جوانه‌زده نیستند، افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر موجب کاهش دوره حساسیت بذر نسبت به عامل بیماری‌زا می‌گردد. بیوپرایم کردن بذرها موجب افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر می‌شود که این تاثیر به دلیل اختلال در دوره کمون جوانه‌زنی بذر ایجاد می‌شود. این توانایی در مورد ریزوباکتری‌های مختلف متفاوت است. نتایج مطالعات قبلی نشان می‌دهد تیمار بذر گیاهان با ریزوباکتری‌های مفید موجب افزایش تحمل آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی در مقایسه با بذرهای تیمار نشده می‌شود. در واقع تیمار بذر یا ریشه با باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه، باعث توسعه و افزایش عملکرد گیاه در سیستم‌های کشاورزی می‌گردد (Vessey 2003). مکانیسم‌های محتمل در این فرآیند می‌توانند تولید هورمون‌های گیاهی، افزایش مواد غذایی در دسترس گیاه، همچنین کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زای گیاهی در نتیجه تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، سیدروفور و ... باشند (Zulueta-Rodriguez *et al.* 2015).

بررسی‌های گلخانه‌ای

تعداد هفت ریزوباکتری پروبیوتیک، شامل چهار سویه باکتری *B. subtilis* و سه سویه باکتری *P. fluorescens* با توان متفاوت در تولید متابولیت‌های ثانویه و کاهش رشد سویه‌های باکتری بیماری‌زا، جهت انجام مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شدند (شکل ۳). مطالعات گلخانه‌ای شامل بررسی امکان کاهش یا حذف خسارت بیماری لکه برگی باکتریایی گوجه‌فرنگی توسط ریزوباکتری‌های پروبیوتیک منتخب و تاثیر این ریزوباکتری‌ها روی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری بیماری‌زا بود. در بخش بررسی امکان

کنترل‌زیستی بیماری در گلخانه، سویه‌های ریزوباکتری بین ۲۵ تا ۸۱/۲۵ درصد موجب کاهش لکه‌های نکروز ایجاد شده توسط دو سویه باکتری بیمارگر Pss شدند و در ۴ گروه آماری قرار گرفتند (شکل ۳). بین سویه‌ها تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد مشاهده شد. سویه Bs11 با ۸۱/۲۵ درصد کاهش بیماری، بیشترین تاثیر را در کنترل‌زیستی بیماری لکه‌برگی سیرینگایی گوجه-فرنگی نشان داد و با شاهد سالم در یک گروه آماری قرار گرفت. پس از این سویه، سویه‌های Bs6 و Pf23 با ۶۲/۵۰ درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد آلوده در مرتبه‌های بعدی قرار گرفتند. سویه‌های Bs1 و Bs25 با وجود بازدارندگی بالا روی رشد باکتری بیمارگر در آزمایشگاه (جدول ۲)، نتوانستند تاثیر زیادی در کاهش بیماری داشته باشند (شکل ۳).

جدول ۳- تاثیر ریزوباکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه بر شاخص‌های بذر گوجه‌فرنگی.

Table 3- Effect of studied probiotic rhizobacteria on tomato seed indexes.

Strains	Seed percentage germination (%)	Seed speed germination	Strains	Seed percentage germination (%)	Seed speed germination
Pf5	98.50±0.86 ab	77.50±2.59 a-c	Bs8	89.57±0.47 ef	64±0.70 f-h
Pf12	93.25±0.62 b-f	85.75±0.85 a	Bs 11	97.25±0.75 a-d	86±0.70 a
Pf14	97.50±1.19 a-d	65±0.91 e-h	Bs13	98±0.70 a-c	75±0.00 b-d
Pf 23	97.25±0.62 a-d	74.25±1.25 b-e	Bs17	89.75±1.03 ef	77.50±0.50 a-c
Pf43	97±0.57 a-d	86.75±1.10 a	Bs20	97.25±1.31 a-d	72±0.00 c-f
Pf87	92.75±2.13 c-f	67.25±0.85 d-h	Bs22	88±0.91 f	66±1.58 d-h
Pf92	95±1.91 a-e	71.25±3.63 c-g	Bs25	98±0.70 a-c	83±0.40 ab
Pf96	98.25±1.43 a-c	75.25±0.94 b-d	Bs28	98.75±0.47 ab	78.50±0.28 a-c
Bs1	97±1.78 a-d	72.75±5.12 c-f	Bs30	88.50±0.64 f	61.25±0.47 h
Bs6	99.25±0.25 a	71.50±4.05 c-g	Bs31	98.25±0.62 a-c	73±1.08 c-f
Bs7	97.50±0.64 a-d	61.75±1.10 gh	Control	99.25±0.25 a	65.50±0.50 d-h

- حروف متفاوت در هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار در سطح ۱ درصد بر اساس آزمون توکی می‌باشند.

- Pf (*Pseudomonas fluorescens*)، Bs (*Bacillus subtilis*) و Control (تیمار شاهد).

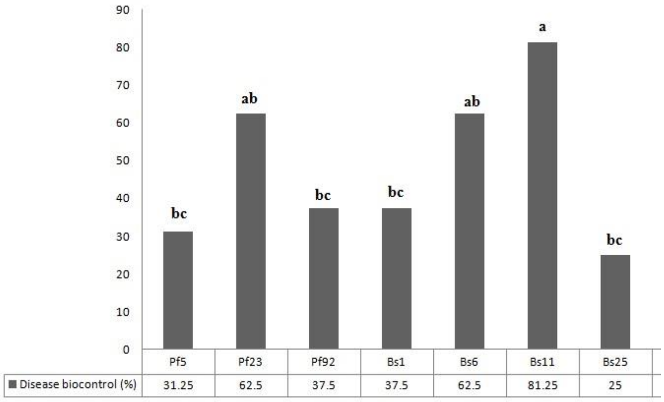
- Different characters in each column indicate statistically significant difference at 1% level according to Tukey’s multiple range tests.

- Pf (*Pseudomonas fluorescens*), Bs (*Bacillus subtilis*) and Control (control treatment).

در مطالعه‌ای که گیلاردی و همکاران جهت کنترل بیماری لکه برگی سیرینگایی در رقم Cuore di bue گوجه‌فرنگی انجام داده‌اند، سویه *B. subtilis* QST713 موجب کاهش بیماری به صورت جزئی شده است و سویه *P. chlororaphis* MA342 تاثیری بر کاهش بیماری نداشته است (Gilardi *et al.* 2010). نتایج تحقیقی که با پیش تیمار برگ، خاک، بذر و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی با باکتری *Rahnella aquatilis* انجام شده است، نشان‌دهنده کاهش حساسیت گیاهچه‌های تیمار شده با باکتری مفید نسبت به بیماری لکه‌برگی گوجه-فرنگی ناشی از باکتری *Xanthomonas vesicatoria* بوده است، همچنین وزن تر و وزن خشک گیاهچه‌های تیمار شده با ریزوباکتری مفید نسبت به شاهد آلوده افزایش داشته است. از طرفی کاهش محتوای پروتئینی گیاه و تعداد باندها در الگوی پروتئین کل باکتری نشان-دهنده اثر مثبت باکتری مفید در کاهش تنش و اثرات باکتری بیمارگر بوده است (El-Hendawy *et al.* 2005).

در مطالعه حاضر نیز کاربرد برخی ریزوباکتری‌های پروبیوتیک موجب کاهش خسارت بیماری در مقایسه با شاهد شد (شکل ۳). فوسیا و همکاران تاثیر سویه تجاری *B. subtilis* QST 713 و هیدروکسید مس روی بیماری لکه‌برگی گوجه‌فرنگی ایجاد شده توسط باکتری *P. syringae* pv. *tomato* در گلخانه را مورد مقایسه قرار داده‌اند. در این مطالعه، سویه QST 713 بیماری را به-طور چشمگیری در مقایسه با کنترل آلوده و سم مسی کاهش داده است، همچنین جمعیت باکتری بیمارگر در تیمار QST713 بسیار کمتر از تیمار شاهد بوده است. نتایج این تحقیق بیانگر افزایش طول گیاه در تیمارهای باکتری آنتاگونیست و سم مسی نسبت به شاهد بوده است، همچنین آنالیز PCR کمی سه ژن *PR1a*، *PR1b* و *Pin2* که مرتبط با سیستم دفاعی گیاه هستند، نشان-دهنده افزایش بیان ژن *Pin2* در مقایسه با شاهد بوده است (Fousia *et al.* 2016). نتایج تحقیقی مشابه که با استفاده از سویه‌هایی از باکتری‌های اندوفیت *B.*

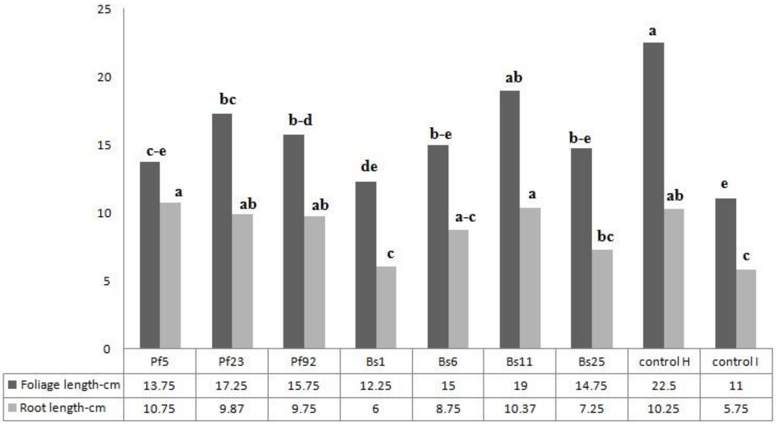
pumilus و *B. amyloliquefacies* روی باکتری نشان‌دار *P. syringae* pv. *tomato* انجام شده است، نشان داد جمعیت باکتری بیمارگر به طور قابل توجهی روی فیلوسفر گیاهان تیمار شده کاهش یافته است، همچنین کاهش لکه‌های نکروتیک روی برگ‌های گیاه گوجه-فرنگی توسط باکتری‌های پروبیوتیک با تاثیر بازدارندگی سم اکسی‌کلرور مس قابل مقایسه بوده است (Filho *et al.* 2013).



شکل ۳- کنترل‌زیستی بیماری لکه برگی سیرینگایی گوجه‌فرنگی توسط ریزوباکتری‌های منتخب در گلخانه. Pf (*Pseudomonas fluorescens*)، Bs (*Bacillus subtilis*) و Control I (تیمار آلوده).

Figure 3- Biological control of tomato syringae leaf spot disease by selected rhizobacteria in the greenhouse. Pf (*Pseudomonas fluorescens*), Bs (*Bacillus subtilis*) and Control I (Infected control).

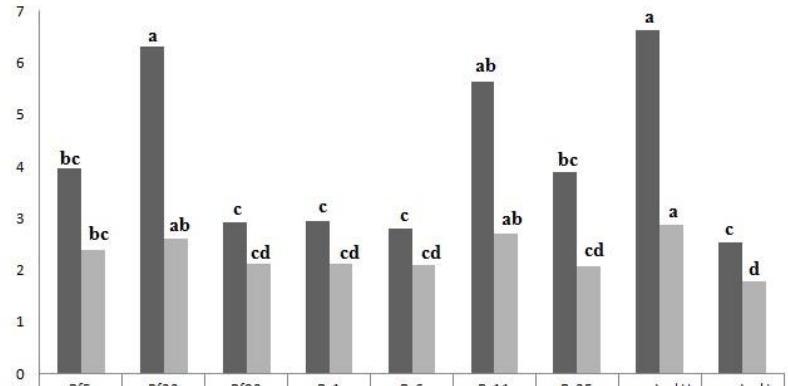
در این مطالعه اثر ریزوباکتری‌های منتخب بر برخی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری بیماری‌زای Pss مورد ارزیابی قرار گرفت. این فاکتورها شامل وزن تر، وزن خشک و طول اندام هوایی و ریشه گیاه بودند که پنج هفته پس از تلقیح باکتری مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج این تحقیق، گیاهان تیمار شده با ریزوباکتری‌ها از نظر طول، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی به‌ترتیب در هشت، چهار و هفت گروه آماری قرار گرفتند (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). بین تیمارها تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد مشاهده شد. بیشترین تاثیر در افزایش هر سه فاکتور مربوط به سویه‌های Bs11 و Pf23 بود. میزان افزایش فاکتورهای مورد بررسی در این سویه‌ها نزدیک به تیمار کنترل سالم بود.



شکل ۴- اثر ریزوباکتری‌های پروبیوتیک منتخب بر طول اندام هوایی و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی. Pf (*Pseudomonas fluorescens*)، Bs (*Bacillus subtilis*)، Control H (تیمار سالم) و Control I (تیمار آلوده).

Figure 4- Effect of selected probiotic rhizobacteria on tomato foliage and root length. Pf (*Pseudomonas fluorescens*), Bs (*Bacillus subtilis*), Control H (Health control) and Control I (Infected control).

در فاکتور طول اندام هوایی سویه‌های Pf92 و Bs6 با طول‌های ۱۵/۷ و ۱۵ سانتی‌متر (شکل ۴)، در فاکتور وزن تر اندام هوایی سویه‌های Pf5 و Bs25 با وزن‌های ۳/۹۶ و ۳/۸۹ گرم (شکل ۵) و در فاکتور وزن خشک اندام هوایی سویه‌های Bs1 و Bs25 با وزن‌های ۱/۷۷ و ۱/۵۹ گرم (شکل ۶) بیشترین تاثیر افزایشی را پس از سویه‌های Bs11 و Pf23 نشان دادند. نتایج تحقیقی که با استفاده از ۳۷ ریزوباکتری با فعالیت متفاوت افزایش-دهندگی فاکتورهای رشدی گیاه انجام شده است، نشان داد همه باکتری‌های مورد استفاده با تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد موجب افزایش وزن تر ساقه ذرت در مقایسه با تیمار شاهد سالم شده‌اند. در این مطالعه، سویه *Agrobacterium* NGB-11 بیشترین تاثیر را در افزایش طول گیاه نشان داده است. بیشتر ریزوباکتری-های مورد بررسی طول ریشه را افزایش داده‌اند که بیشترین مقدار مربوط به سویه NGB-31 *Flavobacterium* بوده است. وزن خشک و وزن تر ذرت‌هایی که بذرهایشان با ریزوباکتری‌ها تیمار شده بود، در مقایسه با تیمار شاهد افزایش قابل توجه نشان داده-اند (Youseif 2018).



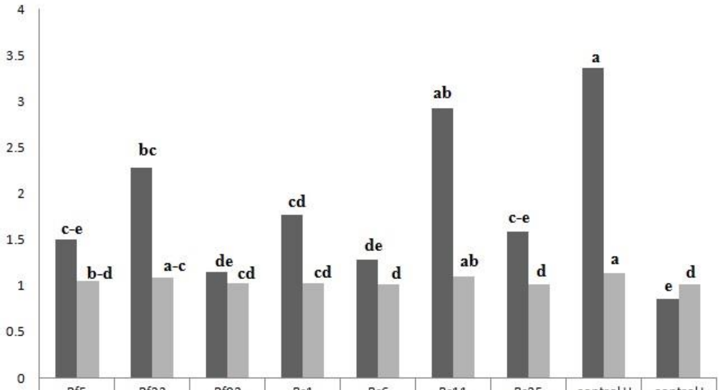
	Pf5	Pf23	Pf92	Bs1	Bs6	Bs11	Bs25	control H	control I
Foliage fresh weight-g	3.96	6.31	2.92	2.94	2.8	5.65	3.89	6.64	2.53
Root fresh weight-g	2.37	2.61	2.11	2.11	2.1	2.7	2.06	2.87	1.77

شکل ۵- تاثیر ریزوباکتری‌های منتخب روی وزن تر اندام هوایی و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی. Pf (*Pseudomonas fluorescens*)، Bs (*Bacillus subtilis*)، Control H (تیمار سالم) و Control I (تیمار آلوده).

Figure 5- Effect of selected rhizobacteria on fresh weight of tomato foliage and root. Pf (*Pseudomonas fluorescens*), Bs (*Bacillus subtilis*), Control H (Health control) and Control I (Infected control).

در مورد فاکتورهای رشدی ریشه، نتایج مشابهی در طول و وزن خشک ریشه به دست آمد. سویه‌های Bs11 و Pf23 بیشترین تاثیر مثبت روی طول و وزن خشک ریشه داشتند. در تاثیر ریزوباکتری‌ها روی طول ریشه، سویه Pf5 با طول ۱۰/۷۵ سانتی‌متر تاثیر بیشتری از دو سویه برتر این مطالعه نشان داد. سویه‌های بعدی با بیشترین تاثیر روی وزن تر ریشه سویه‌های Pf5 با ۲/۳۷ گرم و Pf92 و Bs1 با ۲/۱۱ گرم بودند. در وزن خشک ریشه نیز این سه سویه بیشترین تاثیر را در افزایش وزن نسبت به شاهد نشان دادند (شکل‌های ۴، ۵ و ۶). در مطالعه‌ای تاثیر باکتری‌های *Azospirillum* sp. و *P. fluorescens* 313 روی رشد گیاهان گندم، گوجه‌فرنگی، فلفل و پنبه تحت شرایط مختلف محیطی مورد بررسی قرار گرفت. باکتری‌های مورد مطالعه بر وزن خشک ریشه گیاهان مورد بررسی تاثیری نداشته‌اند اما وزن تر ریشه‌ها در شرایط دمایی و رطوبت نسبی مناسب، تحت تاثیر مثبت ریزوباکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه قرار گرفته است (Bashan and de-Bashan 2005). فاکتورهای رشدی گیاه آرابیدوپسیس و داتوره نیز پس از تیمار با سه ریزوباکتری *P. plecoglossicida* Pp20 ، *Bacillus* sp. Bt04 و *Lysinibacillus fusiformis* Lf89 افزایش نشان داده است. تغییر در نسبت C/N گیاه آرابیدوپسیس و افزایش ترکیبات آلکالوئیدی ساقه‌ها از تاثیرات مشخص این ریزوباکتری‌ها بوده است

(Rahmoune *et al.* 2017). با عنایت به اهداف کشاورزی پایدار، افزایش کاربرد عوامل بیولوژیک همسو با سلامت طبیعت، جهت افزایش رشد گیاهان و بالا بردن توان آن‌ها در برابر آفات و بیماری‌های گیاهی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این راستا در مطالعه حاضر، باکتری‌های پروبیوتیک کاهش‌دهنده خسارت باکتری بیماری‌زا و غربال سویه‌های با قابلیت بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه و تولید عوامل تقویت‌کننده رشد گیاه مورد توجه قرار گرفت و سویه‌های برتر Bs11 و Pf23 جهت تحقیقات تکمیلی انتخاب گردیدند.



	Pf5	Pf23	Pf92	Bs1	Bs6	Bs11	Bs25	control H	control I
Foliage dry weight-g	1.5	2.28	1.15	1.77	1.28	2.93	1.59	3.36	0.85
Root dry weight-g	1.05	1.08	1.02	1.02	1.01	1.1	1.01	1.13	1.01

شکل ۶- اثر ریزوباکتری‌های منتخب روی وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی. Pf (*Pseudomonas fluorescens*)، Bs (*Bacillus subtilis*)، Control H (تیمار سالم) و Control I (تیمار آلوده).

Figure 6- Effect of selected rhizobacteria on dry weight of tomato foliage and root. Pf (*Pseudomonas fluorescens*), Bs (*Bacillus subtilis*), Control H (Health control) and Control I (Infected control).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این تحقیق، باکتری‌های جداسازی شده از ریزوسفر و ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در استان آذربایجان غربی، کم و بیش پتانسیل بالایی در کاهش بیماری لکه‌برگی سیرینگایی گوجه‌فرنگی نشان دادند. برخی سویه‌ها با توان بیوکنترلی بالا در آزمایشگاه کمترین تاثیر را در کاهش بیماری در گلخانه نشان دادند. در بین باکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه، سویه‌هایی با توان بالا در افزایش شاخص‌های بذر، افزایش فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی و کاهش بیماری لکه برگی سیرینگایی گوجه‌فرنگی مشاهده شد که به عنوان مطالعات اولیه روی عوامل کنترل بیولوژیک باکتریایی در این استان قابل توجه می‌باشند. سویه‌های برتر در آزمایشگاه و گلخانه جهت بررسی تاثیر روی سایر بیمارگرهای باکتریایی گوجه‌فرنگی انتخاب شدند و تحقیقات تکمیلی روی آن‌ها در حال انجام است.

REFERENCES

Ahemad M, Kibret M (2014) Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. Journal of King Saud University-Sciences 26: 1-20.

Ahmadzadeh M (2013) Biological control of plant diseases, plant probiotic bacteria. University of Tehran Press, Iran. (In Persian)

Al-Karablieh N, Al-Dokh A, Mutlak I, Abdulhadi Z (2017) *In vitro* biological control of *Pseudomonas viridiflava* by *Pseudomonas fluorescens* via siderophore competition. Jordan Journal of Agricultural Sciences 13(3): 629-644.

Ardalan A, Abbasi S, Sharifi R (2017) Effect of some mineral elements on biocontrol efficiency of *Bacillus pumilus* INR7 against bean damping-off caused by *Rhizoctonia solani.* Biological control of Pest and Plant Disease 6(2): 187-195. (In Persian)

Al-Amri SM (2013) Improved growth, productivity and quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants through application of shikimic acid. Saudi Journal of Biological Sciences 20: 339-345.

Bashan Y, de-Bashan LE (2005) Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. Soil Biology and Biochemistry 37: 1795-1804.

Bultreys A, Kaluzna M (2010) Bacterial cankers caused by *pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2. Journal of Plant Pathology 92: 21-33.

Cazorla FM, Romero D, Perez-Garcia A, Lugtenberg BJ, Vicente AD, Blomberg G (2007) Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. Journal of Applied Microbiology 103(5): 1950-1950.

Chantawannakul P, Oncharoena A, Klanbuta K, Chukeatiroteb E, Lumyonga S (2002) Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated traditionally fermented soybean in Northern Thailand. Science Asia 28: 24-245.

Contesini FJ, de Melo FR, Sato HH (2017) An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. Critical Reviews in Biotechnology 38(3): 321-334.

Daes J, De Maeyer K, Pauwelyn E, Hofte M (2010) Biosurfactants in plant-*Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol. Environmental Microbiology Report 2(3): 359-372.

Dariush S, Ebadi AA, Khoshkdaman M, Rabiei B, Elahinia A (2012) Characterizing the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from rice and wheat in Iran. Plant Protection Science 48 (4): 162-169.

El-Hendawy HH, Osman ME, Sorour NM (2005) Biological control of bacterial spot of tomato caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* by *Rahnella aquatilis.* Microbiological Research 160: 343-352.

Farghaly FA, Nafady NA (2015) Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Rosmarinus officinalis* and its effect on tomato and wheat plants. Journal of Agricultural Science 7(11): 277-287.

Filho RL, de Souza RM, Ferreira A, Quecine MC, Alves E, de Azevedo JL (2013) Biocontrol activity of *Bacillus* against a GFP-marked *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato phylloplane. Australasian Plant Pathology 42(6): 643-651.

Fousia S, Paplomatas EJ, Tjamos SE (2016) *Bacillus subtilis* QST 713 confers protection to tomato plants against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and induces plant defense-related genes. Journal of Phytopathology 164(4): 264-270.

Garibaldi A, Minuto A, Scortichini M, Gullino ML (2007) First report of syringae leaf spot caused by *Pseudomonas syringa* pv. *syringae* on tomato in Italy. Plant Disease 91(11): e1518.
http://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1518B

Gilardi G, Gullino ML, Garibaldi A (2010) Evaluation of spray programmes for the management of leaf spot incited by **Pseudomonas syringae** pv**. syringae** on tomato cv. Cuore di bue. Crop Protection 29(4): 330-335.

Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK (2018) Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. Microbiological Research 206: 131-140.

Gullino ML, Gilardi G, Sanna M, Garibaldi A (2009) Epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on tomato. Phytoparasitica 37: 461-466.

ISTA (2003) ISTA Handbook on seedling evaluation. Bassersdorf: ISTA.

Jones JB, Stall JP, Zitter TA (1991) Compendium of tomato diseases. APS Press, St. Paul, MN, USA.

Kaluzna M, Pulawska J, Sobiczewski P (2010) The use of PCR melting profile for typing of *Pseudomonas syringae* isolates from stone fruit trees. European Journal of Plant Pathology 126: 437-443.

Kempf HJ, Wolf G (1989) *Erwinia herbicola* as a biocontrol agent of *Fusarium culmorum* and *Puccinia recondite* f. sp. *tritici* on wheat. Phytopathology 79: 990-994.

Khezri M (2017) Effect of biofilm by plant probiotic rhizobacteria on root colonization and growth of wheat. Biological control of Pest and Plant Disease 6(1): 93-102. (In Persian)

Khezri S, Rahimian H, Ahangaran A, Mohammadi M (2010) Comparisons of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* from various hosts with different methods. International Journal of Agriculture and Biology 12: 106-110.

Lawson VF, Summers WL (1984**)** Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in wild *Lycopersicon* species. Plant Disease 68 (2): 139-141**.**

Lelliot RA, Stead DE (1987) Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications, UK.

Lingaiah S, Umesha S (2013) *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. Canadian Journal of Plant Protection 1: 147-153.

Llop P, Caruso P, Cubero J, Morente C, Lopez M (1999) A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. Journal of Microbiological Methods 37: 23-31.

Mezaini A, Chihib NE, Bouras AD, Nedjar-Arroume N, Hornez JP (2009) Antibacterial activity of some

lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product. Journal of Environmental and Public Health. http://doi.org/10.1155/2009/678495

Mota MS, Gomes CB, Souza Júniora IT, Moura AB (2017) Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. Brazilian Journal of Microbiology 48: 62-70.

Murthy KN, Uzma F, Srinivas CC (2014) Induction of systemic resistance in tomato against *Ralstonia solanacearum* by *Pseudomonas fluorescens*. American Journal of Plant Science 5: 1799-1811.

Ongena M, Jourdan E, Adam A, Paquot M, Brans A, Joris B, Arpigny JL, Thonart P (2007) Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. Environmental Microbiology 9: 1084-1090.

Panwar M, Tewari R, Nayyar H (2014) Microbial consortium of plant growth-promoting rhizobacteria improves the performance of plants growing in stressed soils: an overview, *In*: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds.), Phosphate solubilizing microorganisms. Springer International Publishing, Switzerland. pp. 257-285.

Saraf M, Pandya U, Thakkar A (2014) Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. Microbiological Research 169: 18-29.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, (3th ed.) APS Press, St. Paul, MN, USA.

Shahbazi, H, Behboudi K, Javan Nikkhah M, Ahmadzadeh M (2016) Detection of *hcnAB* and *phlD* genes in fluorescent pseudomonads biological control agent of *Fusarium graminearum* and studying their ability to ectorhizosphere colonization of wheat. Biological Control of Pests and Plant Diseases 4(2): 143-155. (In Persian)

Shafi J, Tian H, Ji M (2017) *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology and Biotechnological Equipment 31(3): 446-459.

Sun D, Zhuo T, Hu X, Fan X, Zou H (2017) Identification of a **Pseudomonas putida** as biocontrol agent for tomato bacterial wilt disease. Biological Control 114: 45-50.

Szentes S, Gabriel-Lucian R, Laslo É, Lányi S, Mara G (2013) Selection and evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from a raised bog environment. Crop Protection 52: 116-124.

Rahmoune B, Morsli A, Khelifi-Slaoui M, Khelifi L, Strueh A, Erban A, Kopka J, Prell J, van Dongen JT (2017) Isolation and characterization of three new PGPR and their effects on the growth of *Arabidopsis* and *Datura* plants. Journal of Plant Interactions 12(1): 1-6.

Ramezani Moghadam M, Mahdikhani Moghadam E, Baghaei Ravari S, Rohani H (2013) Evaluation of antagonistic activity of *Bacillus* spp. in control of tomato root-knot disease. Biological control of Pest and Plant Disease 2(1): 17-26. (In Persian)

Raza W, Ling N, Liu D, Wei Z, Huang Q, Shen Q (2016) Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. Microbiological Research 192: 103-113.

Vessey JK (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. Plant Soil 255: 571-586.

Wang H, Shi Y, Wang D, Yao Z, Wang Y, Liu G, Zhang S, Wang A (2018) A biocontrol strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 used to control tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* cooke and promote the growth of seedlings. International Journal of Molecular Sciences 19: e1371. http://doi.org/10.3390/ijms19051371

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology 173: 697-703.

Weller DM, Mavrodi DV, van Pelt JA, Pieterse CMJ, van Loon LC, Bakker PAHM (2012) Induced systemic resistance *in Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens*. Biological Control 102(4): 403-412.

Wilson AM, Campbell HL, Ji P, Jones JB, Cuppels DA (2002) Biological control of bacterial speck of tomato under field conditions at several locations in North America. Biological Control 92(12): 1284-1292.

Youseif SH (2018) Genetic diversity of plant growth promoting rhizobacteria and their effects on the growth of maize plants under greenhouse conditions. Annals of Agricultural Sciences 63: 25-35.

Zulueta-Rodriguez R, Hernandez-Montiel LG, Murillo-Amador B, Rueda-Puente EO, Capistran LL, Troyo-Dieguez E, Cordoba-Matson MV (2015) Effect of hydropriming and biopriming on seed germination and growth of two Mexican fir tree species in danger of extinction. Forests 6(9): 3109-3122.