

بررسی توان برخی جدایه‌های باکتریایی به منظور مهار زیستی بیماری لکه زاویه‌ای باکتریایی خیار

سیدزمان حسینی کهنوج^۱، پژمان خدایگان^{۲*}، روح‌الله صابری ریشه^۲

۱. دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان.

۲. دانشیاران گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان.

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱)

چکیده

باکتری‌های محرک رشد گیاهان با داشتن توان بالا در جهت افزایش زیست توده و کنترل بیماری‌های گیاهی، می‌توانند جانشین مناسبی برای سموم و کودهای شیمیایی در کشاورزی باشند. به منظور بررسی مهار زیستی *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* عامل بیماری لکه زاویه‌ای خیار در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، از باکتری‌های جداسازی شده از خاک ریزوسفر خیار به همراه تعدادی از نمونه‌های مجموعه باکتری‌های گروه گیاهپزشکی دانشگاه ولی عصر رفسنجان استفاده شد. بعد از غربالگری آزمایشگاهی، چهار جدایه که دارای توان ایجاد هاله بازدارنده بودند برای بررسی‌های بعدی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انتخاب شدند. خصوصیات مهار زیستی جدایه‌ها مانند تولید متابولیت‌های ثانویه و بعضی از ویژگی‌های تحریک‌کنندگی رشد در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. در ارزیابی‌های گلخانه‌ای، توان جدایه‌های باکتریایی در کنترل بیماری از طریق ممانعت در ایجاد علائم با تعیین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری و افزایش زیست توده گیاه خیار با بررسی شاخص‌های رشدی مطالعه شد. نتایج بررسی گلخانه‌ای نشان داد که جدایه *Pseudomonas fluorescens* VRPF 54 کارایی مناسبی در مهار زیستی بیماری داشت. در شرایط گلخانه، این جدایه به تنهایی و توأم با بیمارگر به طور معنی‌داری باعث افزایش زیست توده و کنترل بیماری لکه زاویه‌ای خیار گردید. پس از انتخاب این جدایه، برخی از ویژگی‌های آنتاگونیستی، خصوصیات بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی آن در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. همچنین نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌های پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیا لایاز، پلی فنل اکسیداز و محتوی فنل کل روند افزایشی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: PGPR، کنترل بیولوژیک، سودوموناس فلورسنت.

Introducing of *Bacillus subtilis* UTBMS7 as a probiotic bacteria against on wheat Evaluation of the potential of some bacterial isolates for biological control of angular leaf spot disease of cucumber

Seyed Zaman Hosseini¹, Pejman Khodaygan^{2*}, Roohallah Saberi Rیشه²

1- Phd student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran.

2- Associate Professors, Department of Plant Protection, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran.

(Received: May 15, 2021 - Accepted: August 22, 2021)

Abstract

Plant growth-promoting rhizobacteria have great potential for increasing plant biomass and controlling plant diseases. Therefore PGPRs can be a good substitute for the use of pesticides and chemical fertilizers in agriculture. For evaluation of the effects of antagonistic activities of several PGPRs against *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* the causal agent of cucumber angular leaf spot disease in laboratory and greenhouse conditions. Several bacteria isolated from different cucumber rhizosphere soil in Kerman province and a number of bacterial strains in the collection of Vali-e-Asr University of Rafsanjan were used. After *in vitro* screening, four isolates with the ability of growth inhibitory effect were selected for further studies *in vitro* and *in planta*. Antibacterial activity characteristics of biocontrol agents such as the production of secondary metabolites and some of their plant growth promoting traits were evaluated *in vitro*. During *in planta* study, the ability of bacterial strains to prevent the development of symptoms using the area under disease progress curve (AUDPC) and increasing the biomass of cucumber plants were evaluated. Greenhouse study showed that *Pseudomonas fluorescens* VRPF 54 strain has high biocontrol efficacy. During *in planta* study, this strain, both alone and in the interaction plant-pathogen in comparison with the control plant, significantly increased biomass and controlled cucumber leaf spot disease. After the selection of this strain, some of its antagonistic activities, biochemical properties and molecular identification were screened *in vitro*. Also, the assay of antioxidant enzyme activity such as peroxidase, guaiacol peroxidase, phenylalanine ammonia lyase, polyphenol oxidase and total phenol content were considerably increased.

Key Words: PGPR, biocontrol, *Pseudomonas fluorescens*.

E-mail: pkhodaygan@vru.ac.ir

مقدمه

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. جایگاه ویژه‌ای در میان سبزی‌های میوه‌ای دارد و یکی از ۱۱ سبزی مهم جهان به شمار می‌رود (Lebeda et al. 2007). بر اساس آمار نامه کشاورزی در سال زراعی ۱۳۹۸ سطح زیر کشت خیار گلخانه‌ای در ایران حدود ۷۴۱۴ هکتار، میزان تولید ۱۹۱۴۳۰۵ تن و عملکرد ۲۵۸۲۱۰ کیلوگرم در هکتار برآورد شده است (Anonymous 2020). بوته خیار در معرض خسارت متعدد بیماری‌زای گیاهی قرار می‌گیرد و باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* (psl) از جمله این عوامل است که سبب کاهش کشت این محصول می‌شود. علائم این بیماری بر روی برگ‌ها به صورت لکه‌های آب‌سوخته، نیمه شفاف، ریز و گرد یا نامنظم است. با پیشرفت بیماری، لکه‌ها به هم پیوسته، محدود به رگبرگ‌ها می‌شوند و حالت لکه زاویه‌ای پیدا می‌کنند (Newberry et al. 2016). این بیماری در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۴۹ از گرمسار گزارش شد و پس از آن در مناطق مختلف جالیزکاری از جمله ورامین، اصفهان، شیراز، ارومیه، تبریز، مازندران و کردستان مشاهده گردید (Etebarian 2008). جداسازی چندین جدایه عامل بیماری *Psl* روی خیار از مناطق مختلف استان کردستان و بررسی خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و فیزیولوژی آن‌ها (Harighi 2007)، شناسایی چندین جدایه عامل بیماری *Psl* از گلخانه‌های خیار در استان‌های کرمان و فارس (Parizi and Taghavi 2015) و همچنین شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر خیار و ارزیابی توان آنتاگونیستی آن‌ها به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک علیه بیماری مزبور (Rafiei and Khodakaramian 2015)، از جمله‌ی پژوهش‌های انجام گرفته در ایران می‌باشد.

نگرانی‌ها درباره اثرات سموم و کودهای شیمیایی روی ایمنی مواد غذایی و محیط زیست باعث تحقیقات بیشتر با هدف توسعه روش‌های جایگزین برای مدیریت بیماری‌های گیاهی شده است. در این زمینه، مطالعات گسترده روی کنترل بیولوژیک انجام شده که نتایج بسیار مطلوبی به عنوان یک روش جایگزین کنترل

بیماری‌های گیاهی به دست آمده است. بنابراین، ضروری است پروبیوتیک‌های موثری از مطالعات کنترل بیولوژیک به دست آید تا کنترل بیولوژیک تبدیل به یک انتخاب مناسب گردد (Mota et al. 2017). گونه‌های مختلفی از جنس‌های سودوموناس و باسیلوس به طور گسترده در خاک وجود دارند که به عنوان استعمارگرهای کارآمد ریزوسفر با توانایی تولید انواع مختلفی از متابولیت‌ها، طیف گسترده‌ای از بیمارگرهای گیاهی را مهار می‌کنند (Rangarajan et al. 2003). به طور کلی، باکتری‌های محرک رشد گیاهان (PGPR) از طریق تثبیت ازت، قابلیت حل‌کنندگی فسفر نامحلول، تولید سیدروفور، تولید هورمون‌های گیاهی، کاهش غلظت اتیلن، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها (پادزی) و القای مقاومت سیستمیک (ISR) رشد گیاه را تسهیل می‌کنند (Ahemad and Khan 2012). آنزیم اوره‌آز باعث هیدرولیز اوره به دی‌اکسید کربن و آمونیاک می‌شود. عوامل پروبیوتیک حاوی آنزیم اوره‌آز، قادر هستند اوره را جذب و آن را به آمونیاک تبدیل کرده و آن را به محیط بیرون ترشح کنند تا به عنوان منبع نیتروژن مورد استفاده گیاهان قرار گیرد (Sirko and Brodzik 2000). آمونیوم منبع اصلی نیتروژن غیر آلی برای گیاهان است. با وجود ۷۸٪ فراوانی نیتروژن در جو زمین، این شکل ازت گازی برای اکثر موجودات به راحتی قابل دسترسی نیست. PGPR با تثبیت نیتروژن و تبدیل آن به آمونیاک به طور غیر مستقیم رشد گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند و باعث بهبود ساختار خاک و تغذیه گیاه می‌شوند. همچنین حدود ۸۰٪ از PGPRs هورمون اکسین را به عنوان متابولیت ثانویه تولید می‌کنند که با تولید هورمون اکسین (IAA) سطح و طول ریشه گیاه را افزایش می‌دهند و در نتیجه دسترسی بیشتر گیاه به مواد مغذی خاک را فراهم می‌کنند. IAA تولید شده توسط PGPR در مواردی که غلظت اکسین گیاه کمتر از حد مطلوب باشد باعث تحریک رشد ریشه و در مواقعی که سطح اکسین گیاه در حد مطلوب باشد، از رشد ریشه جلوگیری می‌کنند (Olanrewaju 2017). گیاهان دارای طیف متنوعی از پاسخ‌های دفاعی در برابر تنش‌های

درجه سلسیوس و ۱۲ ساعت دوره نوری با عامل بیمارگر *Psl* مایه زنی شدند. از دو روش مایه زنی و اسپری پاشی به صورت پیش تیمار استفاده شد که روش مایه زنی باکتری، توانایی بیشتری در ایجاد علائم از خود نشان داد. برای مایه زنی از کشت ۲۴ ساعته سوسپانسیون باکتری *Psl* با غلظت 10^7 CFU/ml در آب مقطر سترون تهیه و با سرنگ انسولین استریل به رگبرگ‌ها تزریق شد. گیاهان مایه زنی شده به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و سپس به مدت ۱۰ روز در شرایط رطوبت نسبی ۹۰٪ در گلخانه نگهداری شدند. نتایج به طور روزانه ثبت و درجه مقاومت ارقام خیار بر اساس سیستم نمره‌دهی واتمن و همکاران تعیین گردید (Olczak-Woltman *et al.* 2009). آزمون اثبات بیماری‌زایی تحت دو تیمار شاهد آلوده (مایه زنی گیاه با بیمارگر) و شاهد سالم (بدون مایه زنی بیمارگر به گیاه) در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و نمودارها با نرم افزار Excel 2010 ترسیم گردیدند، مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح احتمال یک درصد صورت گرفت.

تهیه جدایه‌های باکتریایی پروبیوتیک

تعداد ۴۰ جدایه باکتری از ریزوسفر ریشه خیار از گلخانه‌های زیر کشت مناطق مختلف استان کرمان، خصوصاً مناطق جنوب کرمان، با استفاده از روش سری رقت، جداسازی و طبق روش‌های معمول شناسایی شدند (Shaad *et al.* 2001). همچنین تعدادی از جدایه‌های موجود در کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان در این سنجش استفاده گردید.

بررسی توانایی مهار زیستی جدایه‌ها (آزمون کشت متقابل)

به منظور ارزیابی میزان بازدارندگی جدایه‌ها در مهار زیستی علیه باکتری عامل لکه زاویه‌ای برگ خیار درون تشتک پتری، از روش کشت متقابل (Dual culture) استفاده شد (Aliye *et al.* 2008). جدایه‌ها به صورت لکه‌ای روی محیط آگار غذایی NA با فاصله مناسب و

زیستی و غیرزیستی هستند. آلودگی ایجاد شده توسط عوامل قارچی، باکتریایی و ویروسی بیشترین عامل محدود کننده رشد گیاهان هستند و اولین راهکار قابل مشاهده دفاعی گیاه در برابر این عوامل بیماری‌زا تولید مقدار زیادی اکسیژن فعال (ROS) است (O'Brien *et al.* 2012). مولکول ROS به طور طبیعی در سلول‌های گیاهی به میزان کم تولید می‌شود، اما اگر میزان مولکول ROS در گیاه افزایش یابد به سلول‌ها آسیب می‌زند (Blokhina *et al.* 2003). گیاهان با دارا بودن سیستم ضد اکسنده که شامل ترکیبات آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوکاتایون پراکسیداز، آسکوربیت پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتاز) و غیر آنزیمی (اسید آسکوربیک، گلوکاتایون، کارتنوئیدها و توکوفرول) معمولاً سطوح ROS را در سلول در حد متعادل نگه می‌دارند (Al-aghaby *et al.* 2005). هدف از تحقیق حاضر، انتخاب جدایه‌ی برتر عامل مهار زیستی بیماری لکه زاویه‌ای برگ خیار در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای است.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه بیمارگر *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* و ارقام خیار

جدایه باکتری عامل بیماری لکه زاویه‌ای برگ خیار (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*, 3507) از کلکسیون میکروبی موسسه Landcare (ICMP) از کلکسیون نیوزلند تهیه گردید. Manaaki Whenua, Research رقم بومی خیار نیز از بانک ملی ژن موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید و مقاومت آن‌ها نسبت به آلودگی بیماری لکه زاویه‌ای خیار، مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون بیماری‌زایی

اثبات بیماری‌زایی با استفاده از روش واتمن و همکاران انجام گرفت. ابتدا بذرها با هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سپس در گلدان‌های پلاستیکی حاوی مخلوط خاک مزرعه، ماسه و کود پوسیده (۲: ۱: ۱) سترون شده، کشت داده شدند. در مرحله چهار برگی بوته‌های خیار، تحت شرایط دمای ۲۵

(Goszczyńska *et al.* 2000) انجام گردید. بررسی تولید آنزیم کیتیناز با استفاده از روش (Renwick *et al.* 1991) و همچنین تولید آنزیم سلولاز بر اساس روش (Kasana *et al.* 2008) انجام شد.

مطالعات گلخانه‌ای

آغشته سازی بذور رقم خیار بومی به باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از روش ولر و کوک انجام گرفت (Weller and Cook 1983). بعد از خشک شدن بذور آغشته شده به باکتری‌های پروبیوتیک در هوای آزاد، سوسپانسیون باکتری بیمارگر *Psl* با غلظت CFU/ml 10^7 اسپری شد و همچنین بعد از کشت بذور، 10^7 میلی‌لیتر از همان سوسپانسیون بیمارگر به گلدان‌ها اضافه گردید. برای اطمینان از آلودگی بوته‌های خیار، سوسپانسیون کشت تازه باکتری بیمارگر به غلظت CFU/ml 10^7 تهیه و توسط سوزن انسولین به برگ و ساقه گیاهچه‌های خیار در مرحله چهار برگی تزریق گردید. گلدان‌های کشت شده با بذر بدون باکتری بیمارگر (شاهد مثبت) و گلدان کشت شده با بذر آغشته به باکتری بیمارگر (شاهد منفی) در نظر گرفته شد. بعد از ثبت روزانه میزان بیماری به مدت ۵۰ روز، بوته‌های خیار برداشت و به آزمایشگاه منتقل گردید. در آزمایشگاه، طول ساقه، طول ریشه و وزن تر و خشک بوته‌ها اندازه‌گیری شد (Rafiei and Khodakaramian 2015).

بررسی اثر جدایه‌ها بر روی شاخص رشد از طریق رابطه (۱) محاسبه گردید. در این رابطه GT میزان رشد در گیاه تیمار و GC میزان رشد در گیاه شاهد سالم است (Rafiei and Khodakaramian 2015). ارزیابی بیماری در زمان‌های مختلف بر اساس میزان پوشش علائم روی برگ‌ها در مقیاس ۰ تا ۱۰۰ که به صورت درصد میزان بیماری نسبت به روز (day-%) ثبت می‌گردد و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بر اساس رابطه (۲) محاسبه شد. در این فرمول t_i فاصله زمانی اولین روز یادداشت برداری تا دومین روز یادداشت برداری، Y_i درصد میزان بیماری در اولین روز یادداشت برداری تا درصد میزان بیماری در دومین روز یادداشت برداری است که بصورت مجموع کل روزهای یادداشت

یکسان از هم کشت داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای معمول اتاق نگهداری و بعد از رشد مناسب لکه‌های باکتریایی، توسط پنبه آغشته به الکل ۹۶٪ از سطح تشک به طور کامل پاک شدند. به منظور حذف کامل باکتری‌ها، دو قطره کلروفورم به درب تشک‌ها ریخته شد به مدت ۲۰ دقیقه وارونه نگهداری شدند. به منظور حذف اثر کلروفورم، تشک‌ها بدون درپوش در شرایط استریل به مدت ۳۰ دقیقه در زیر هود، هوادهی شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری بیمارگر با غلظت CFU/ml 10^7 را به این تشک‌ها اضافه و به صورت چمنی پخش شدند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۲-۴۸ ساعت در دمای اتاق نگهداری و قطر هاله بازدارنده ایجاد شده اطراف جدایه‌های پروبیوتیک اندازه‌گیری شد. در این آزمون برای تیمار شاهد به جای باکتری بیمارگر از آب مقطر استفاده شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و میانگین داده‌ها در سطح احتمال ۱ درصد توسط آزمون دانکن مورد محاسبه قرار گرفت.

ارزیابی تولید ترکیبات مرتبط با عوامل مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی و باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه

ارزیابی تولید ترکیبات ضد میکروبی

برای ارزیابی تولید آمونوم توسط جدایه‌ها از روش (Cappuccino and Sherman 1992) و توانایی تولید سیانید هیدروژن از روش (Alstrom and Burns 1989) استفاده شد. ارزیابی تولید سیدروفور با استفاده از محیط کشت CAS-Agar (Alexander and Zuberer 1991) انجام گردید. اندازه‌گیری میزان تولید اکسین از روش (Bent *et al.* 2000) و برای بررسی توان جدایه‌ها در حل فسفات معدنی از محیط کشت پیکوسکایا (PVK) (Pikovskaya 1948) استفاده شد.

ارزیابی تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده

به منظور بررسی تولید آنزیم پروتئاز توسط جدایه‌ها از محیط Skim milk agar (SMA) مطابق روش (Maurhofer *et al.* 1995) استفاده شد. توانایی تولید آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و اوره‌آز با استفاده از روش

انجام شد (Roland and Laima 1999). آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و نمودارها با نرم افزار Excel 2010 ترسیم گردیدند، مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت (Duncan and Ferris 1983).

نتایج

آزمون بیماری‌زایی

با استفاده از آزمون بیماری‌زایی و بر اساس سیستم نمره‌دهی (Olczak-Woltman *et al.* 2009)، مقاومت ۶۹ رقم بومی خیار مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). ظهور علائم بیماری از روز دوم به تدریج شروع شد. علائم اولیه بیماری وجود لکه‌های ریز آب‌سوخته‌ای که به تدریج این لکه‌ها بزرگ‌تر شدند و به رگبرگ‌ها محدود شدند و حالت لکه زاویه‌ای برگ را ایجاد کردند. همچنین در اطراف بعضی از سوختگی‌های نکروزه، هاله کلروز نیز تشکیل شد و علائم فقط روی برگ‌ها و خصوصا برگ‌های پیرتر مشاهده شد. علائم از روز دوم شروع و تقریبا تا روز هفتم به حداکثر شدت بیماری رسید (شکل ۱). بر اساس آزمون اثبات بیماری‌زایی و سیستم نمره‌دهی رقم خیلی حساس KC56034 برای بررسی‌های مهار زیستی آزمایشگاهی و مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شد.



شکل ۱- علائم لکه زاویه‌ای، سبزرده‌ی و نکروتیک در برگ خیار مایه‌زنی شده با بیمارگر *Psl*

Figure 1: Symptoms of angular, chlorotic and necrotic spots on cucumber leaves inoculated with *Psl*.

برداری محاسبه می‌گردد (Wichmann *et al.* 2011). کارایی مهار زیستی با رابطه (۳) محاسبه گردید که DC میزان توسعه بیماری در گیاه شاهد آلوده و DT میزان توسعه بیماری در گیاهان تیمار شده با جدایه‌های پروبیوتیک است (Guo *et al.* 2004). همه آزمون‌ها در قالب بلوک‌های کاملا تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS 9.1 و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد (Duncan and Ferris 1983).

رابطه (۱)

$$GPE = [(GT - GC)/GC] \times 100 \text{ Growth Promotion Efficacy (}$$

رابطه (۲)

$$AUDPC = \sum_i [(Y_i + Y_{i-1}) \times (t_i - t_{i-1})] / 2 \text{ Area Under Disease Progress Curve, AUDPC (}$$

رابطه (۳)

$$BCE = [(DC - DT)/DC] \times 100 \text{ Biological Control Efficiency (}$$

زیست‌سنجی آنزیم‌های دفاعی

میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های دفاعی گیاه خیار در تیمار جدایه پروبیوتیک به تنهایی و در تیمار تعامل جدایه‌های پروبیوتیک و بیمارگر در مقایسه با شاهد آلوده (مایه زنی با بیمارگر) و شاهد سالم (بدون مایه زنی با بیمارگر) بررسی شد. فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، گایاکول پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز و تغییرات میزان فنل کل طی روزهای صفر (قبل از مایه زنی)، دو، چهار و هفت روز پس از مایه زنی مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه‌گیری از بافت برگ‌ی انجام شد. به منظور استخراج پروتئین کل و تعیین غلظت پروتئین از روش (Bradford 1976) و اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی پراکسیداز از روش (Reuveni 1995) استفاده شد. فعالیت آنزیمی فنیل آلانین آمونیلایز بر اساس روش (Zheng *et al.* 2005)، فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز بر اساس روش (Polle *et al.* 1994) و همچنین فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس روش (Nicoli *et al.* 1991) اندازه‌گیری گردید. سنجنش محتوای ترکیبات فنلی کل با روش فولین-سیاکالتیو^۱

جدول ۱- درجه مقاومت ارقام مختلف خیار بومی در برابر آلودگی *PsI* در سطح احتمال یک درصد بر اساس آزمون دانکن.

Table 1: Resistance degree of native cucumber cultivars against *PsI* at the level of 1% based on Duncan test.

Cucumber cultivar number	Degree of resistance	Cucumber cultivar number	Degree of resistance	Cucumber cultivar number	Degree of resistance
KC361001	resistant	KC361063	resistant	Kc56007	intermediate susceptible
KC361002	high resistant	KC361064	resistant	KC56008	resistant
KC361005	susceptible	KC361065	highly susceptible	KC56012	susceptible
KC361006	intermediate susceptible	KC361066	moderately resistant	KC56013	moderately resistant
KC361016	moderately susceptible	KC361076	moderately resistant	KC56014	intermediate susceptible
KC361022	moderately susceptible	KC361087	intermediate susceptible	KC56017	intermediate susceptible
KC361024	highly susceptible	KC361098	susceptible	KC56018	moderately susceptible
KC361025	moderately resistant	KC361120	resistant	KC56033	moderately resistant
KC361028	intermediate susceptible	KC361121	moderately resistant	KC56034	highly susceptible
KC361029	highly resistant	KC361122	susceptible	KC56043	highly susceptible
KC361030	susceptible	KC361126	intermediate susceptible	KC56044	susceptible
KC361031	highly susceptible	KC55947	highly susceptible	KC56092	moderately susceptible
KC361036	highly susceptible	KC55949	susceptible	Kc56094	highly susceptible
KC361038	intermediate susceptible	Kc55950	moderately susceptible	KC56097	resistant
KC361040	highly susceptible	KC55951	highly susceptible	KC56102	resistant
KC361042	resistant	KC55955	resistant	KC56117	susceptible
KC361043	susceptible	KC55962	moderately susceptible	KC56118	susceptible
KC361045	moderately resistant	KC55963	susceptible	KC56134	highly resistant
KC361047	highly resistant	KC55987	highly susceptible	TN-94-135	highly susceptible
KC361048	intermediate susceptible	KC55995	highly susceptible	TN-94-141	highly resistant
KC361053	highly susceptible	KC55996	moderately resistant	TN-94-154	susceptible
KC361060	resistant	KC56002	susceptible	TN-94-152	intermediate susceptible
KC361061	resistant	KC56005	susceptible	TN-94-162	intermediate resistant

جدایه‌های منتخب مورد بررسی شامل *Enterobacter*، *Pseudomonas fluorescens* VRPF 54، *Pseudomonas fluorescens* VRPF 738 و sp. VR 87 از کلکسیون بیماری‌شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه رفسنجان تهیه و جدایه *Pseudomonas fluorescens* 1 VRPF از خاک گلخانه جداسازی گردید. سه جدایه *Pseudomonas fluorescens* VRPF 54، VRPF 738 و VRPF 1 دارای کلنی‌های گرم رنگ روی محیط کشت آگار غذایی NA، گرم منفی، اکسیداز مثبت، هوازی اجباری (O/F) و قادر به تولید رنگ فلورسنت بر روی محیط کشت افتراقی King's B بودند. همچنین این سه جدایه در آزمون‌های آرژنین دی هیدرولاز و رشد در دمای ۴ درجه سلسیوس واکنش مثبت و در آزمون‌های فوق حساسیت روی

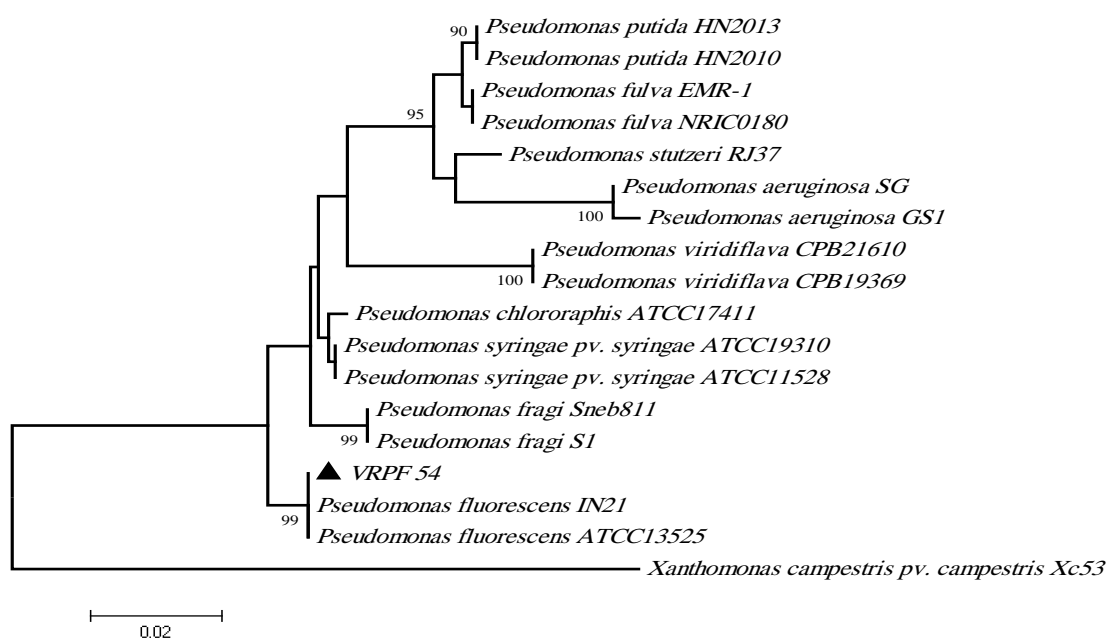
کشت متقابل (Dual culture)

از بین جدایه‌های موجود در کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ولی عصر رفسنجان و ۴۰ جدایه جداسازی شده از خاک ریزوسفر خیار گلخانه‌ای و تونلی مناطق جنوبی کرمان، چهار جدایه علیه عامل بیمارگر *PsI* روی محیط کشت آگار غذایی NA هاله بازدارنده تشکیل دادند. جدایه‌های 54 VRPF، 87 VR، 1 VRPF و 738 VRPF به ترتیب دارای میانگین هاله بازدارنده ۲/۲۱، ۲۵/۱۹، ۷۳/۱۸، ۶۶/۱۵ میلی‌متر در مقابل باکتری بیمارگر *PsI* بودند.

خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های پروبیوتیک

فیلوژنی با استفاده از هم ردیف سازی توالی بخشی از ناحیه 16S rDNA جدایه منتخب پروبیوتیک VRPF 54 و سایر جدایه‌های سودوموناس ثبت شده در بانک ژن، با روش Neighbor-Joining و با برنامه MEGA7 ترسیم شد. بر اساس درخت فیلوژنی ترسیمی بر پایه ناحیه 16S rDNA، جدایه پروبیوتیک VRPF 54 در کنار استرین‌های مرجع سودوموناس فلورسنس (IN21 و ATCC13525) با درجه اعتبارسنجی ۹۹ درصد قرار گرفت (شکل ۲).

توتون و رشد در دمای ۴۰ درجه سلسیوس واکنش منفی از خود نشان دادند. جدایه VR 87 دارای کلنی سفید مایل به کرم بر روی محیط کشت آگار غذایی NA، گرم منفی، اکسیداز منفی، بی‌هوازی اختیاری، عدم ایجاد واکنش فوق حساسیت روی توتون و ایجاد کلنی‌های سبز متالیک بر روی محیط کشت EMB بود. بخشی از ناحیه 16S rDNA جدایه VRPF 54 که با استفاده از جفت آغازگر R1492 و F27 توالی‌یابی گردیده بود با شماره دستیابی MW799823 در پایگاه NCBI ثبت شد. برای شناسایی دقیق مولکولی، درخت



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با ClustalW بر پایه روش Neighbor-Joining و بر اساس توالی ناحیه‌ی ژنی 16S rDNA. جدایه پروبیوتیک VRPF 54 با ▲ نشان داده شده است.

Fig 2. The phylogeny tree was generated by ClustalW (MEGA 7) and the neighbor-joining (NJ) method was used to construct the tree and it was shown based on partial sequence of 16S rDNA.

لیپاز و اوره‌آز را داشت. جدایه VRPF 1 قادر به تولید سیانید هیدروژن و آنزیم‌های لیپاز، فسفاتاز و اوره‌آز بود.

بررسی گلخانه‌ای

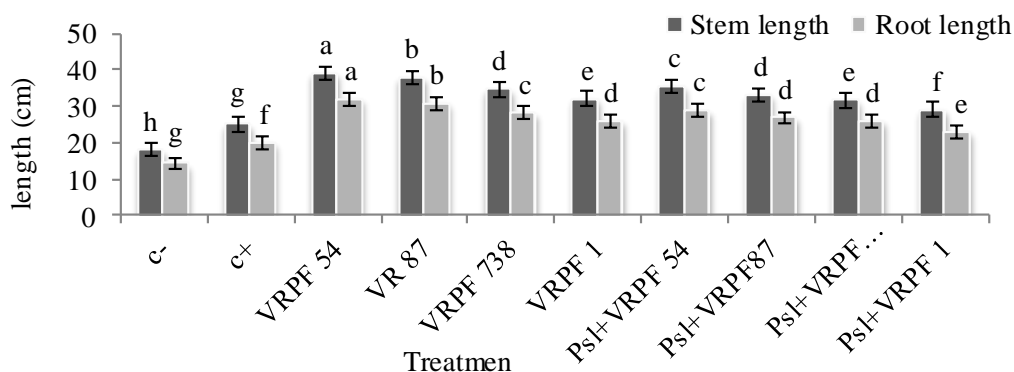
اثر جدایه‌ها در تیمارهای مختلف روی زیست توده بوته خیار در اشکال ۳ و ۴ نشان داده شده است. بیشترین میزان افزایش در زیست توده گیاه توسط جدایه‌های VRPF 54 و VR 87 ثبت شد و همه جدایه‌ها به تنهایی و توأم با بیمارگر *Psl* نسبت به شاهد سالم تفاوت معنی‌داری را نشان دادند. تا روز چهارم رشد بوته خیار،

بررسی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی

خصوصیات مهار زیستی جدایه‌ها که با تولید برخی از متابولیت‌های تحریک‌کنندگی رشد و فعالیت‌های آنزیمی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. هر چهار جدایه پروبیوتیک VRPF 54، VR 87، VRPF 1 و VRPF 738 قادر به تولید آمونیوم، فسفاتاز، سیدروفور و فاقد توان تولید کتیناز بودند. جدایه VRPF 54 همچنین قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز، پروتئاز و اوره‌آز بود. VR 87 آنزیم‌های آمیلاز، سلولاز، پروتئاز و هورمون اکسین را تولید کرد. جدایه VRPF 738 توانایی تولید آنزیم‌های

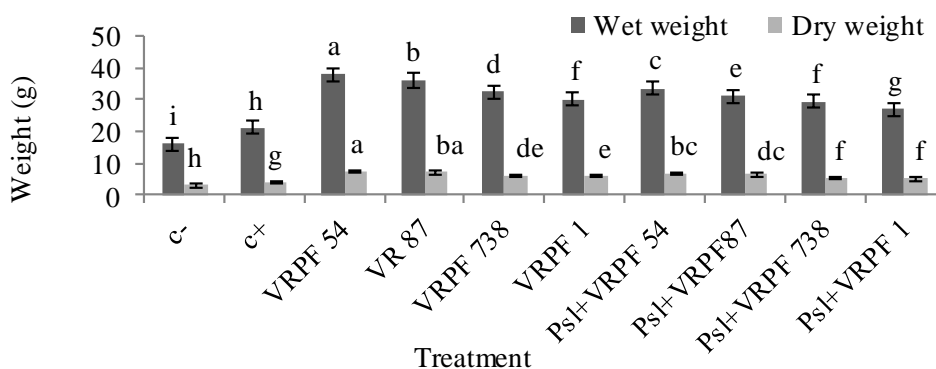
تازه‌سازی بیمارگر، جدایه‌های VRPF 54، VR 87، VRPF 1 و VRPF 738 میزان بیماری را به طور معنی‌داری ($P < 0.0001$) به ترتیب ۸۲/۹۱، ۶۱/۲۵، ۵۱/۶۶ و ۴۵/۸۳٪ نسبت به شاهد آلوده کاهش دادند (شکل ۵).

علائم بیماری به جز رشد ضعیف در شاهد آلوده *Psl* نسبت به دیگر تیمارها مشاهده نشد، اما بعد از مایه زنی مجدد بیمارگر *Psl* با سوزن انسولین به رگبرگ‌ها و ساقه خیار در طی ده روز (فاصل بین روز ۴۰ تا ۵۰ بعد از مایه زنی) علائم مشاهده شد. در این مدت ۱۰ روز بعد از



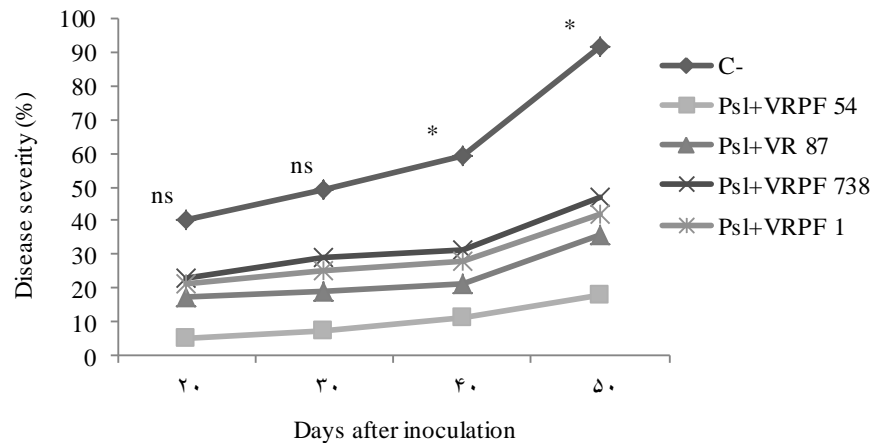
شکل ۳- میانگین ارتفاع اندام‌های هوایی و ریشه در تیمارهای مختلف گیاه خیار؛ گیاه آلوده (C⁻)، گیاه سالم (C⁺)؛ تیمار جدایه‌های پروبیوتیک (VRPF 738، VRPF 1، VR 87، VRPF 54) به تنهایی و توأم با بیمارگر *Psl*. حروف، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 3. The average length of shoot and root in different treatments of cucumber plant; Infected plant (C⁻), Un infected plant (C⁺); Treatment of bacterial antagonistic isolates (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) alone and in intraction with *Psl* pathogen. The letters indicate a significant difference at the 5% level based on the Duncan test.



شکل ۴- میانگین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه در تیمارهای مختلف گیاه خیار؛ گیاه آلوده (C⁻)، گیاه سالم (C⁺)؛ تیمار جدایه‌های پروبیوتیک (VRPF 738، VRPF 1، VR 87، VRPF 54) به تنهایی و توأم با بیمارگر *Psl*. حروف، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

Figure 4. The average fresh and dry weight of cucumber aerial parts and roots in different treatments of cucumber plant; Infected plant (C⁻), Un infected plant (C⁺); Treatment of bacterial antagonistic isolates (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) alone and in intraction with *Psl* pathogen. The letters indicate a significant difference at the 5% level based on the Duncan test.



شکل ۵- اثر جدایه‌های پروبیوتیک (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) بر کاهش شدت بیماری خیار مایه زنی شده با *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* در مقایسه با گیاه آلوده، * و ns نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشد.

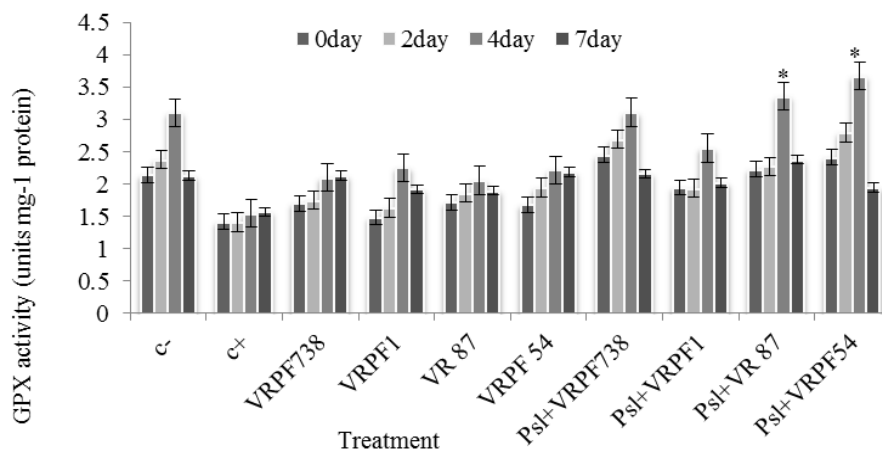
Figure 5. The effect of bacterial antagonistic isolates (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) on the reduction of cucumber disease severity inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in comparison with infected plant, * and ns indicate a significant difference at the 5% level based on the Duncan test.

روز صفر (قبل از مایه زنی) روند افزایشی داشته‌اند. این افزایش در روز چهارم بعد از مایه زنی به حداکثر میزان خود رسید و سپس رو به کاهش گذاشت. تیمار چهار جدایه پروبیوتیک VRPF 54, VR 87, VRPF 1 و VRPF 738 توأم با بیماری *Psl* بیشترین تأثیر و شاهد سالم کمترین تأثیر را در سطوح آنزیمی و محتوی فنل کل داشتند (شکل ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰).

نتایج

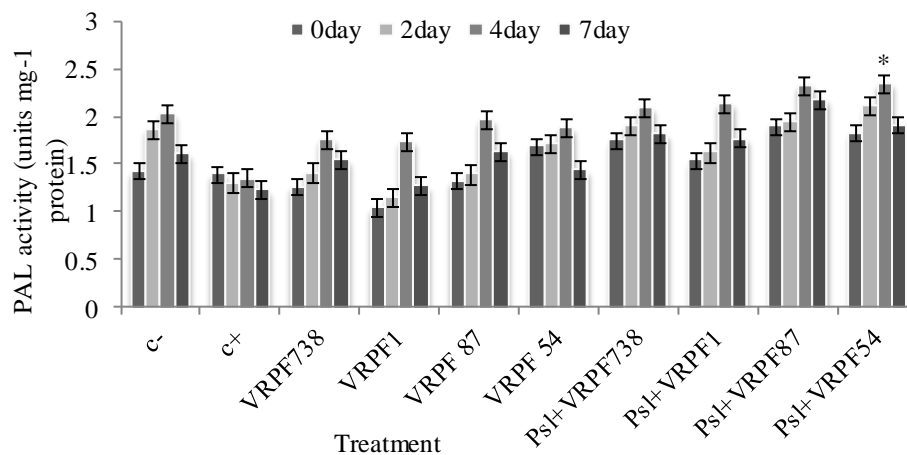
بررسی زیست‌سنجی آنزیم‌های دفاعی

حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌های پراکسیداز (POX)، گایاکول پراکسیداز (GPX)، فنیل آلانین آمونیلایز (PAL)، پلی فنل اکسیداز (PPO) و محتوی فنل کل (phenol) برگ‌های خیار نشان داد که در تمامی تیمارها، آنزیم‌های دفاعی و فنل کل در تمام روزهای نمونه برداری (۲، ۴ و ۷ روز بعد از مایه زنی) نسبت به



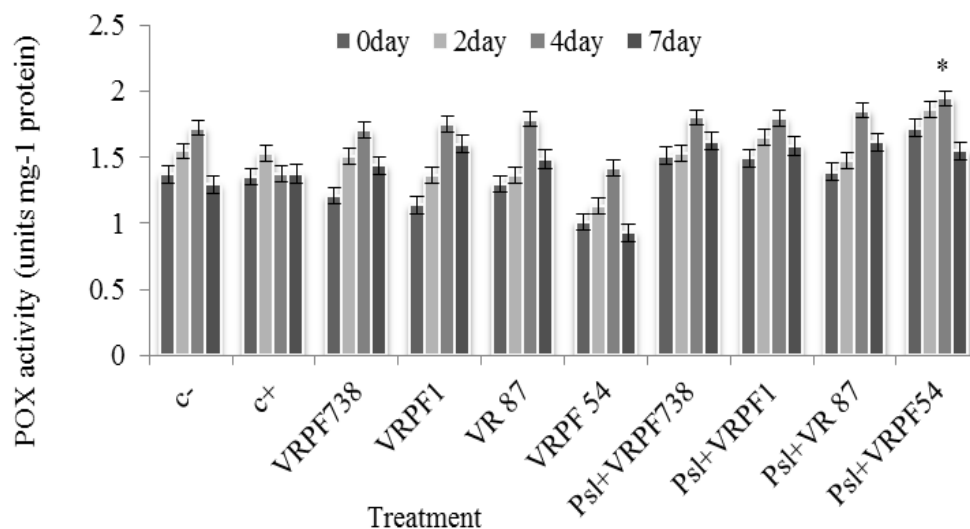
شکل ۶- فعالیت آنزیمی گایاکول پراکسیداز در تیمارهای مختلف گیاه خیار؛ گیاه آلوده (C⁻)، گیاه سالم (C⁺)، تیمار جدایه‌های پروبیوتیک (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) به تنهایی و توأم با بیمارگر *Psl* در زمان‌های صفر، دو، چهار و هفت روز پس از مایه زنی (* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن)

Figure 6. Enzymatic activity of guaiacol peroxidase in different treatments of cucumber plant; Infected plant (C⁻); Treatment of bacterial antagonistic isolates (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) alone and in infected plant (C⁺) in interaction with *Psl* pathogen at 0, 2, 4, and 7 days after inoculation (* indicate a significant difference at the 5% level based on the Duncan test.)



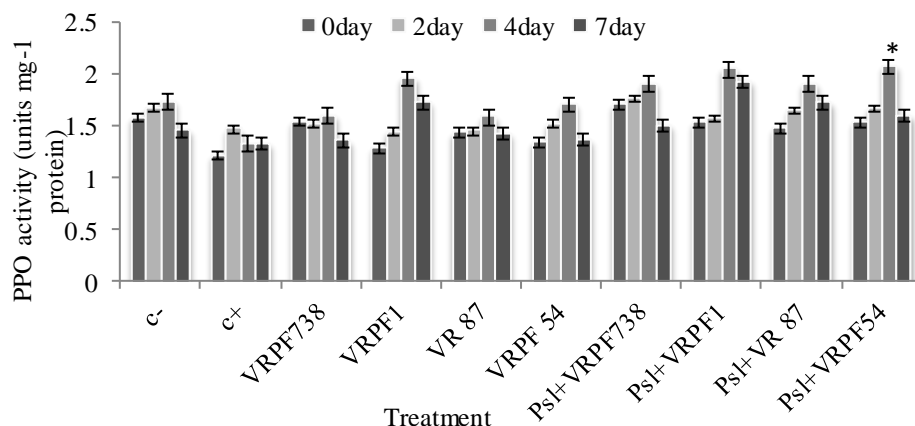
شکل ۷- فعالیت آنزیمی فنیل آلانین آمونیا لیز در تیمارهای مختلف گیاه خیار؛ گیاه آلوده (c^-)، گیاه سالم (c^+)؛ تیمار جدایه‌های پروبیوتیک (VRPF 738، VRPF 1، VR 87، VRPF 54) به تنهایی و توأم با بیمارگر *Psl* در زمان‌های صفر، دو، چهار و هفت روز پس از مایه زنی (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن)

Figure 7. Enzymatic activity of phenylalanine ammonia lyase in different treatments of cucumber plant; Infected plant (C^-), Un infected plant (C^+); Treatment of bacterial antagonistic isolates (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) alone and in interaction with *Psl* pathogen at 0, 2, 4, and 7 days after inoculation (* indicate a significant difference at the 5% level based on the Duncan test.)



شکل ۸- فعالیت آنزیمی پراکسیداز در تیمارهای مختلف گیاه خیار؛ گیاه آلوده (c^-)، گیاه سالم (c^+)؛ تیمار جدایه‌های پروبیوتیک (VRPF 738، VRPF 1، VR 87، VRPF 54) به تنهایی و توأم با بیمارگر *Psl* در زمان‌های صفر، دو، چهار و هفت روز پس از مایه زنی. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن).

Figure 8. Enzymatic activity of peroxidase in different treatments of cucumber plant; Infected plant (C^-), Un infected plant (C^+); Treatment of bacterial antagonistic isolates (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) alone and in interaction with *Psl* pathogen at 0, 2, 4, and 7 days after inoculation. (* indicate a significant difference at the 5% level based on the Duncan test).



شکل ۹- فعالیت آنزیمی پلی فنل اکسیداز در تیمارهای مختلف گیاه خیار؛ گیاه آلوده (C⁻), گیاه سالم (C⁺); تیمار جدایه‌های پروبیوتیک (VRPF 738, VRPF 1, VR 87, VRPF 54) به تنهایی و توأم با بیمارگر *Psl* در زمان‌های صفر، دو، چهار و هفت روز پس از مایه زنی. (* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن).

Figure 9. Enzymatic activity of polyphenol oxidase enzyme in different treatments of cucumber plant; Infected plant (C⁻), Un infected plant (C⁺); Treatment of bacterial antagonistic isolates (VRPF 54, VR 87, VRPF 1, VRPF 738) alone and in interaction with *Psl* pathogen at 0, 2, 4, and 7 days after inoculation. (* indicate a significant difference at the 5% level based on the Duncan test).

عنوان عوامل موفق مهار زیستی کردند (Mota et al. 2017). نتایج ارزیابی تولید متابولیت مهار زیستی در این پژوهش نشان داد که تولید سیدروفور و آنزیم فسفاتاز در تعامل چهار جدایه پروبیوتیک و بیمارگر *Psl* در خیار نقش اصلی را ایفا کرده است زیرا هر چهار جدایه این توانایی مشترک را به خوبی نشان دادند، هر چند جدایه VRPF 54 بیشترین توانایی در تولید سیدروفور و فسفاتاز را نشان داد.

توانایی جدایه‌های پروبیوتیک در فعالیت‌های مهار زیستی به توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات ضد میکروبی، تولید برخی آنزیم‌های تجزیه‌کننده، توانایی تولید سیدروفورهای میکروبی و قابلیت حل فسفات‌های نامحلول ارتباط دارد (Mota et al. 2017). مکانیسم اصلی بیوکنترول در سودوموناس‌های فلورسنت مربوط به تولید ترکیبات ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک است که به طور مستقیم با اثر روی فعالیت‌های حیاتی موجودات هدف موجب مهار زیستی آن‌ها می‌شوند (Delany et al. 2000). هر چند بسیاری از محققین معتقدند کلونیزه کردن سریع ریشه توسط باکتری‌ها اساس مهار زیستی است، کومپانت و همکاران در تحقیقات خود نشان دادند

بحث

در این مطالعه، جدایه‌های VRPF 54، VR 87، VRPF 738، VRPF 1، VRPF 54 به ترتیب دارای بیشترین میانگین هاله بازدارنده روی محیط کشت آگار غذایی و بیشترین درصد کنترل بیمارگر *Psl* روی گیاه خیار بودند. همچنین جدایه‌های VRPF 54، VR 87، VRPF 738، VRPF 1 به ترتیب دارای بیشترین درصد توانایی تحریک رشد گیاه بودند. بر اساس نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، جدایه VRPF 54 بیشترین توانایی مهار زیستی نسبت به دیگر جدایه‌ها علیه بیمارگر *Psl* را نشان داد و به عنوان جدایه برتر پروبیوتیک این پژوهش انتخاب شد. مطالعات متعدد مهار زیستی نشان داده است که غربالگری جدایه‌ها بر اساس نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای می‌تواند به عنوان یک معیار معتبر در انتخاب جدایه برتر پروبیوتیک مورد استفاده محققین قرار گیرد (Card et al. 2009; Pugliese et al. 2008; Hynes et al. 2008). در مطالعه موتا و همکاران جدایه‌های پروبیوتیک که دارای توانایی بیشتر در تولید ترکیبات ضد میکروبی در آزمایشگاه و خصوصیت تحریک کنندگی بیشتر رشد گیاه در گلخانه بودند را به

آنتی بیوز و تحریک سیستم دفاعی دو اصل اساسی در عمل PGPRs هستند (Compant et al. 2005).

پروبیوتیک‌ها اثر مثبت مستقیمی روی رشد گیاه با تولید ایندول استیک اسید دارند که موجب رشد سیستم ریشه‌ای گیاه و افزایش زیست توده گیاه می‌گردند (Patten and Glick 2002). نتایج آزمایشات گلخانه‌ای این پژوهش نشان داد که جدایه VRPF 54 با اینکه فاقد توان تولید ایندول استیک اسید بوده اما در سطح ۵٪ نسبت به دیگر جدایه‌ها به تنهایی دارای اثر محرک رشدی بیشتری روی زیست توده گیاهی داشته است. این اثر محرک رشدی جدایه VRPF 54 احتمالاً بخاطر توانایی تولید بیشتر سیدروفور و تولید آنزیم فسفاتاز بوده که توانایی کلنیزاسیون بیشتری ایجاد کرده است. عوامل مهار زیستی با حل فسفات‌های معدنی با کمک آنزیم فسفاتاز و تولید سیدروفورهای میکروبی که به ترتیب فسفر و آهن قابل استفاده را برای ریشه گیاه فراهم می‌کنند، سبب افزایش عملکرد محصولات زراعی می‌شوند (Vessey 2003). کلنیزاسیون گیاه توسط پروبیوتیک‌ها باعث ایجاد مقاومت القایی ISR در برابر بیمارگرهای مختلف با مکانیزم‌های دفاعی مختلفی مانند، تحریک رشد، تحمل فیزیولوژی گیاه، افزایش تولید آنزیم‌های دفاعی و فیتوالکسین‌ها و غیره می‌شود (Sahu et al. 2018). این نوع حفاظت وقتی جمعیت عامل پروبیوتیک در خاک به آستانه‌ی خاصی رسید، سبب القاء مکانیزم‌های مقاومت گیاه میزبان و بسیاری از آنزیم‌ها از جمله پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و محتویات فنلی در ارتباط با مقاومت القایی سیستمیک (ISR) می‌شود (Van Loon 1997). در این پژوهش، اندازه‌گیری سطح آنزیم‌های دفاعی و محتویات فنلی کل خیار تا روز چهارم روند افزایش و بعد روند کاهش را نشان داد. همچنین این نتایج نشان می‌دهد که هر چهار جدایه مورد بررسی پتانسیل القایی مقاومت ISR را دارند، اما با توجه به معنی دار شدن افزایش آنزیم‌ها در روز چهارم در تیمار جدایه VRPF 54 توأم با بیمارگر *Psl* نشان می‌دهد که این جدایه دارای پتانسیل بیشتر القایی مقاومت ISR است که به نظر می‌رسد به توانای این جدایه در تولید بیشتر سیدروفور ارتباط دارد. با توجه به اینکه از برگ‌های مختلف گیاه در نقاط دورتر از

محل مایه زنی استفاده شده و تغییرات آنزیمی و فاکتورهای مرتبط در واکنش مقاومت ISR معنی‌داری در آن‌ها مشاهده گردیده است. همچنین بیمارگر روی قسمت‌های هوایی گیاه ایجاد علائم می‌نماید. بنابراین تأییدی بر بروز واکنش ISR در تیمارهای مایه زنی شده است. نتایج این پژوهش با برخی پژوهش‌های پیشین مطابق بود؛ تیمار جدایه پروبیوتیک *Pseudomonas fluorescens* علیه *Curvularia clavata* در گیاه *Jatropha curcas* L.) باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، فنیل آلانین آمونیالیز، پلی فنل اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و فنل کل شد که بیشترین میزان فعالیت این آنزیم‌های و فنل کل در پنجمین روز پس از مایه زنی مشاهده گردید (Narmadhavathy et al. 2013). تیمار جدایه پروبیوتیک *Trichoderma asperellum* علیه *asperellum* pv. *lachrymans* در گیاه *Pseudomonas* در خیار باعث افزایش فیتوالکسین‌ها مانند فنول کل و آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیز و اکسیدازها شده است (Yedidia et al. 2003). آنزیم پراکسیداز در ریشه‌های خیار بعد از مایه زنی با باکتری *Sudomonas* علیه قارچ *Pythium aphanidermatum* افزایش یافت (Chen et al. 2000). مایه زنی گیاه لفل با *Bacillus subtilis* PA23 و *Pseudomonas chlororaphis* در برابر قارچ *Pythium aphanidermatum* موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های فنیل آلانین آمونیالیز، پلی فنل اکسیداز، پراکسیداز و فنل کل و همچنین افزایش زیست توده گیاه لفل شد (Nakkeeran et al. 2005). در آزمون گلخانه‌ای این پژوهش، تا روز چهارم رشد بوته خیار، علائم بیماری به جز رشد ضعیف در شاهد آلوده *Psl* نسبت به دیگر تیمارها مشاهده نشد. این نتیجه نشان داد که باکتری در گیاه به صورت سیستمیک است و علائم به صورت رشد ضعیف مشاهده می‌شود، اما در شرایط رطوبتی مناسب و با افزایش جمعیت بیمارگر به حد نصاب، علائم بیماری ظاهر می‌گردد (Kritzman and Zutra 1983).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق تأیید کرد که برای کاهش بیماری لکه زاویه‌ای خیار، می‌توان از عوامل

حل فسفات‌های معدنی و القای مقاومت در گیاه و در نتیجه کنترل بیماری لکه زاویه‌ای خیار، می‌توان کارایی این جدایه در شرایط مزرعه را بررسی نمود و به منظور تجاری‌سازی و تولید انبوه آن اقدام کرد.

پروبیوتیک استفاده کرد. با توجه به توان بالای باکتری پروبیوتیک 54 VRPF به واسطه داشتن خصوصیات تحریک‌کنندگی رشد گیاه و مکانیسم‌های آنتاگونیستی متنوع، مانند تولید سیدروفور، پروتئاز، آمیلاز، قابلیت

REFERENCES

- Ahemad M, Khan MS** (2012) Evaluation of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide stress. *Annals of Microbiology* 62(2): 1531-1540.
- Al-aghabary K, Zhu Z, Shi Q** (2005) Influence of silicon supply on chlorophyll content, chlorophyll fluorescence, and antioxidative enzyme activities in tomato plants under salt stress. *Journal of Plant Nutrition* 27: 2101-2115.
- Alexander DB, Zuberer DA** (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 2: 39-45.
- Aliye N, Fininsa C, Hiskias Y** (2008) Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). *Biological Control* 47: 282-288.
- Alstrom S, Burns RG** (1989) Cyanid production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils* 7: 232-238.
- Anonymous** (2020) Statistics on agriculture (2019 Crop year). Ministry of Jihad-e-Agriculture, Information and Communication Technology Center 3: 59-60. (In Persian).
- Bent E, Tuzan S, Chanway CP, Enebak S** (2000) Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 793-800.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV** (2003) Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91(2): 179-194.
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein dyebinding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cappuccino JG, Sherman N** (1992) *Microbiology: A Laboratory Manual*. Third ed. Benjamin/Cummings Publishing Companies based in New York. pp. 125-179.
- Card SD, Walter M, Jaspers MV, Szejnberg A, Stewart A** (2009) Targeted selection of antagonistic microorganisms for control of *Botrytis cinerea* of strawberry in New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 38(2): 183-192.
- Chen H, Jegadeesh N, Wermers R** (2000) The value of active mutual fund management: an examination of the stockholdings and trades of managers. *Journal of Financial and Quantitative Analysis* 35: 343-368.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA** (2005) Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71(9): 4951-4959.
- Delany I, Sheehan MM, Fenton A, Bardin S, Aarons S, O'Gara F** (2000) Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of pHLF as a transcriptional repressor. *Microbiology* 146: 537-546.
- Duncan LW, Ferris H** (1983) Validation of a model for prediction of host damage by two nematode species. *Journal of Nematology* 15: 227-234.
- Etebarian HR** (2008) *Vegetable diseases and methods of control*. Tehran University Press, Iran. (In Persian).
- Goszczynska T, Serfontein J, Serfontein S** (2000) Introduction to practical phytobacteriology; a manual for phytobacteriology. Safrinet, the Southern African (SADC) Loop of BIONET-International, ARC-Plant Protection Institute, Pretoria, South Africa.
- Guo JH, Qi HY, GuoYH, Ge HL, Gong LY, Zhang LX, Sun PH** (2004) Biocontrol of tomato wilt by plant growth promoting rhizobacteria. *Biological Control* 29(1): 66-72.
- Harighi B** (2007) Angular leaf spot of cucumber caused by *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Kurdistan. *Plant Disease* 91(6): 789.
- Hynes RK, Leung GC, Hirkala DL, Nelson LM** (2008) Isolation, selection, and characterization of beneficial rhizobacteria from pea, lentil, and chickpea grown in western Canada. *Canadian Journal of Microbiology* 54(4): 248-258.
- Kasana RC, Salwan R, Dhar H, Dutt S, Gulati A** (2008) A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's iodine. *Current Microbiology* 57: 503-507.

- Kritzman G, Zutra D** (1983) Systemic movement of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in the stem, leaves, fruits, and seeds of cucumber. *Canadian Journal of Plant Pathology* 5: 273-278.
- Lebeda A, Widrlechner M, Staub J, Ezura H, Zalapa J, Kristkova H** (2007) Cucurbits (Cucurbitaceae; *Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Citrullus* spp.). *Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement. Vegetable Crops* 3: 271-376.
- Maurhofer M, Keel C, Haas D, Defago G** (1995) Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology* 44: 40-50.
- Mota MS, Gomes CB, Souza Junior IT, Moura AB** (2017) Bacterial selection for biological control of plant disease: criterion determination and validation. *Brazilian Journal of Microbiology* 48: 62-70.
- Nakkeeran S, Kavitha K, Renukadevi P, Chandrasekar G, Fernando WGD** (2005) Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 16(4): 403-416.
- Narmadhavathy S, Vanitha S, Karthikeyan G, Raguchander T, Ramjegathesh R** (2013) Induced systemic resistance and their implications in host resistance to physic nut against leaf blight disease. *Molecular Microbiology Research* 3(3): 20-29.
- Newberry EA, Jardini TM, Rubio I, Roberts PD, Babu B, Koike ST, Bouzar H, Goss EM, Jones JB, Bull CT, Paret ML** (2016) Angular leaf spot of cucurbits is associated with genetically diverse *Pseudomonas syringae* strains. *Plant Disease* 100(7):1397-1404.
- Nicoli MC, Elizabe BE, Piotti A, Lericri CR** (1991) Effect of sugar and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry* 15:169-184.
- O'Brien JA, Daudi A, Butt VS, Bolwell GP** (2012) Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta* 236: 765-779.
- Olanrewaju OS, Glick BR, Babalola OO** (2017) Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 33: 1-16.
- Olczak-Woltman H, Bartoszewski G, Mądry W, Niemirowicz-Szczytt K** (2009) Inheritance of resistance to angular leaf spot (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) in cucumber and identification of molecular markers linked to resistance. *Plant Pathology* 58: 145-151.
- Parizi FM, Taghavi SM** (2015) Identification of the causal agent of angular leaf spot disease of cucumber and studying its phenotype characteristics and genetic diversity in Fars and Kerman provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51(1): 68-55 (In Persian).
- Patten CL, Glick BR** (2002) Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (8): 3795-3801.
- Pikovskaya RI** (1948) Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiology* 17: 362-370.
- Polle A, Otter T, Seifert F** (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway Spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology* 106(1): 53-60.
- Pugliese M, Liu BP, Gullino ML, Garibaldi A** (2008) Selection of antagonists from compost to control soil-borne pathogens. *Journal of Plant Diseases and Protection* 115(5): 220-228.
- Rafiei S, Khodakaramian G** (2015) Isolation and identification of cucumber rhizospheric fluorescent pseudomonads and evaluation of their antagonistic potential as biocontrol agents. *Biocontrol in Plant Protection* 3(2): 59-75 (In Persian).
- Rangarajan S, Saleena LM, Vasudevan P, Nair S** (2003) Biological suppression of rice disease by *Pseudomonas* spp. under saline conditions. *Plant and Soil* 251:73-82.
- Renwick A, Campbell R, Coe S** (1991) Assessment of in vivo screening systems for potential biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis*. *Plant Pathology* 40: 524-532.
- Reuveni R** (1995) Biochemical marker for disease resistance, In: Singh, RP and Singh US (ed), *Molecular Methods in Plant Pathology*. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 99-144.
- Roland SF, Laima SK** (1999) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1-5.
- Shaad NW, Jones JB, Chum w** (2001) Laboratory guid for identification of plant pathogenic bacteria. Thrid eds. Amer. Phytopathology Society, St, Paul Minnesota, USA.
- Sahu B, Singh J, Shankar G, Pradhan A** (2018) *Pseudomonas fluorescens* PGPR bacteria as well as biocontrol agent: A review. *International Journal of Chemical Studies* 6(2): 01-07.
- Sirko A, Brodzik R** (2000) Plant ureases: roles and regulation. *Acta Biochimica Polonica* 47(4): 1189-1195.
- Van Loon LC** (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753- 765.
- Vessey JK** (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.

- Weller DM, Cook RJ** (1983) Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73: 463-469.
- Wichmann F, Muller BH, Widmer F, Boller B, Studer B, Kolliker R** (2011) Phenotypic and molecular genetic characterization indicate no major race-specific interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *graminis* and *Lolium multiflorum*. *Plant Pathology* 60: 314-324.
- Yedidia I, Shores M, Kerem Z, Benhamou N, Kapulnik Y, Chet I** (2003) Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Applied and Environmental Microbiology* 69(12): 7343-7353.
- Zheng HZ, Cui CI, Zhang YT, Wang D, Jing Y, Kim KY** (2005) Active changes of lignifications-related enzymes in pepper response to *Glomus intraradices* and/or *Phytophthora capsici*. *Journal of Zhejiang University Science* 6(8): 778-786.