نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هفتم، شماره چهارم، ۱۳۹۹
۱۵۱-۱۶۳
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2020.17155.2577

اثر پرایمینگ زیستی بذر پنبه توسط *Pseudomonas fluorescens* بر جوانه‌زنی، رشد گیاهچه و تحریک مقاومت به بیماری مرگ گیاهچه پنبه ناشی از *Rhizoctonia solani*

***سید اسماعیل رضوی**
گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰٤/۱٦

چکیده

سابقه و هدف: مجموعه بیماری گیاهچه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پنبه در بیش‌تر مناطق کشت آن می‌باشد. قارچ خاک‌زی *Rhizoctonia solani* شاخص‌ترین و مهم‌ترین بیمارگر در ایجاد این بیماری است که بنیه گیاه را کاهش می‌دهد. از طرفی، مایه‌زنی بذرها یا ریشه توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* برای افزایش بنیه گیاه و رشد به‌طور وسیع مطالعه شده است. در این مطالعه قابلیت بازدارندگی چهار جدایه از *P. fluorescens* از رشد قارچ در محیط درون‌شیشه‌ای و استفاده از آن‌ها برای جلوگیری از آلودگی *R. solani* در ریزوسفر گیاه پنبه بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: به‌منظور مهار مرگ گیاهچه‌های پنبه ناشی از قارچ *R. solani*، تأثیر پرایمینگ بذر با چهار جدایه از باکتری *P. fluorescens* در رابطه با جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه و میزان آلودگی به قارچ بیمارگر مذکور در سه رقم پنبه (ساحل، گلستان و ورامین) مورد بررسی قرار گرفت. بذرهای پنبه پس از غوطه‌ور شدن در سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 cfu به‌مدت ۱۵ دقیقه، در تشتک‌ها و دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند و پس از ۷ روز اثر باکتری بر درصد جوانه‌زدن بررسی شد. تأثیر آغشته‌سازی خاک با *P. fluorescens* نیز بر رشد گیاه و میزان آلودگی در گلدان و با استفاده از خاک آلوده صورت گرفت. در این پژوهش ویژگی‌های مهار زیستی باکتری‌ها در رابطه با تولید ترکیب‌های فرّار و غیرفرّار، سیدروفور، سیانیدهیدروژن و اسید ایندول استیک نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که تولید اسید ایندول استیک، سیدروفور و سیانید هیدروژن در بین جدایه‌های باکتری مورد بررسی به‌طور معنی‌داری متفاوت است. تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده نیز افزایش معنی‌دار جوانه زدن بذر، رشد ریشه، ساقه و وزن خشک گیاه و کاهش شاخص بیماری را در حضور باکتری نشان داد. میزان فنل کل و فعالیت پراکسیداز ریشه به‌طور معنی‌داری توسط تیمار با باکتری افزیش یافته و ارتباط معکوس آن‌ها با شاخص بیماری قابل مشاهده بود. تأثیر جدایه‌های باکتری بر صفات مورد بررسی متفاوت بود و بیش‌ترین ارتباط با میزان تولید IAA و تولید ترکیب‌های غیرفرّار بوده است (ضریب پیرسون ۸۲-۵۲)، اما تأثیر جدایه‌های باکتری بر رفتار ارقام پنبه مورد مطالعه معنی‌دار نبود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که برخی از استرین‌های *P. fluorescens* ممکن است به‌عنوان آنتاگونیست *R. solani* در نظر گرفته شوند و استقرار گیاهچه و سلامت گیاه را تسهیل کنند. بهبود رشد گیاهچه و تحریک مقاومت علیه

* مسئول مکاتبه: razavi@gau.ac.ir

R. solani پنبه به احتمال زیاد نتیجه تولید آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچ و هورمون رشد می‌باشد. از این‌رو، استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان یک رهیافت زیست‌فن‌آور برای بهبود مقاومت به بیماری مرگ گیاهچه پنبه پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پنبه، فنل کل، مهار زیستی، IAA، *Pseudomonas*

مقدمه

پنبه یکی از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی است که توسط بشر اهلی شده است. این گیاه جهت استفاده از الیاف آن در حدود ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد کشت می‌شد. گیاه پنبه در طول دوره رشد به بیماری‌های مختلفی مبتلا می‌شود که اهمیت هر یک از آن‌ها به نوع بیماری، رقم پنبه مورد کشت، اعمال روش‌های زراعی و شرایط محیطی بستگی دارد (۲۸). بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های مهم پنبه در مناطق مختلف کشت آن می‌باشد و همه ساله خسارت زیادی به مزارع پنبه وارد می‌کند. این بیماری به‌وسیله مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زا، به‌ویژه قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn به وجود می‌آید (١٤ و ١٦). با توجه به ماهیت خاک‌زی بودن عوامل مرگ گیاهچه و عدم کاربرد صحیح روش‌های شیمیایی مثل پوشش‌دادن بذر با سموم شیمیایی یا سم‌پاشی مزرعه، استفاده از این روش‌ها نتیجه رضایت‌بخشی به‌همراه ندارد (۱۳). هم‌چنین ایجاد مقاومت قارچ‌ها و باکتری‌ها به سموم مختلف توجه پژوهشگران را به مهار زیستی به‌ویژه استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست جلب کرده است (۲).

آنتاگونیست‌ها به‌واسطه یک‌سری سازوکارهای متنوع که می‌توانند موضعی یا سیستمیک باشند از گیاهان در برابر آلودگی عوامل بیماری‌زا محافظت می‌نمایند. در مقاومت القاشده سیستمیک[1] سازوکارهای دفاع گیاهان به‌وسیله پیش‌تیمار آن‌ها با عوامل زیستی یا شیمیایی تحریک می‌شوند (۲٦). در این حالت، مقاومت تحریک شده به قسمت‌های سالم گیاه منتقل می‌گردد و در نتیجه مقاومت نسبت به دامنه وسیعی از عوامل بیماری‌زا به وجود می‌آید. بنابراین پیش‌تیمار گیاهان با عوامل غیربیماری‌زا (القاکننده زنده) یا ترکیب‌های شیمیایی (القاکننده‌های غیرزنده) می‌تواند مقاومت گیاهان را نسبت به بیمارگر در محل تیمار و در بافت‌های مجزا از محل اولیه آلودگی افزایش دهد (٦ و ۱۰).

در بین عوامل زیستی تحریک‌کننده مقاومت، باکتری‌ها مدل مناسبی برای مهار زیستی عوامل بیماری‌زا به‌شمار می‌روند (۷). جدایه‌هایی از باکتری‌های *P. fluorescens* معمولاً به‌صورت هوازی رشد می‌کنند و تنوع تغذیه‌ای و بوم‌شناختی زیادی دارند. این باکتری‌ها به‌طور معمول در آب و خاک زیست می‌کنند و از ریشه تعداد زیادی از گیاهان جدا شده‌اند و به‌عنوان عوامل مهار زیستی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱). جدایه‌های مختلف *P. fluorescens* می‌توانند عوامل بیماری‌زا را به‌طور مستقیم با تولید ترکیب‌های آنتی‌بیوتیک، سیدروفورها، سیانیدهیدروژن و آنزیم پروتئاز و یا غیرمستقیم با تحریک مقاومت سیستمیک تحت‌تأثیر قرار دهند (۲). گونه‌های جنس *Pseudomonas* علاوه بر مهار عوامل بیماری‌زا، رشد گیاه را نیز افزایش می‌دهند (۳۰). تأثیر مثبت این باکتری‌ها روی سایر ریزجانداران مفید خاک و قارچ‌های میکوریز و تولید بعضی از تنظیم‌کننده‌های رشد به‌ویژه اسید ایندول استیک از سازوکارهای مؤثر در افزایش رشد گیاه می‌باشد (۱۲ و ۱۵).

1- Induced systemic resistance= ISR

با توجه به اهمیت کشت پنبه در استان گلستان و نظر به اهمیت بیماری مرگ گیاهچه پنبه با عامل *R. solani* در این منطقه، در این پژوهش به‌کارگیری *P. fluorescens* جهت مهار بیماری مدنظر قرار گرفت. از طرفی با توجه به اهمیت شناخت سازوکار باکتری‌ها در مهار بیماری‌های گیاهی، القای مقاومت گیاهان از جنبه زیست-شیمیایی با بررسی محتوای فنل کل، فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز و میزان تولید IAA ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه *R. solani*: جدایه بیماری‌زای *R. solani* AG4 از کلکسیون قارچ‌های گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. این جدایه از پنبه ساحل در منطقه کردکوی (استان گلستان) جداسازی شده بود. نگه‌داری جدایه مذکور روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار[1] (PDA) و دمای ۷-۵ درجه سلسیوس بوده است.

جدایه‌های *P. fluorescens*: جدایه‌های *P. fluorescens* از بخش گیاه‌پزشکی پردیس دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی کرج (اهدایی س.م. اخوت) تهیه شد. این جدایه‌ها از ناحیه ریزوسفر گیاهان زراعی کرج جداسازی شده بود. نگه‌داری باکتری‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار[2] (NA) در دمای ۷-۵ درجه سلسیوس بوده است.

تهیه زادمایه و خاک آلوده به *R. solani*: ابتدا ماسه و آرد ذرت به نسبت ۹ به ۱ مخلوط و به‌ازای ۱۰۰ گرم از مخلوط به‌دست آمده ۱۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد، سپس ظروف حاوی مخلوط فوق در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از خنک شدن، ۳ قطعه ۵ میلی‌متری از حاشیه محیط کشت ٤ روزه بیمارگر به مخلوط حاصل اضافه گردید و ظروف در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ٤ هفته نگه‌داری شدند. زادمایه به‌دست آمده با خاک سترون شده به نسبت ۱/۵ درصد وزنی مخلوط گردید (۹). برای گلدان‌های شاهد از مخلوط آرد ذرت و ماسه سترون فاقد عامل بیماری استفاده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری *P. fluorescens*: باکتری در ارلن حاوی محیط کشت نوترینت براث[3] (NB) به‌مدت ٤٨ ساعت روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق تهیه شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ٤۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و باکتری‌های ته‌نشین شده در لوله سانتریفوژ با آب مقطر سترون شست‌وشوی و عدد جذب سوسپانسیون حاصل به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری با غلظت موردنظر در این پژوهش (10^9 cfu) در طول موج ۵۹۰ نانومتر از OD= 0.06 استفاده شد (۲۹).

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر جوانه‌زدن بذر: بذرهای پنبه برای ۲ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد ضدعفونی و سپس شش بار با آب مقطر شسته شدند. به‌منظور پوشش بذرها با سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست حاوی ۰/۵ درصد کربوکسی متیل سلولز تهیه شد. بذرها به تناوب چندین بار در سوسپانسیون مذکور قرار گرفتند و زیر هود لامینار خشک شدند برای تیمار شاهد، بذرها فقط با محلول کربوکسی‌متیل سلولز ۰/۵ درصد پوشیده شدند (۲۷). درصد جوانه‌زنی بذر با استفاده از چهار تکرار ۵۰تایی بذر در تشتک‌ها روی کاغذ صافی واتمن مرطوب شده با آب مقطر استریل طی ۷ روز در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی صورت گرفت و

1- Potato dextrose agar =PDA
2- Nutrient agar=NA
3- Nutrient broth=NB

بذرهایی با ریشه‌چه بزرگ‌تر از ۵ میلی‌متر به‌عنوان جوانه‌زده شمارش شدند (۱۱).

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر آلودگی به قارچ بیمارگر در شرایط گلخانه: بذر پنبه رقم‌های ساحل، گلستان و ورامین از مؤسسه تحقیقات پنبه کشور تهیه شد. بذرها ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت ٤ دقیقه ضدعفونی شدند و پس از سه مرتبه شست‌وشو توسط آب مقطر سترون، در گلدان‌های حاوی خاک موردنظر کشت شد. در آزمون تیمار خاک با توجه به تأثیر بیش‌تر آغشته‌سازی خاک به باکتری آنتاگونیست (۱)، از ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری برای هر گلدان استفاده شد. سوسپانسیون باکتری در گلدان‌ها پای بذر کشت‌شده ریخته شد (خیساندن خاک). گلدان‌ها در گلخانه با دمای مناسب برای رشد قارچ و گیاه (دمای روزانه و شبانه به‌ترتیب ۲۹ و ۱۷ درجه سلسیوس) تا ظهور علائم نگه‌داری شدند. پس از ۳۵ روز از کاشت بذرها در گلدان (اواسط دوره رویشی)، طول ساقه، ریشه، وزن خشک گیاه و درصد شاخص بیماری محاسبه گردید. به‌منظور محاسبه وزن خشک گیاه، بوته‌ها به‌مدت ٤۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سلسیوس خشک شدند و وزن آن‌ها توسط ترازو با دقت یک‌هزارم اندازه‌گیری شد. درجه‌بندی بوته‌ها از نظر مرگ گیاهچه بر اساس درصد تغییر رنگ ریشه و ساقه و مقیاس ۳-۰ (۰= بدون آلودگی، ۱- زخم‌های سطحی روی ساقه، ۲- زخم‌های فرورفته روی ساقه و پژمردگی، ۳- مرگ کامل گیاهچه) انجام شد (۲۷).

تولید فرآورده‌های میکروبی

قدرت بازدارندگی باکتری از رشد قارچ بیمارگر: بررسی توان بازدارندگی باکتری از رشد قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی به روش کیل و همکاران (۱۹۹٦) صورت گرفت (۱۷). در این روش، باکتری به‌صورت نقطه‌ای روی محیط کشت PDA به‌فاصله ۰/۵ سانتی‌متر از لبه تشتک کشت داده شد و سه روز بعد قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ *R. solani* در وسط تشتک پتری قرار گرفت. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری به‌مدت ۷ روز در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگه‌داری شدند. برای مقایسه قدرت بازدارندگی، فاصله پرگنه باکتری تا میسیلیوم قارچ اندازه‌گیری و میانگین مورد مقایسه قرار گرفت.

تولید سیدروفور و سیانیدهیدروژن: به‌منظور بررسی تولید سیدروفور، از روش اسپکتروفتومتری بر اساس میزان تولید پایوردین استفاده شد (۲۱). سیانیدهیدروژن نیز به روش آلستروم (۱۹۸۷) و بر اساس تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف پیکرات سدیم بوده است (٤). تغییر رنگ کاغذ صافی با درجه‌بندی ۱ تا ٤ (کِرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و آجری) مشخص شد.

تولید ترکیب‌های غیرفرّار: به‌منظور بررسی تولید ترکیب‌های ضدقارچی غیرفرّار، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ باکتری روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار پخش شد و تشتک‌ها در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگه‌داری شدند. پس از ۳ روز، پرگنه باکتری توسط آب مقطر سترون و میله شیشه‌ای از سطح محیط شسته و تشتک‌ها به‌مدت ٤۵ دقیقه در محیط واجد پنبه آغشته به کلروفرم قرار گرفتند. سپس یک حلقه به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت ٤ روزه قارچ بیمارگر در وسط هر تشتک پتری کشت شد. تشتک‌های پتری در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگه‌داری شدند و پس از ۷ روز درصد بازدارندگی رشد پرگنه اندازه‌گیری گردید (۱۸). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

تولید ترکیب‌های فرّار: به‌منظور بررسی تولید ترکیب‌های فرّار، در مرحله اول ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون غلیظ باکتری توسط میله شیشه‌ای بر سطح محیط کشت PDA پخش شد و تشتک‌ها به‌مدت ۳ روز در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگه‌داری شدند. در مرحله دوم، حلقه‌هایی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه کشت چهار روزه قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌های پتری حاوی کشت PDA قرار گرفت. سپس تشتک‌های پتری حاوی قارچ به‌طور وارونه روی تشتک‌های پتری حاوی باکتری آنتاگونیست قرار داده شد و لبه تشتک‌ها توسط نوار پارافیلم کاملاً مسدود گردید. تشتک‌های پتری در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگه‌داری شدند و پس از ۷ روز درصد بازدارندگی رشد میسلیوم اندازه‌گیری گردید (۱۸). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد.

تولید هورمون اکسین: برای ارزیابی تولید هورمون اکسین، کشت ۷۲ ساعت باکتری در محیط کشت تریپان سویا براث[1] با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد و یک میلی‌لیتر از محلول رویی به چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی[2] (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ ۹۸ درصد، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر کلیریآهن نیم مولار ($FeCl_3.6H_2O$) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگه‌داری شد و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار تولید هورمون با منحنی استاندارد IAA محاسبه شد (۲۲).

اندازه‌گیری فنل کل: غلظت فنل کل در یک گرم از بافت مورد نظر به روش مالنسیک و همکاران (۲۰۰۷) بر اساس تغییر رنگ عصاره فنلی توسط معرف فولین- سیوکالتو و کربنات سدیم ۲۰ درصد انجام شد (۲۰). در این رابطه، پس از مخلوط شدن ۰/۱ تا ۰/٤ میلی‌لیتر از عصاره الکلی استخراج شده با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتو، مقدار جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. برای تهیه منحنی استاندار از اسیدگالیک استفاده شد و فنل کل بر حسب میلی‌گرم اسید گالیک در یک گرم ریشه خشک به‌دست آمد.

اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز: ریشه‌های نمونه‌برداری‌شده ابتدا آب‌گیری سطحی شدند و مقدار ۰/۵ گرم از ریشه در هاون چینی سرد با استفاده از ازت مایع به‌صورت پودر نرمی ساییده شد. سپس یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH =٦) به آن اضافه و کاملاً یکنواخت گردید. عصاره حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و رونشست به‌عنوان عصاره پروتئینی جدا شد (۲۵). ارزیابی فعالیت پراکسیداز بر اساس اکسیداسیون گوایکول و تغییر رنگ محلول به نارنجی متمایل قرمز به روش چنس و مالی (۱۹۵۵) انجام شد (۸). محلول واکنش شامل ۵۷۸ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH=۵)، ۱۲۵ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH=۵) حاوی گوایکول ۵۰ میلی‌مول و ۵ میکرولیتر عصاره پروتئینی گیاهچه بود. این محلول پس از اختلاط کامل در کیووت ریخته و برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر برای یک برنامه کینتیک تنظیم گردید که به‌مدت یک دقیقه و در فواصل ۱۰ ثانیه، تغییر در میزان جذب نور محلول را ثبت کند. سپس ۵۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۰/۱ مولار (pH=۵) حاوی پراکسیدهیدروژن (۳۰ درصد) ۱۰ میلی‌مول به محلول درون کیووت اضافه شد، پس از اختلاط مختصر بلافاصله در دستگاه اسپکترومتر

1- Tryptone Soybean Broth=TSB
2- Salkowski reagent

به‌مدت یک دقیقه و در فواصل ۱۰ ثانیه، تغییر میزان جذب نور در طول موج حداکثر ٤۷۰ نانومتر ثبت شد. در نهایت میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز به‌صورت تغییر میزان جذب نور در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین کل محاسبه گردید (۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: این مطالعه در چهار تکرار به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط آزمایشگاهی اجرا گردید و داده‌های به‌دست آمده تجزیه واریانس (ANOVA) شده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال P≤۰/۰۵ انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R 3.5.0 صورت گرفت و ترسیم شکل‌ها توسط نرم‌افزار Excell نسخه ۲۰۰۷ انجام شد.

نتایج و بحث

تولید فرآورده‌های میکروبی: نتایج حاصل از ارزیابی میزان تولید هورمون اکسین توسط باکتری *P. fluorescens* نشان داد که چهار جدایه از باکتری مورد مطالعه قادر به تولید IAA می‌باشند، اما این جدایه‌ها از نظر میزان تولید IAA متفاوت بوده‌اند و از نظر آماری در چهار گروه مختلف قرار می‌گرفتند (جدول ۱). به‌طوری‌که کم‌ترین میزان تولید IAA مربوط به جدایه ۱ (٤/۹۳ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و بیش‌ترین آن مربوط به جدایه ٤ (۱٤/٦۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) بود.

نتایج به‌دست آمده از آزمون تولید سیدروفور نشان داد که جدایه‌های *P. fluorescens* قابلیت خوبی در تولید سیدروفور داشتند. میزان تولید سیدروفور از ۱/۰۹ تا ۱/۳٦ میکرومول پایوووردین متفاوت بود (جدول ۲). تأثیر ممانعتی ترکیب‌های فرّار و غیرفرّار تولید شده بر قارچ بیمارگر بین جدایه‌های *P. fluorescens* متفاوت بود و به‌ترتیب در دامنه ۳۰-۲٦ و ٤۵/۵-۵۷/۵ درصد متغیر بود (جدول ۱).

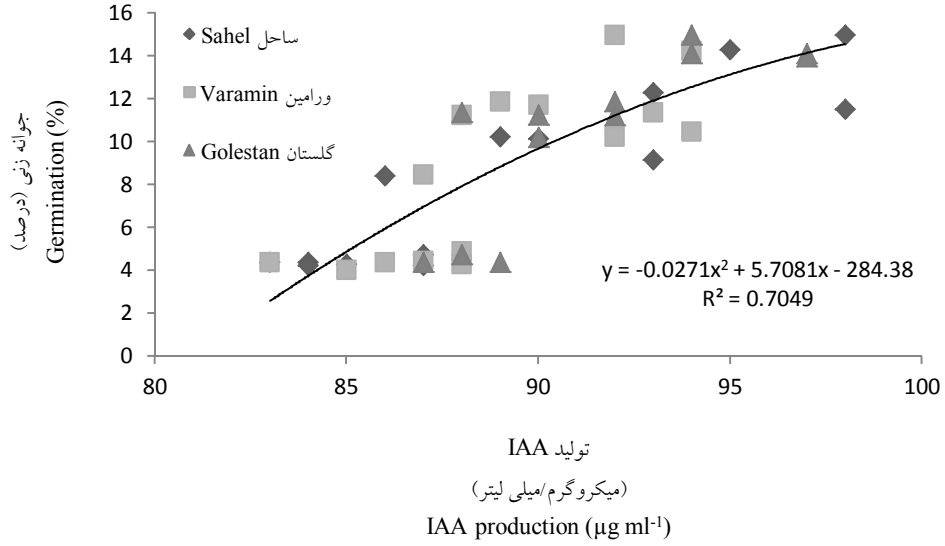
نتایج هم‌چنین بیانگر توان تولید سیانیدهیدروژن توسط جدایه‌های باکتری مورد مطالعه بوده است (جدول ۱). بررسی همبستگی بین فرآورده‌های میکروبی مورد بررسی نشان داد که همبستگی معنی‌دار (۰/۷۹۲) تنها به تولید IAA با اثر ممانعتی ترکیب‌های غیرفرّار مربوط است.

تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر آلودگی به قارچ بیمارگر در شرایط گلخانه: نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که رقم ساحل نسبت به رقم‌های گلستان و ورامین از مقاومت بیش‌تری در مقابل آلودگی به قارچ *R. solani* برخوردار است (جدول ۲). تأثیر جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* مورد استفاده بر کاهش شاخص بیماری متفاوت بود. در این رابطه، جدایه ۱ و جدایه‌های ۳ و ٤ به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تأثیر را در کاهش آلودگی داشته‌اند. بررسی همبستگی بین متابولیت‌های میکروبی مورد بررسی نشان داد که همبستگی معنی‌دار شاخص بیماری به تولید IAA و اثر ممانعتی ترکیب‌های غیرفرّار مربوط است (جدول ۳).

تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر ویژگی‌های رشد در شرایط گلخانه: ویژگی‌های رشد در سه رقم پنبه مورد مطالعه در خاک شاهد (فاقد قارچ بیمارگر و باکتری آنتاگونیست) در سطح احتمال ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود و بیش‌ترین طول ریشه، ساقه و وزن خشک کل به‌ترتیب به رقم‌های ساحل، گلستان و ساحل مربوط بوده است. ویژگی‌های رشد در حضور باکتری آنتاگونیست در خاک واجد یا فاقد قارچ بیمارگر افزایش داشت (جدول ۲). تأثیر جدایه‌های باکتری بر ویژگی‌های رشد دارای اختلاف معنی‌دار بوده است، اما تأثیر باکتری × رقم اختلاف معنی‌داری نبود. بررسی همبستگی بین فرآورده‌های میکروبی مورد بررسی نشان داد که همبستگی معنی‌دار

ویژگی‌های رشد به تولید IAA و اثر ممانعتی ترکیب‌های غیرفرّار مربوط است (جدول ۳).

بررسی تغییرات کمّی ترکیب‌های فنل کل و تغییرات آنزیم پراکسیداز: نتایج مربوط به پاسخ‌های دفاعی نشان داد که بین تیمارها در محتوای ترکیب‌های فنل کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز ریشه اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد وجود دارد (جدول ۲) و بالاترین سطح میزان ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهان تیمار شده با باکتری آنتاگونیست و قارچ بیمارگر مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد که باکتری به تنهایی القاگر خوبی برای پاسخ‌های دفاعی نمی‌باشد، اما زمانی که خاک گلدان‌ها به قارچ بیمارگر آلوده شد، میزان ترکیب‌های فنلی افزایش قابل‌توجهی داشت (جدول ۲). همبستگی معنی‌داری بین فنل کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز با شاخص بیماری مرگ گیاهچه پنبه در سه رقم مختلف پنبه معنی‌دار بود (شکل ۲).



شکل ۱- تأثیر IAA تولید شده توسط جدایه‌های *P. fluorescens* بر درصد جوانه‌زنی بذر سه رقم از پنبه پس از ۵ روز.

Fig. 1. The effect of IAA production by *P. fluorescens* isolates on the percentage of seed germination after 5 days.

جدول ۱- تولید IAA و ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *P. fluorescens* در شرایط آزمایشگاه.

Table 1. *In vitro* screening of IAA production and antagonistic activity of *P. fluorescens* isolates.

جدایه باکتری Bacterial isolates	تولید IAA (میکروگرم/میلی‌لیتر) IAA production (µg ml^{-1})	ممانعت (درصد) ترکیب‌های فرار Volatile metabolites inhibition (%)	ممانعت (درصد) ترکیب‌های غیرفرار Non-volatile metabolites inhibition (%)	سیدروفور (میکرومول تولید پیووردین) Sidrophore (µM Pyoverdine production)	تولید سیانید هیدروژن (۱-٤) Hydrogen cyanide production (1-4)
Ps-1	4.93 ^{d}	29.00 ^{ab}	45.50 ^{b}	1.22 ^{ab}	2
Ps-2	8.96 ^{c}	30.66 ^{a}	58.66 ^{a}	1.16 ^{ab}	2
Ps-3	11.12 ^{b}	26.33 ^{b}	57.00 ^{a}	1.09 ^{b}	2
Ps-4	14.60 ^{a}	30.00 ^{a}	57.50 ^{a}	1.36 ^{a}	3

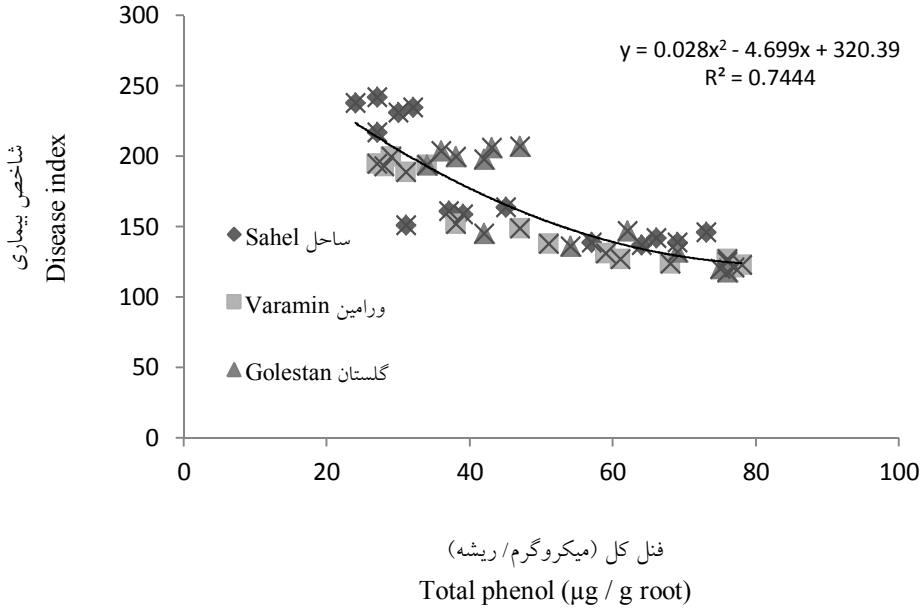
جدول ۲- مقایسه میانگین تأثیر جدایه‌های *P. fluorescens* بر صفات رشدی و پاسخ‌های دفاعی پنبه.

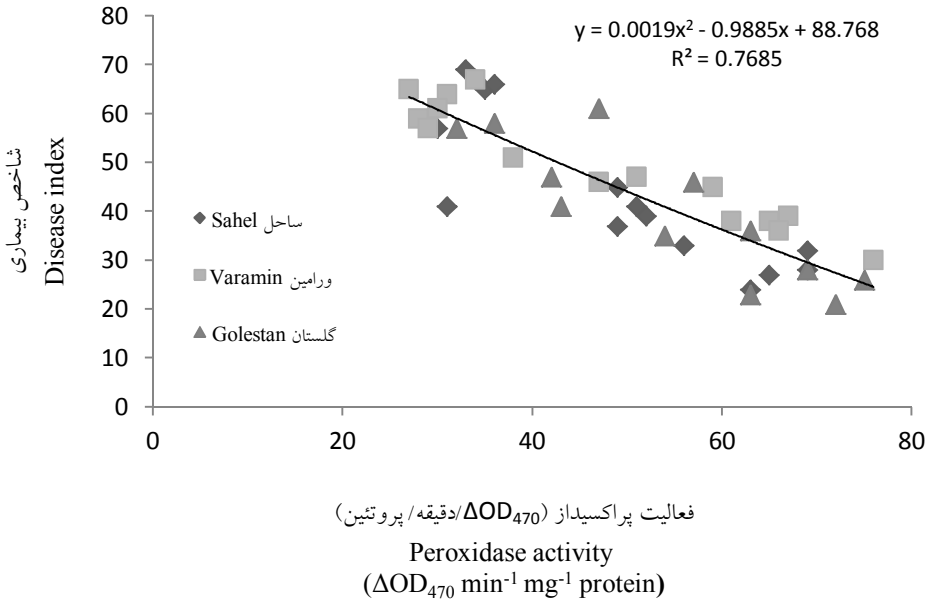
Table 2. Comparison of influence of mean of different *P. fluorescens* isolates on growth and defense responses of cotton.

تیمار Treatment	رقم ساحل Sahel cultivar						رقم ورامین Varamin cultivar						رقم گلستان Golestan cultivar					
	طول ساقه (میلی‌متر) Stem Length (mm)	طول ریشه (میلی‌متر) Root Length (mm)	وزن خشک کل (گرم/ گیاه) Total dry weight (gr per plant)	فنل کل (میکروگرم/ گرم ریشه) Total phenol (µg per gr root)	فعالیت پراکسیداز (ΔOD_{470}/دقیقه/ پروتئین) Peroxidase activity (ΔOD_{470} min^{-1} mg^{-1} protein)	شاخص بیماری Disease index	طول ساقه (میلی‌متر) Stem Length (mm)	طول ریشه (میلی‌متر) Root Length (mm)	وزن خشک کل (گرم/ گیاه) Total dry weight (gr per plant)	فنل کل (میکروگرم/ گرم ریشه) Total phenol (µg per gr root)	فعالیت پراکسیداز (ΔOD_{470}/دقیقه/ پروتئین) Peroxidase activity (ΔOD_{470} min^{-1} mg^{-1} protein)	شاخص بیماری Disease index	طول ساقه (میلی‌متر) Stem Length (mm)	طول ریشه (میلی‌متر) Root Length (mm)	وزن خشک کل (گرم/ گیاه) Total dry weight (gr per plant)	فنل کل (میکروگرم/ گرم ریشه) Total phenol (µg per gr root)	فعالیت پراکسیداز (ΔOD_{470}/دقیقه/ پروتئین) Peroxidase activity (ΔOD_{470} min^{-1} mg^{-1} protein)	شاخص بیماری Disease index
With *R. solani*																		
P. fluorescens-1	35.00 ^{d}	29.06 ^{c}	3.70 ^{d}	142.50 ^{c}	34.50 ^{de}	50.66 ^{b}	28.66 ^{d}	27.00 ^{d}	3.13 ^{c}	127.00 ^{c}	40.00 ^{cd}	65.33 ^{a}	33.66 ^{e}	32.00 ^{d}	3.43 ^{d}	130.33 ^{gh}	21.72 ^{gh}	63.66 ^{a}
P. fluorescens-2	44.33 ^{c}	38.00 ^{b}	4.66 ^{c}	161.50 ^{b}	52.50 ^{ab}	40.33 ^{c}	43.22 ^{b}	38.33 ^{abc}	4.00 ^{ab}	146.33 ^{b}	48.00 ^{b}	45.33 ^{b}	46.66 ^{c}	43.33 ^{bc}	4.56 ^{bc}	143.60 ^{ef}	23.94 ^{ef}	53.66 ^{b}
P. fluorescens-3	52.66 ^{a}	38.67 ^{b}	4.60 ^{c}	231.50 ^{a}	61.00 ^{a}	28.66 ^{d}	43.00 ^{b}	33.73 ^{c}	3.93 ^{b}	196.33 ^{a}	60.00 ^{a}	31.00 ^{c}	48.66 ^{bc}	48.00 ^{ab}	4.53 ^{c}	203.00 ^{b}	33.83 ^{b}	43.66 ^{c}
P. fluorescens-4	48.66 ^{abc}	38.67 ^{b}	4.90 ^{bc}	240.33 ^{a}	61.00 ^{a}	27.66 ^{d}	42.66 ^{b}	35.13 ^{bc}	3.93 ^{b}	192.33 ^{a}	60.00 ^{a}	28.66 ^{c}	47.50 ^{c}	43.00 ^{c}	4.53 ^{c}	201.00 ^{bc}	33.50 ^{bc}	37.66 ^{c}
P. fluorescens (-)	34.86 ^{d}	29.46 ^{c}	3.46 ^{d}	142.50 ^{c}	35.66 ^{de}	69.33 ^{a}	30.00 ^{d}	27.20 ^{d}	2.73 ^{c}	126.31 ^{c}	41.66 ^{c}	68.66 ^{a}	35.00 ^{e}	32.66 ^{d}	3.13 ^{d}	126.33 ^{hi}	21.05 ^{hi}	69.00 ^{a}
Without *R. solani*																		
P. fluorescens-1	49.50 ^{ab}	36.26 ^{b}	4.63 ^{c}	130.50 ^{d}	28.66 ^{e}	0.00 ^{e}	36.00 ^{c}	34.26 ^{c}	3.83 ^{b}	117.00 ^{cd}	28.66 ^{e}	0.00 ^{d}	40.66 ^{d}	43.83 ^{bc}	4.40 ^{c}	120.66 ^{ij}	20.11 ^{ij}	0.00 ^{d}
P. fluorescens-2	47.43 ^{bc}	45.93 ^{a}	4.83 ^{c}	143.33 ^{c}	38.50 ^{cd}	0.00 ^{e}	50.00 ^{a}	42.13 ^{a}	3.83 ^{b}	144.00 ^{b}	34.66 ^{d}	0.00 ^{d}	55.50 ^{a}	48.93 ^{a}	4.46 ^{c}	127.00 ^{hi}	21.16 ^{hi}	0.00 ^{d}
P. fluorescens-3	52.16 ^{a}	45.06 ^{a}	6.00 ^{a}	160.50 ^{b}	46.66 ^{bc}	0.00 ^{e}	49.33 ^{a}	40.76 ^{ab}	4.53 ^{a}	148.66 ^{b}	47.33 ^{b}	0.00 ^{d}	54.00 ^{a}	49.83 ^{a}	5.16 ^{ab}	136.66 ^{fg}	22.77 ^{fg}	0.00 ^{d}
P. fluorescens-4	51.00 ^{ab}	45.32 ^{a}	5.73 ^{ab}	160.66 ^{b}	47.50 ^{b}	0.00 ^{e}	49.00 ^{a}	40.93 ^{ab}	4.56 ^{a}	147.66 ^{b}	48.66 ^{b}	0.00 ^{d}	53.00 ^{ab}	48.90 ^{a}	5.23 ^{a}	136.66 ^{fg}	22.77 ^{fg}	0.00 ^{d}
P. fluorescens (-)	51.40 ^{ab}	36.00 ^{b}	4.66 ^{c}	136.66 ^{cd}	28.50 ^{e}	0.00 ^{e}	42.00 ^{b}	35.63 ^{bc}	3.86 ^{b}	112.33 ^{d}	24.66 ^{e}	0.00 ^{d}	46.33 ^{c}	43.83 ^{bc}	4.40 ^{c}	120.66 ^{ij}	20.11 ^{ij}	0.00 ^{d}

* تیمارهای هر ستون با حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

* Treatments at each column having at least one similar letter do not show a significant difference at P≤0.05.





شکل ۲- ارتباط بین فنل کل (بالا) و فعالیت آنزیم پراکسیداز (پایین) با شاخص بیماری مرگ گیاهچه پنبه با عامل *Rhizoctonia solani* در سه رقم مختلف پنبه.

Fig. 2. The relationship between total phenol (up) and Peroxidase enzyme activity (down) with disease index of damping-off of by *Rhizoctonia solani* in different cotton cultivars.

جدول ۳- ضریب همبستگی پیرسون بین تولید IAA و ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *P. fluorescens* در شرایط آزمایشگاه و صفات رشدی و پاسخ‌های دفاعی پنبه.

Table 3. Pearson correlation between *in vitro* IAA production and antagonistic activity of *P. fluorescens* isolates and growth and defense responses of cotton.

تولید IAA و فعالیت آنتاگونیستی IAA production and Antagonistic activities	طول ساقه (میلی‌متر) Stem Length (mm)	طول ریشه (میلی‌متر) Root Length (mm)	وزن خشک کل (گرم/ گیاه) Total dry weight (gr per plant)	فنل کل (میکروگرم/ ریشه) Total phenol (µg per gr root)	فعالیت پراکسیداز (ΔOD_{470}/دقیقه/ پروتئین) Peroxidase activity (ΔOD_{470} min^{-1} mg^{-1} protein)	شاخص بیماری Disease index
تولید IAA (میکروگرم/میلی‌لیتر) IAA production (µg ml^{-1})	0.56*[a]	0.79**	0.52*	0.81**	0.81**	-0.73**
ممانعت (درصد) ترکیب‌های فرار Volatile metabolites inhibition (%)	0.08[ns]	0.05[ns]	0.037[ns]	-0.08[ns]	-0.11[ns]	0.013[ns]
ممانعت (درصد) ترکیب‌های غیرفرار Non-volatile metabolites inhibition (%)	0.68**	0.82**	0.61**	0.65**	0.78**	-0.69**
سیدروفور (میکرومول تولید پیووردین) Sidrophore (µM Pyoverdine production)	0.07[ns]	0.13[ns]	-0.04[ns]	0.13[ns]	0.06[ns]	-0.09[ns]

[a] ** همبستگی معنی‌دار در سطح ۰/۰۱، * همبستگی معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و [ns] فاقد همبستگی معنی‌دار.

[a] ** Correlation is significant at the 0.01 level, * Correlation is significant at the 0.05 level, [ns] Correlation is nonsignificant.

قارچ *R. solani* با دامنه میزبانی وسیع، قدرت بیماری‌زایی شدید در شرایط اقلیمی مساعد و مقاومت بالای اسکلروت‌های آن در شرایط نامساعد محیطی به‌عنوان بیمارگر خطرناک در بسیاری از گیاهان زراعی مطرح است و در اغلب مناطق جهان به‌عنوان یکی از عوامل محدودکننده کشت محصول زراعی از جمله پنبه محسوب می‌شود. این بیمارگر خسارت‌های زیادی را از طریق پوسیدگی هیپوکوتیل و مرگ گیاهچه‌ای پنبه به وجود می‌آورد (۱۵ و ۱٦).

تأثیرگذاری کم روش‌های شیمیایی مهار بیمارگرهای خاک‌زی و هزینه‌های اقتصاد آن از یک طرف و نگرانی‌های زیست‌محیطی از طرف دیگر، توجه پژوهشگران را به‌سمت دستیابی روش‌های سالم و ارزان‌تر جلب کرده است. استفاده از ریزجانداران آنتاگونیست برای مبارزه با عوامل بیماریزای قارچی گیاهان یکی از روش‌های مؤثر جهت کاهش مصرف سم و در نتیجه جلوگیری از آلودگی محیط زیست است. در سال‌های اخیر بحث امکان مهار زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از ریزجانداران آنتاگونیست به‌ویژه باکتری‌های متعلق به سودوموناس‌های فلورسنت مانند *Pseudomonas putida* و *P. fluorescens* در مهار بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفت. این باکتری‌ها در ناحیه ریزوسفر به‌عنوان خط مقدم دفاعی ریشه علیه بیمارگرهای خاک‌زی زندگی می‌کنند و گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های مهار زیستی هستند. باکتری‌های سودوموناس فلورسنت به‌طور مستقیم با تولید بعضی از تنظیم‌کننده‌های رشد به‌ویژه IAA و نیز به‌صورت غیرمستقیم از طریق مهار زیستی بیمارگرها و یا القای مقاومت در گیاهان موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند (۱۲).

تاکنون سازوکارهای دفاعی متعددی در گیاهان از جمله سنتز و ترشح مواد فنلی داخل و خارج سلول،

سنتز فیتوآلکسین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی شناخته شده است. پروتئین‌های متعددی در ارتباط با بیماری‌زایی گزارش شده است که از آن‌ها می‌توان به پراکسیدازها اشاره نمود. پراکسیدازها اثر مستقیم بر مقاومت دارند و از طریق تولید رادیکال آزاد و پرکسید هیدروژن که برای بعضی از بیمارگرها سمی هستند، منجر به دفاع در برابر بیمارگرها می‌شوند. در این رابطه، افزایش فعالیت پراکسیداز در برگ‌های پنبه در طی واکنش ناسازگار به سوختگی باکتریایی ناشی از *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* کاهش تعداد باکتری‌ها و تجمع مواد ملانینی در محل مایه‌زنی همراه بوده است. هم‌چنین اکسیداسیون ترکیب‌های فنلی از جمله کاتچین به‌وسیله این آنزیم رشد بیمارگر را در گیاهان پنبه مقاوم به سوختگی باکتریایی کاهش می‌داد (۳۱). طبق بررسی‌های هاول و همکاران (١٤) افزایش فعالیت پراکسیداز و سنتز ترپنوئیدها به‌عنوان القای مقاومت در گیاهچه‌های پنبه توسط *T. virens* یکی از عوامل مهم مهار زیستی بیماری مرگ گیاهچه در اثر *R. solani* می‌باشد. نتایج نشان داد که به‌دنبال آلودگی گیاهان با *R. solani* فعالیت آنزیم پراکسیداز افزایش می‌یابد.

فعالیت جدایه‌های *P. fluorescens* علیه باکتری‌ها و قارچ‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است (۱، ۱۸ و ۲۱). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج بیش‌تر بررسی‌های انجام شده در مورد اثر منفی باکتری *P. fluorescens* بر بیماری مرگ گیاهچه مطابقت داشته است، اگرچه تفاوت معنی‌داری در رابطه با تأثیر جدایه‌های باکتری مورد بررسی بر ممانعت از روند آلودگی مشاهده شد (جدول ۲). این تفاوت با میزان متفاوت القای مقاومت در گیاه (افزایش ترکیب‌های فنلی و فعالیت آنزیم پراکسیداز) در ارتباط بوده است (جدول ۲).

بسیاری از باکتری‌های ریزوسفر اثر مثبت مستقیمی روی رشد و تقویت گیاه دارند. بررسی منابع نشان می‌دهد که تولید IAA توسط باکتری‌ها موجب تشدید رشد ریشه‌ای و توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان خود می‌شوند (٤ و ۷). کاهش رشد ریشه تحت تنش‌های مختلف در ارتباط با کاهش سطح هورمون‌های گیاهی از جمله آکسین‌ها، جیبرلین‌ها، اسید جازمونیک و اسید سالیسیلیک همراه است (۳، ۵ و ۱۱). IAA فراوان‌ترین آکسین طبیعی است که قابلیت آن در رابطه با تنظیم بسیاری از جنبه‌های رشد و نمو گیاه از جمله تمایز بافت‌های آوندی، رشد طولی، جوانه‌زنی بذر و غده، تحریک ایجاد ریشه‌های جانبی، بیوسنتز متابولیت‌های مختلف و مقاومت به شرایط تنش به خوبی شناخته شده است (۱۹ و ۲۵). تحریک رشد گیاهان مختلف با باکتری‌هایی که IAA تولید می‌کنند گزارش شده است (۷ و ۱۲). در این رابطه، به‌نظر می‌رسد قابلیت یک گونه گیاهی برای سازگاری با شرایط تنش به همراهی آن‌ها با برخی از ریزجانداران تولیدکننده هورمون‌های گیاهی بستگی دارد (۱۵). IAA به‌عنوان یکی از سازوکارهای *P. fluorescens* جهت مهار سوختگی فوزاریومی جو مشخص شده است (۲۳). هم‌چنین، تعدادی از گزارش‌ها بر کاهش میزان آلودگی ناشی از بیمارگرهای قارچی و باکتریایی پس از کاربرد خارجی IAA روی گیاه اشاره دارند (۱۹ و ٢٤). IAA میزان آلودگی گیاهان گوجه‌فرنگی را به *F. oxysporum* f. sp. *radicis* با افزایش مقاومت میزبان کاهش می‌دهد (٢٦). هم‌چنین تیمار محلول‌پاشی گیاهان جو با IAA در کاهش علائم ناشی از *Fusarium culmorum* و افزایش محصول مؤثر بوده است (پتی و همکاران، ۲۰۱۲). در این بررسی نیز تولید IAA به‌عنوان یکی از سازوکارهای باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر تغییر پاسخ‌های دفاعی گیاه بوده است (جدول ۳).

در این رابطه، جدایه‌های ۳ و ٤ باکتری با میزان بالاتر تولید IAA، تأثیرات بهتری بر میزان ویژگی‌های رشد گیاهی (ارتفاع و وزن خشک)، هم‌چنین میزان فنل کل و فعالیت آنزیم پراکسیداز داشته‌اند (جدول ۲). این موضوع اهمیت تولید میزان این هورمون را به‌عنوان یک معیار مناسب برای انتخاب جدایه‌های مهار زیستی نشان می‌دهد.

نتایج کلی این آزمایش نشان می‌دهد که باکتری *Pseudomonas fluorescens* در القای مقاومت گیاه پنبه علیه بیماری مرگ گیاهچه مؤثر بوده است و می‌تواند به‌عنوان یک رهیافت زیست‌فناوری برای بهبود رشد گیاه و مقاومت به تنش ناشی از قارچ *R. solani* پیشنهاد شود. اگرچه پاسخ‌های متفاوت گیاه به تنش در حضور جدایه‌های مختلف باکتری نشان می‌دهد که تغییرات فیزیولوژیکی گیاه و تغییر واکنش به *R. solani* به گونه آنتاگونیست مورد استفاده بستگی دارد.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای تامین منابع مالی این طرح تشکر و قدردانی می‌شود. هم‌چنین، از آقای دکتر سید محمود اخوت به‌دلیل تامین جدایه‌های باکتری و قارچ مورد نیاز و از آقای دکتر قربانعلی روشنی به‌دلیل تامین بذرهای مورد نیاز تشکر می‌گردد.

منابع

1. Ahmadzadeh, M. and Ghasemi, S. 2012. Introduction of *Pseudomonas fluorescens* as a new biocontrol agent in Iran. Biol. Control Pests Plant Dis. 1: 49-60 (In Persian with English summary)
2. Akram, W., Anjum, T. and Ali, B. 2016. Phenylacetic acid is ISR determinant produced by *Bacillus fortis* IAGS162, which involves extensive re-modulation in metabolomics of tomato to protect against *Fusarium* wilt. Front Plant Sci. 19: 1-12.
3. Alqarawi, A.A., Abd Allah, E.F., Hashem, A., Al HuqailAsma, A., Abdulaziz, A. and Al Sahli, A.A. 2014. Impact of abiotic salt stress on some metabolic activities of *Ephedra alata* Decne. J. Food Agric. Environ. 12: 620-625.
4. Alstrom, S. 1987. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. Plant Soil. 102: 3-9.
5. Atiq, M., Arooj, S., Rajput, N., Bashir, M.R., Javed, N., Haq, E., Abbas, W. and Khan, B. 2017. Induction of system resistance in cotton against bacterial blight and its effect on yield. Int. J. Biol. Biotech. 14: 591-595.
6. Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C. 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology. 97: 239-243.
7. Bano, Q., Ilyas, N., Bano, A., Zafar, N., Akram, A. and Hassan, F. 2013. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. Pak. J. Bot. 45(S1): 13-20.
8. Chance, B. and Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Method Enzymol. 2: 764-775.
9. Capper, A.L. and Higgins, K.P. 1993. Application of *Pseudomonas fluorescens* isolates to wheat as potential biological control agents against take-all. Plant Pathol. 42: 560-567.
10. Dennis, C. and Webester, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma* (I. production of non-volatile antibiotics). Trans. Br. Mycol. Soc. 57: 25-39.
11. Egamberdieva, D. 2009. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. Acta Physiol. Plant. 31: 861-864.

12. Egamberdieva, D., Jabborova, D. and Hashem, A. 2015. Pseudomonas induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to Fusarium root rot through the modulation of indole-3-acetic acid. Saudi J. Biol. Sci. 22: 773-779.
13. Howell, C.R. 2007. Effect of seed quality and combination fungicide–*Trichoderma* spp. seed treatments on pre- and postemergence dampingoff in cotton. Phytopath. 97: 66-71.
14. Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D. and Puckhaber, L.S. 2000. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology. 90: 248-252.
15. Javid, M.G., Sorooshzadeh, A., Moradi, F. and Allahdadi, I. 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. Aust. J. Crop Sci. 5: 726-734.
16. Jones, W.M., Smith, W.S. and Starr, J.L. 2016. Resistance to *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum* in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Crop Sci. 56: 1784-1791.
17. Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Defago, G., Cook, R.J. and Thomashow, L.S. 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. Appl. Environ. Microbiol. 62: 552-563.
18. Kraus, J. and Loper, J. 1990. Biocontrol damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: mechanistic studies. The second interational workshop on plant growh promoting rhizobacteria, 27-28 July, Interlacen, Switzerland, Pp: 172-175.
19. Ludwig-Müller, J. 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. J. Exp. Bot. 62: 1757-1773.
20. Malencic, D., Popovic, M. and Miladinovic, J. 2007. Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. Molecules. 12: 576-581.
21. Meyer, J.M. and Abdallah, M.A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physicochemical properties. J. Gen. Microbiol. 107: 319-328.
22. Patten, C.L. and Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3795-3801.
23. Petti C., Reiber, K., Ali, S.S., Berney, M. and Doohan, F.M. 2012. Auxin as a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. BMC Plant Biol. 12: 224.
24. Pusztahelyi, T., Holb, I.J. and Pocsi, I. 2015. Secondary metabolites in fungus-plant interactions. Front Plant Sci. 6: 1-23.
25. Ramalingam, R. and In-Jung, L. 2013. Ameliorative effects of spermine against osmotic stress through antioxidants and abscisic acid changes in soybean pods and seeds. Acta Physiol. Plant. 35: 263-269.
26. Sharaf, E.F. and Farrag, A.A. 2004. Induced resistance in tomato plants by IAA against *Fusarium oxysporum lycopersici*. Pol. J. Microbiol. 53: 111-116.
27. Silva, M.P., Tylka, G.L. and Munkvold, G.P. 2017. Seed treatment effects on maize seedlings coinfected with *Fusarium* spp. and *Pratylenchus penetrans*. Plant Dis. 100: 431-437.
28. Stewart, J.M.D., Oosterhuis, D. and Heitholt, J.J. 2009. Physiology of Cotton. Springer press.
29. Thompson, D.C., Clarke, B.B. and Kobayashi, D.Y. 1996. Evaluation of bacterial antagonistists for reduction of summer patch symptoms in Kentucky bluegrass. Plant Dis. 80: 856-862.
30. van Dam, N.M. 2009. How plants cope with biotic interactions. Plant Biol. 11: 1-5.
31. Vidhyasekaran, D. 2002. Bacterial disease resistance in plants. CRC Press, press, Pp: 27-122.