توانایی باکتری‌های اندوفیت در بازدارندگی رشد شبه قارچ‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه *Phytophthora nicotianae* و *Phytophthora citrophthora* در پایه بکرایی(*Citrus* sp.)

طاهره سادات هاشمی[۱]، داود صمصام‌پور[۱*]، جلال سلطانی[۲]، مجید عسکری سیاهویی[۳] و مصطفی قاسمی[٤]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۰)

چکیده

باکتری‌های اندوفیت یکی از مهمترین ابزارهای توانمند در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی و حفاظت گیاهان در برابر خسارت ناشی از آن‌ها هستند. ارزیابی قدرت بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از باغ‌های نارنگی استان هرمزگان علیه عامل پوسیدگی طوقه و ریشه، ناشی از شبه قارچ‌های *Phytophthora nicotianae* و *Phytophthora citrophthora* در شرایط آزمایشگاه (طرح کاملاً تصادفی) و گلخانه (آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی) با سه تکرار انجام شد. هم‌چنین، صفات زیست توده وزن تر و خشک ساقه و ریشه، طول ساقه و ریشه مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش ۱۷ جدایه باکتری‌های اندوفیت، با استفاده از ژن *16S rDNA* شناسایی شد. در شرایط آزمایشگاهی مشخص شد که از بین ۱۷ باکتری اندوفیت، ۳ جدایه قدرت بازدارندگی معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد داشتند؛ به‌طوری که در شرایط گلخانه، باکتری‌های اندوفیت به میزان۷۵/۵ درصد شدت بیماری ناشی از جدایه‌های *P. nicotianae* و *P. citrophthora* را نسبت به شاهد کاهش دادند و توالی این سه جدایه با توالی گونه‌هایی از جنس‌های *Kytococcus schroeteri*، *Paracraurococcus sp.* و *Psychrobacillus psychrodurance* ۹۹ درصد شباهت نشان داد. در آزمایش گلخانه‌ای مقایسه میانگین‌ها نشان داد که وزن تر ساقه و ریشه و طول ساقه تحت تیمار باکتری‌های اندوفیت نسبت به شاهد افزایش یافت. به طور کلی باکتری‌های اندوفیت *Kytococcus schroeteri*، *Paracraurococcus sp.* و *Psychrobacillus psychrodurance* به صورت مجزا و ترکیبی) را می‌توان به عنوان یک ابزار کارامد برای کنترل زیستی عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در پایه بکرایی پیشنهاد کرد.

کلیدواژه: اندوفیت، شدت بیماری، صفات زیست توده، کنترل زیستی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: samsampoor@hormozgan.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار گروه مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان.

۲. دانشیار بخش گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

۳. دانشیار بخش گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان.

۴. استادیار بخش باغبانی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین.

The ability of endophytic bacteria to inhibit the growth of crown and root rot fungal-like *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora citrophthora* on Bakraii rootstock (*Citrus* sp.)

T.S. Hashemi[1], D. Samsampour[1*], J. Soltani[2], M. Askari Seyahooee[3], and M. Ghasemi[4]

(Received: 15.11.2020; Accepted: 8.2.2021)

Abstract

Endophytic bacteria are one of the most powerful tools in bio-controlling plant pathogens and protecting plants from damage. The evaluation of inhibitory effect of endophytic bacteria isolated from Mandarin orchards in Hormozgan province against crown and root rot caused by fungal-like *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora citrophthora* in laboratory (completely randomized design) and greenhouse (factorial experiment in completely randomized design) was performed with three replications. Also, the biomass parameter of fresh and dry weight of the stem, root and their corresponding lengths were investigated. In this experiment, 17 isolates of endophytic bacteria were identified using 16S rDNA gene. In the laboratory experiment was found that out of 17 endophytic bacteria, 3 isolates had significant inhibitory effect at the 5 percentage probability level; So that in the greenhouse conditions they reduced the disease severity of *P. nicotianae* and *P. citrophthora* isolates by 75.5 percentage compared to the control. The sequence of these three isolates was 99 percentage similar to the sequence of *Paracrauroccus* sp. , *Kytococcus schroeteri* and *Psychrobacillus psychrodurance* species. In the greenhouse experiment, the comparison of the means showed that the fresh weight of stem, root and stem length treated with endophytic bacteria increased compared to the control. In general, the endophytic bacteria *Paracrauroccus* sp. ,*Kytococcus schroeteri* and *Psychrobacillus psychrodurance* separately and in combination can be suggested as an effective tool for biological control of the cause of crown and root rot at the Bakraii rootstock.

Keywords: Endophyte, Disease Index, Biomass parameter, Bio Control

** Corresponding author's E-mail: samsampoor@hormozgan.ac.ir
1. Ph.D. Student, Associate Professor of Horticulture Dept., University of Hormozgan.
2. Associate Professor of Phytopathology/Biotechnology, Bu-Ali Sina University.
3. Associate Professor of Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Hormozgan.
4. Assistant Professor of Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Qazvin.

مقدمه

بر اساس آمار سازمان خوار و بار و کشاورزی جهانی(فائو) در سال ۲۰۱۸، سهم تولید انواع پرتقال، نارنگی، لیمو و گریپ فروت در دنیا به ترتیب ۵۴/۲۹، ۲۴/۷۶، ۱۳/۹۵و ۶/۷۵ درصد از کل مرکبات است (FAO. 2018). ایران یکی از کشورهای بزرگ تولیدکننده مرکبات است و بر اساس آمار فائو (۲۰۱۸) جایگاه دوازدهم جهان را در بین کشورهای تولید کننده مرکبات دارد (FAO. 2018). استان هرمزگان با سطح زیر کشت ۳۸۵۲۱ هکتار و تولید ۴۰۲۳۲۵ تن کیلوگرم در هکتار رتبه‌ی چهارم را در کشور دارد (Ahmadi *et al.* 2020). یکی از مهمترین عوامل محدودکننده کشت مرکبات درجنوب کشور پوسیدگی‌های طوقه و ریشه مرکبات می‌باشد (Banihashemi 1983) دو گونه از شبه قارچ‌های (*Phytophthora* spp.) عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه، با نام‌های *Phytophthora citrophthora* (Breda de Haan 1986) و *Phytophthora nicotianae* (Smith & Smith 1906)، از مهم‌ترین بیمارگرهای درختان، به خصوص مرکبات در باغ‌های ایران محسوب می‌شوند (Shekari *et al.* 2011). تمام مراحل رشد و تکثیر این بیمارگر در خاک صورت می‌گیرد (Safdar *et al.* 2010. Ippolito *et al.* 1990). جنس *Phytophthora* با بیش از ۶۰ گونه‌ی مختلف به عنوان یک بیمارگر غیراجباری و در نوع خود اختصاصی شناخته شده است (Brasier *et al.* 2003) خسارت ناشی از این بیماری قارچی در زمین‌های مرطوب با خاک سنگین روی پایه‌های حساس قابل توجه است. زمانی‌که ریشه‌های گیاه فعال و در حال رشد است، جدایه فعال و از طریق پوسیدگی ریشه باعث خسارت به گیاه می‌شود (Grech *et al.* 1992).

پایه بکرایی (*Citrus* sp.) متعلق به خانواده Rutaceae درختی با تاج فشرده، پرمحصول، سریع الرشد، مقاوم در برابر تریستیزا و pH بالا، به عنوان یک پایه‌ی رایج و با پیوندپذیری بسیارخوب برای پیوند برخی از مرکبات به خصوص نارنگی در دهه‌های قبل استفاده می‌شد ولی متاسفانه این پایه نسبت به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه بسیار حساس است و دچار زوال می‌شود. از طرفی، مقاومت پایه‌هایی نظیر نارنج (*Citrus aurantium* L.) نسبت به بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، سبب جایگزینی این پایه به جای بکرایی در درختان نارنگی شده‌است (Fotouhi Ghazvini & Fallahimoghadam 2006). در حال حاضر استفاده ازروش‌های معمول شیمیایی قارچ‌کش‌های سیستماتیک فقط توانسته‌اند تا حدودی این بیمارگر را کنترل کنند و هیچ کدام نتوانسته‌اند به طور موثر از رشد بیمارگر جلوگیری کنند، از طرف دیگر استفاده از این روش‌ها همیشه اقتصادی نیست و علاوه بر آن که سبب ایجاد مقاومت بیمارگر با گذشت زمان در مقابل مواد شیمیایی می‌شود، محیط زیست را آلوده می‌کند و با مشکلاتی همراه است (Sandler *et al.* 1989). استفاده از باکتری‌های اندوفیت جایگاه ویژه‌ای در کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا دارند و عوارض ناشی از کنترل روش‌های معمول شیمیایی را ندارند. از میان باکتری‌های اندوفیت، باکتری‌های گرم مثبت به علت تولید ترکیبات ضد قارچی مورد توجه بسیاری از محققین قرار-گرفته‌است (Cho *et al.* 2007. Hassan 2017) این ریز-موجودات با اثر متقابل بر بیمارگرهای گیاهی مختلف، نقش عمده‌ای در کنترل زیستی بیماری‌ها ایفا می‌کنند. از نظر تکاملی به نظر می‌رسد باکتری‌های اندوفیت حدواسط باکتری‌های ساپروفیت و باکتری‌های بیمارگر گیاهی بوده و قادرند بدون اینکه میزبان خود را از بین ببرند، از مواد

موجود در گیاه برای رشد و تکثیر خود استفاده کنند (Barka *et al.* 2002. Sturz *et al.* 2000). بنابراین برای گسترش مجدد بکرایی به عنوان پایه‌ی مرغوب نارنگی، استفاده از راه‌های کنترل زیستی بیماری و القای مقاومت به عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در پایه بکرایی، ما را به انجام این پژوهش هدایت کرد.

مواد و روش‌ها

جداسازی، شناسایی و تهیه‌ی سوسپانسیون باکتری‌های اندوفیت

باکتری‌های اندوفیت از قسمت‌های ریشه، ساقه، طوقه و برگ‌های درختان سالم نارنگی سیاهو *Citrus* × *Citrus limetta* cv. Siyahoo باغ‌های با میانگین سنی نه ساله استان هرمزگان، از مناطق حاجی آباد، رودان، سیاهو واحمدی جداسازی شد. برای این منظور بخش‌های مختلف گیاه به منظور حذف آلودگی‌های سطحی ابتدا با آب و دو قطره توئین ۸۰ به طور کامل شستشو شد، سپس در شرایط استریل و زیر هود لامینار قطعات نیم در نیم سانتی متری از بخش‌های جدا شده گیاه به ترتیب ابتدا با الکل ۷۰ درصد، آب مقطر استریل، هیپوکلریت ۱/۵ درصد و درنهایت آب مقطر استریل شستشو شد. سپس قطعات گیاه استریل شده به میکروتیوب دو میلی لیتری حاوی آب مقطر استریل منتقل و ۲۴ساعت نگهداری شد. قبل از انتقال به محیط کشت، میکروتیوب‌ها بمدت یک ساعت با ورتکس به طور متناوب چندین مرتبه تکان داده شد. سپس یک میلی لیتر از مایع درون میکروتیوب روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) حاوی ۰/۵ درصد پپتون و ۰/۳ درصد مخمر و ۱/۵ درصد آگار و ۰/۵ درصد کلرید سدیم در یک لیتر آب مقطر به مدت دو هفته در انکوباتور با دمای ۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ازباکتری‌های اندوفیت رشد یافته مجدداً به محیط کشت جامد NA کشت خطی انجام شد و مراحل خالص سازی انجام شد. به منظور شناسایی باکتری‌های اندوفیت، DNA آن‌ها به روش سمبرو و راسل (Sambroo & Russell 2001) استخراج شد و ژن‌های16S rDNA باکتری‌های اندوفیت به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) تکثیرو سپس توالی‌یابی و در بانک ژن جهانی (NCBI) ثبت شد (McInroy *et al.* 1995). برای تهیه سوسپانسیون باکتری‌های اندوفیت ۱ /۰ = OD در طول موج ۶۲۰ نانومتر یک لوپ از باکتری به لوله آزمایش حاوی محیط کشت NB (Nutrient Broth) (۵گرم پپتون، ۱گرم عصاره مخمر، ۲/۵ گرم شکر و ۱گرم NaCl) منتقل و سپس در انکوباتور با دمای۱ ± ۳۵ درجه سانتی‌گراد و سرعت دور ۱۵۰، به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند و در نهایت برای هر باکتری غلظت $۱۰^{۶}$ ($CFUml^{-1}$) تنظیم شد.

تهیه زادمایه بیمارگر

جدایه‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه *P.nicotianae* (PH-14.6.82) و *P. citrophthora* (PH-5.11.82) از کلکسیون گروه گیاه پزشکی دانشگاه شیراز تهیه شد. برای تهیه‌ی زادمایه بیمارگر سه قطعه (۳×۲ میلی‌متر) از پرگنه جدایه رشد یافته *Phytophthora* در محیط کشت CMA (عصاره ۴۰ گرم ذرت، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر)، به ارلن حاوی عصاره‌ی دانه‌ی شاهدانه (۱۲۰ میلی‌لیتر) و ورمیکولایت (۲۰۰ میلی‌لیتر) که طی ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (سه مرتبه، یک روز در میان) استریل شده بود، (Banihashemi & Fatehi 1989. Banihashemi & Tabatabai 2004) منتقل و به مدت ۴ هفته درانکوباتور با دمای ۱ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی

کشت و نگهداری شد. هر هفته ارلن‌ها برای چند دقیقه تکان داده شدند تا رشد بیمارگر به صورت یکنواخت انجام‌گیرد (Erahad 1992.Gilardi *et al.* 2014 Shekari *et al.* 2011).

بررسی فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اندوفیت در شرایط آزمایشگاه

به منظور تعیین درصد قدرت بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت از میزان رشد *P. nicotianae* و *P. citrophthora* در محیط کشت PDA+pepton (۵ گرم پپتون و ۳۹ گرم PDA در یک لیتر آب مقطر)؛ از روش کشت متقابل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار استفاده شد (Siddiqui & Moen 2009). سوسپانسیون باکتری‌های اندوفیت (OD_{620} =۰/ ۱) در چهار چاهک هم اندازه روی محیط کشت حاوی یک قطعه جدایه‌های بیمارگر ریخته شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت از اعمال تیمار و نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، درصدتوانایی بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت از رشد مسیلیومی قارچ‌ها، طی ۱۴ روز اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی(I) با استفاده از فرمول زیرمحاسبه شد (Riccioni *et al.* 2014).

$$I=\frac{C_2-C_1}{C_2}\times 100$$

درصد بازدارندگی= I

قطر پرگنه بیمارگر در شاهد (میلی‌متر)= C_2

قطر پرگنه بیمارگر در تیمار(میلی‌متر)= C_1

آزمایشات گلخانه ای

الف- کشت بذرهای بکرایی و تهیه دانهال‌های ۱۸ ماهه

در مهر ماه سال ۱۳۹۵ بذرهای بکرایی به منظور عاری بودن از بیماری، بعد از ضدعفونی و شستشو با الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت یک و نیم درصد و شستشو با آب درگلدان‌های (به قطر ۲۱ سانتی‌متر و ارتفاع ۲۲سانتی‌متر) حاوی خاک اتوکلاو شده (با دمای۱۲۱درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت یکساعت) در گلخانه دانشگاه هرمزگان کشت شدند. دانهال‌های با ارتفاع تقریبا یکسان در فروردین ماه ۱۳۹۷به منظور اعمال تیمارهای مورد مطالعه (شبه قارچ‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه و باکتری‌های اندوفیت) انتخاب شد.

ب- اعمال سطوح مختلف فاکتورهای آزمایش

فاکتورهای آزمایش شامل شبه قارچ‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه در چهار سطح و باکتری‌های اندوفیت در هشت سطح بود (جدول ۱). سوسپانسیون حاصل از باکتری‌های اندوفیت هفته‌ای دوبار به مدت یک ماه روی اندام‌های هوایی گیاه محلول‌پاشی و به طور همزمان در خاک گلدان تزریق شد. پس از بازه‌ی زمانی یک ماهه از اعمال تیمارهای اندوفیت، جهت بررسی و اطمینان از استقرار باکتری‌های اندوفیت مایه‌زنی شده در دانهال‌ها، حضور یا عدم حضور ژن‌های 16S rDNA باکتری‌های اندوفیت در گیاهان مورد ردیابی قرارگرفت. سپس، به منظور آلوده کردن گیاهان با سطوح مختلف شبه قارچ‌های عامل پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، خاک اطراف هر دانهال تا عمق ۳ سانتی‌متری کنار زده شد و ۳۰ میلی‌لیتر از مایه تلقیح بیمارگر در اطراف طوقه و ریشه هر دانهال ریخته شد و سپس گلدان‌ها طی ۲۴ ساعت دوبار آبیاری شدند. گلدان‌ها در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در گلخانه نگهداری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل درقالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۱. سطوح مختلف تیمار دانهال ها با شبه قارچ‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه و باکتری‌های اندوفیت

Table 1. Different levels of seedling treatment with crown and root rot fungal-like organism and endophytic bacteia

Level	Treatment
1	Control
2	*Phytophthora citrophthora*
3	*Phytophthora nicotianae*
4	*Phytophthora nicotianae* + *Phytophthora citrophthora*
1	no endophytic bacteria
2	A: *Psychrobacillus psychrodurans*
3	B: *Kytococcus schroeteri*
4	C: *Paracraurococcus* sp.
5	*Kytococcus schroeteri* +*Psychrobacillus psychrodurans* AB:
6	*Kytococcus schroeteri* + *Paracraurococcus* sp. BC:
7	*Psychrobacillus psychrodurans* + *Paracraurococcus* sp. AC:
8	*Kytococcus schroeteri*+ *Paracraurococcus* sp. + *Psychrobacillus psychrodurans* ABC:

اندازه‌گیری شدت بیماری

بعد از اینکه شاهد تیمارشده با بیمارگر کاملاً پژمرده و خشک شد، شدت بیماری (DI) بر اساس مقیاس درجه آلودگی صفر تا چهار محاسبه شد (Shekari *et al.* 2011. Akbarpour & Banihashemi 1998.)

۰= بدون علایم آلودگی، گیاهان سالم هستند.

۱= گیاه با نصف ریشه‌های فرعی گیاهان شاهد (بدون یا دارای تعداد کمی برگ پژمرده یا سبز خشک)

۲= گیاه با ۱/۳ ریشه‌های فرعی گیاهان شاهد (دارای تعدادی برگ پژمرده یا سبز خشک)

۳= گیاه با ۱/۴ ریشه‌های فرعی گیاهان شاهد (نیمه پژمرده)

۴= گیاه بدون ریشه فرعی (کاملاً پژمرده یا خشکیده)

اندازه‌گیری صفات زیست توده

در مرحله نهایی به منظور بررسی تاثیر باکتری‌های اندوفیت در کاهش پوسیدگی ریشه و طوقه بکرایی؛ صفات زیست توده شامل وزن تر و خشک ریشه، ساقه و طول ساقه و ریشه اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس صفات با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین تیمارها به روش LSD در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

اثبات حضور بیماری و شناسایی عامل آن

اولین علایم بالینی بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه روی دانهال‌های بکرایی، یک هفته بعد از اعمال تیمار بیمارگر با نشانه‌های زردی برگ‌ها، سرخشکیدگی دانهال‌ها و پژمردگی ظاهر شدند. به تدریج در یک بازه‌ی زمانی چهار ماهه سایر علایم بیماری شامل نکروزه و قهوه‌ای رنگ شدن در ناحیه طوقه به سمت بالای ساقه ونیز علایم سبز خشکی و مرگ کامل گیاه مشاهده شد. جهت اطمینان از علایم بالینی، از دانهال‌های آلوده شده بطور تصادفی نمونه‌گیری و اقدام به جداسازی بیمارگر در آزمایشگاه و بررسی مشخصات آن با جدایه اولیه، بر اساس کلید واترهاوس شد (Waterhouse *et al.*1963 a. 1970 b. 1983 c).

جدول ۲. کد شناسه ایزوله و شماره دستیابی ژنی باکتری‌های اندوفیت جداشده از نارنگی (*Citrus reticulata* var. siyahoo)، استان هرمزگان (رودان، حاجی آباد، سیاهو و احمدی).

Table 2. Isolate ID code and Genbank accession numbers of the endophytic bacteria associated with Mandarin (*Citrus reticulata* var. siyahoo) in Hormozgan province (Roudan, Hajiabad, Siyahoo and Ahmadi).

Isolate	Accession no. from this study	Phylum	Order	Family	Genus/Species
TM7	MN004851	Proteobacteria	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	*Altererythrobacter* sp.
TM20	MN005946	Proteobacteria	Rhodospirilales	Acetobacteraceae	*Paracraurococcus* sp.
TM21	MN006141	Proteobacteria	Rhizobiales	Methylocystaceae	*Methylopila oligotropha*
TM25	MN005947	Actinobacteria	Actinomcetales	Promicromonosporaceae	*Cellulosimicrobium* sp.
TM4	MN005118	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Okibacterium fritillariae*
TM3	MN006140	Actinobacteria	Actinomycetales	Microbacteriaceae	*Curtobacterium flaccumfaciens*
TM23	MN006352	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	*Kocuria palustris*
TM8	MN004799	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	*Mycobacterium gadium*
TM9	MN004850	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	*Mycobacterium gadium*
TM19	MN005945	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	*Mycobacterium gadium*
TM18	MN005944	Actinobacteria	Actinomycetales	Nocardioidaceae	*Nocardioides aromaticivorans*
TM22	MN011929	Actinobacteria	Actinomycetales	Mycobacteriaceae	*Mycobacterium aurum*
TM17	MN005943	Actinobacteria	Actinomycetales	Dermacoccaceae	*Kytococcus schroeteri*
ID1	MK975840	Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	*Arthrobacter crystallopoites*
TM13	MN015582	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	*Bacillus cereus*
TM14	MN005936	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	*Bacillus licheniformis*
TM2	MK004798	Firmicutes	Bacillales	Bacillaceae	*Psychrobacillus psychrodurans*

نتایج

میزان بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت از رشد جدایه بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاه

نتایج نشان داد که میزان بازدارندگی رشد گونه های *P. nicotianae* و *P. citrophthora* تحت تیمار باکتری‌های اندوفیت در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. از میان ۱۷ جدایه (جدول ۲)؛ باکتری‌های اندوفیت، *Paracraurococcus* sp.، *Psychrobacillus psychrodurance* و *Kytococcus schroeteri* به ترتیب با ۸۰، ۷۹ و ۷۷ درصد دارای بیشترین بازدارندگی بر رشد جدایه‌های بیماری‌زا بود که آن‌ها جهت انجام آزمایشات گلخانه ای انتخاب شدند (جدول ۳).

شدت بیماری دانهال‌های بکرایی

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴)، تاثیر عامل باکتری‌های اندوفیت، عامل شبه قارچ‌های بیمارگر و نیز برهمکنش آن‌ها بر روی شدت بیماری زایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

شاخص شدت بیماری

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۴) و مقایسه میانگین داده‌های (جدول ۵) شدت بیماری، بیشترین درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد (۷۷/۵ ٪) در ترکیب باکتری‌های اندوفیت A و C و نیز ترکیب باکتری‌های اندوفیت B و C در حضور بیمارگر *P. nicotianae* مشاهده شد و کمترین درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد (۲۵ ٪) در شرایط حضور ترکیب هر دو

جدول۳. درصد بازدارندگی از رشد شبه قارچ‌های *Phytophthora* spp. در مقابل باکتری‌های اندوفیت جدا سازی شده از نارنگی (*Citrus reticulata* var. siyahoo)

Table 3. Percentage of Inhibitor growth of fungal- like *Phytophthora* spp. By isolated bacterial endophyetes from Mandarin (*Citrus reticulata* var. siyahoo)

Treatments	Inhibitor index Percentage
Arthrobacter crystallopoites + *Phytophthora citrophthora*	8.3 i
Psychrobacillus psychrodurans + *Phytophthora citrophthora*	30.00 c
Curtobacterium flaccumfaciens + *Phytophthora citrophthora*	20.70 d
Okibacterium fritillariae + *Phytophthora citrophthora*	23.00 d
Altererythrobacter sp. + *Phytophthora citrophthora*	24.00 d
Mycobacterium gadium + *Phytophthora citrophthora*	11.00 ghi
Mycobacterium gadium + *Phytophthora citrophthora*	14.70 ef
Bacillus cereus + *Phytophthora citrophthora*	8.70 hi
Bacillus licheniformis + *Phytophthora citrophthora*	24.00 d
Kytococcus schroeteri + *Phytophthora citrophthora*	54.00 b
Nocardioides aromaticivorans + *Phytophthora citrophthora*	9.70 hi
Mycobacterium gadium + *Phytophthora citrophthora*	14.70 ef
Paracraurococcus sp. + *Phytophthora citrophthora*	13.70 efg
Methylopila oligotropha + *Phytophthora citrophthora*	12.00 fgh
Mycobacterium aurum + *Phytophthora citrophthora*	23.3 d
Kocuria palustris + *Phytophthora citrophthora*	12.00 fgh
Cellulosimicrobium sp. + *Phytophthora citrophthora*	22.70 d
Arthrobacter crystallopoites + *Phytophthora nicotianae*	9.00 hi
Psychrobacillus psychrodurans + *Phytophthora nicotianae*	79.00 a
Curtobacterium flaccumfaciens + *Phytophthora nicotianae*	22.70 d
Okibacterium fritillariae + *Phytophthora nicotianae*	23.70 d
Altererythrobacter sp. + *Phytophthora nicotianae*	24.00 d
Mycobacterium gadium + *Phytophthora nicotianae*	10.30 ghi
Mycobacterium gadium + *Phytophthora nicotianae*	13.70 efg
Bacillus cereus + *Phytophthora nicotianae*	8.70 hi
Bacillus licheniformis + *Phytophthora nicotianae*	24.00 d
Kytococcus schroeteri + *Phytophthora nicotianae*	77.00 a
Nocardioides aromaticivorans + *Phytophthora nicotianae*	11.00 ghi
Mycobacterium gadium + *Phytophthora nicotianae*	11.30 fghi
Paracraurococcus sp. + *Phytophthora nicotianae*	80.00 a
Methylopila oligotropha + *Phytophthora nicotianae*	16.30 e
Mycobacterium aurum + *Phytophthora nicotianae*	22.70 d
Kocuria palustris + *Phytophthora nicotianae*	12.00 fgh
Cellulosimicrobium sp. + *Phytophthora nicotianae*	22.70 d

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، بر اساس آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Means that have at least one letter in common are not significantly different from each othet based on the LSD test at the 1 percentage probability level.

گونه‌ی بیمارگرهای *P. nicotianae* و *P. citrophthora* زمان مایه زنی با ترکیب باکتری‌های اندوفیت (A، B و C) و ترکیب باکتری‌های اندوفیت A و B و همچنین در هنگام مایه زنی با باکتری اندوفیت A در شرایط حضور گونه‌های بیمارگر *P. nicotianae* و *P. citrophthora* به طور مجزا دیده شد. دامنه تغییرات شاخص شدت بیماری در شرایط حضور تیمارهای اندوفیتی (مجزا و ترکیبی) بین ۱ تا ۳ مشاهده شد و در حضور سطوح مختلف باکتری‌های اندوفیت و عامل بیماری، کاهش شدت بیماری نمایان شد (شکل ۱).

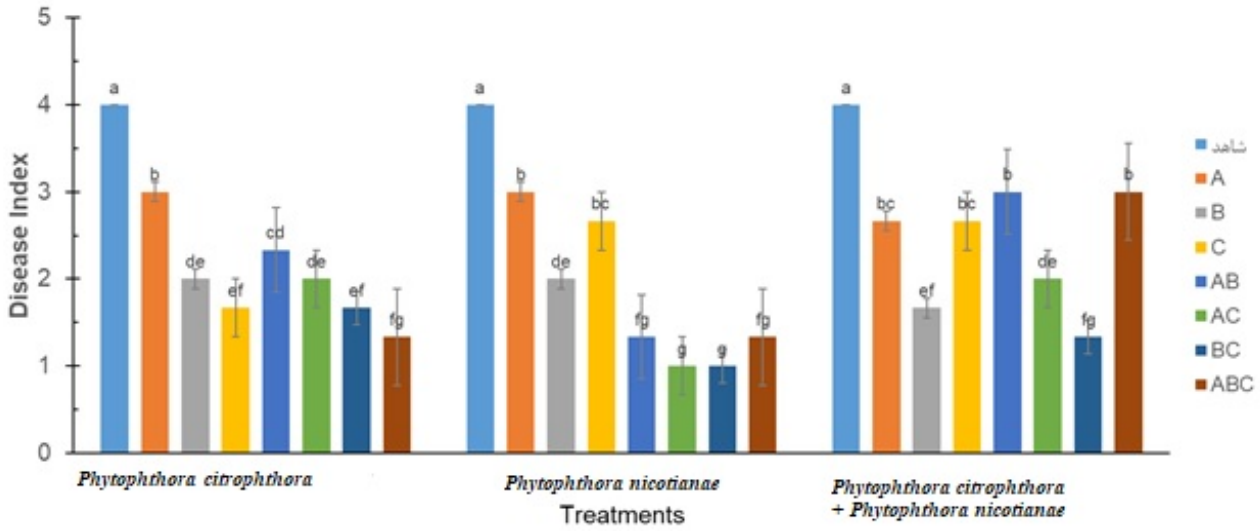
جدول ٤. تجزیه واریانس شدت بیماری زایی بر اساس وزن تر و خشک ساقه و ریشه، طول ساقه، طول ریشه و شدت بیماری دانهال‌های بکرایی

Table 4. Analysis of variance of virulence severity on seedling Bakraii at the base of fresh weight and dry weight of stem and root, length of stem and root, and disease index.

Source of Variation	DF	Mean Squares						
		Root dry weight (g)	Root fresh weight (g)	Stem dry weight (g)	Stem fresh weight (g)	Root length (cm)	Stem height (cm)	Disease Index
Pathogen (A)	3	5.25**	5.13**	1.60**	0.74**	1.00^{ns}	37.12**	32.13**
Biocontrol agent (B)	7	27.43**	32.28**	1.53**	4.81**	48.16**	302.35**	4.73**
A × B	21	2.01**	2.57**	0.40**	0.56**	1.00**	13.9** 7	1.09**
Error	64	0.06	0.06	0.03	0.08	0.38	1.58	0.11
C.V %		3.44	2.02	2.77	1.96	4.12	1.58	19.81

ns و ** به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال یک درصد

ns and** are none significant and significant at 1% probability level, respectively.



شکل ۱. میانگین شاخص بیماری دانهال‌های بکرایی. اعداد ۰ تا ٤ بر اساس علایم بالینی بیماری مندرج در متن رتبه بندی شده‌اند.

Fig 1. Mean of Disease index of sedleeng Bakraii: Numbers 0 to 4 are graded based on the clinical signs of the disease listed in the text.

A: Psychrobacillus psychrodurans, B: Kytococcus schroeteri, C:Paracraurococcus sp., AB: Psychrobacillus psychrodurans + Kytococcus schroeteri, BC: Kytococcus schroeteri + Paracraurococcus sp., AC: Psychrobacillus psychrodurans + Paracraurococcus sp., ABC: Psychrobacillus psychrodurans + Kytococcus schroeteri + Paracraurococcus sp. شاهد بدون اندوفیت،

صفات زیست توده

بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) و مقایسه میانگین‌ها (جدول ۶)، بررسی طول ساقه، طول ریشه، وزن تر ساقه و خشک ساقه، وزن تر ریشه و خشک ریشه نشان داد که مایه زنی با باکتری‌های *K. schroeteri*، *Paracrauroccus* sp. و *P. psychrodurance* در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود وسبب افزایش پارامترهای رشدی در مقایسه با شاهد (عدم مایه زنی باکتری‌های اندوفیت و عدم مایه‌زنی با شبه قارچ‌های بیمارگر)، شد.

جدول ۵. مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری دانهال‌های بکرایی

Table 5. Mean comparison of Disease index on seedling Bakraii

Treatment combination		Disease Index
Pathogen	Endophytic bacteria	
Phytophthora citrophthora	control	4.00^{a}
	A	3.00^{b}
	B	2.00^{de}
	C	1.66^{ef}
	AB	2.33^{cd}
	AC	2.00^{de}
	BC	1.66^{ef}
	ABC	1.33^{fg}
Phytophthora nicotianae	control	4.00^{a}
	A	3.00^{b}
	B	2.00^{de}
	C	2.66^{bc}
	AB	1.33^{fg}
	AC	1.00^{g}
	BC	1.00^{g}
	ABC	1.33^{fg}
Phytophthora citrophthora + *Phytophthora nicotianae*	control	4.00^{a}
	A	2.66^{bc}
	B	1.66^{ef}
	C	2.66^{bc}
	AB	3.00^{b}
	AC	2.00^{de}
	BC	1.33^{fg}
	ABC	3.00^{b}

Control: بدون اندوفیت، A: *Psychrobacillus psychrodurans*, B: *Kytococcus schroeteri*, C: *Paracraurococcus* sp. AB: *Psychrobacillus psychrodurans* و *Kytococcus schroeteri*, BC: *Kytococcus schroeteri* + *Paracraurococcus* sp. , AC: *Psychrobacillus psychrodurans* + *Paracraurococcus* sp. , ABC: *Psychrobacillus psychrodurans* + *Kytococcus schroeteri* + *Paracraurococcus* sp. (LSD test; $p < 0.01$)

طول ساقه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴)، تاثیر عامل باکتری‌های اندوفیت، عامل شبه قارچ‌های بیمارگر و نیز برهمکنش آنها بر صفت طول ساقه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و با بررسی نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۶)، بیشترین طول ساقه (۸۷/۳ سانتی متر) در شرایط عدم حضور جدایه *Phytophthora* و حضور ترکیب باکتری های B و C و نیز در حضور جدایه *P. nicotianae* و ترکیب باکتری‌های B و C مشاهده شد و با طول ساقه در حضور بیمارگر *P. citrophthora* و ترکیب باکتری‌های اندوفیت (C وB) و (C وB و A) در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار نشان ندادند و نسبت به شاهد ۱۷/۹۷ درصد افزایش طول ساقه مشاهده شد. کمترین طول ساقه (۷۰/۳۳ سانتی‌متر) در شرایط حضور هر دو گونه بیمارگر و نیز عدم حضور باکتری‌های اندوفیت بوده است.

وزن تر و خشک ساقه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴)، تاثیر عامل باکتری‌های اندوفیت، عامل شبه قارچ‌های بیمارگر و نیز برهمکنش آنها بر صفت وزن تر ساقه در سطح یک درصد معنی‌دار بود و با بررسی نتایج مقایسه میانگین

جدول٦. مقایسه میانگین تاثیر باکتری‌های اندوفیت (مجزا و ترکیبی) بر صفات زیست توده گیاه بکرایی در حضور شبه قارچ‌های بیمارگر ***Phytophthora nicotianae*** و ***Phytophthora citrophthora*** و ترکیب آن ها.

Table 6. Comparison of the mean effect of endophytic bacteria (separate andcombined) on Biomass parameter of fungal-like pathogenic *Phytophthora nicotianae* , *Phytophthora citrophthora* and their combinations.

Biomass parameter							
Treatmen combination		Mean of stem height (cm)	Mean of stem fresh weight (g)	Mean of stem dry weight (g)	Mean of root fresh weight (g)	Mean of root dry weight (g)	Mean of root length (cm)
Pathogen	Endophytic bacteria						
-	control						
	A	79.33^{fg}	15.06^{d-h}	6.50^{bc}	11.00^{de}	4.00^{l}	15.33^{bcd}
	B	85.00^{abc}	15.26^{c-f}	6.36^{cd}	14.00^{a}	8.00^{a}	17.66^{a}
	C	80.00^{efg}	14.43^{hij}	6.06^{def}	12.00^{c}	5.00^{jk}	14.66^{cd}
	AB	83.00^{cd}	15.13^{d-g}	5.73^{f}	14.00^{a}	8.00^{a}	16.66^{ab}
	AC	75.33^{j}	13.93^{jkl}	5.80^{ef}	11.33^{de}	5.00^{jk}	16.00^{bc}
	BC	87.33^{a}	15.00^{e-h}	6.16^{cde}	11.50^{cd}	7.00^{de}	15.00^{cd}
	ABC	83.00^{cd}	16.03^{a}	6.96^{a}	14.00^{a}	8.00^{a}	14.00^{de}
Phytophthora citrophthora	control	71.33^{kl}	13.50^{l}	5.76^{f}	11.03^{de}	3.50^{m}	11.00^{f}
	A	70.66^{l}	14.83^{f-i}	6.80^{ab}	13.10^{b}	4.00^{l}	15.33^{bcd}
	B	84.00^{bcd}	15.83^{abc}	6.80^{ab}	14.00^{a}	4.16^{l}	17.66^{a}
	C	79.00^{fgh}	15.63^{a-e}	6.80^{ab}	12.00^{c}	5.00^{jk}	14.66^{cd}
	AB	83.00^{cd}	15.63^{a-e}	6.80^{ab}	13.90^{a}	5.73^{f}	16.66^{ab}
	AC	76.00^{ij}	15.16^{d-g}	6.80^{ab}	12.00^{c}	4.93^{jk}	16.00^{bc}
	BC	87.00^{a}	15.83^{abc}	6.86^{ab}	14.23^{a}	7.50^{cb}	15.00^{cd}
	ABC	86.66^{ab}	15.93^{ab}	6.90^{a}	13.93^{a}	5.50^{hi}	14.00^{de}
Phytophthora nicotianae	control	70.66^{l}	13.63^{kl}	5.70^{f}	7.13^{g}	3.20^{m}	11.00^{f}
	A	72.00^{kl}	14.76^{ghi}	5.76^{f}	10.83^{e}	4.00^{l}	15.33^{bcd}
	B	84.00^{bcd}	15.10^{d-g}	5.80^{ef}	13.70^{a}	8.00^{a}	17.66^{a}
	C	79.00^{fgh}	15.00^{e-h}	5.73^{f}	11.90^{c}	5.00^{jk}	14.66^{cd}
	AB	83.00^{cd}	15.56^{a-e}	5.80^{ef}	13.90^{a}	8.00^{a}	16.66^{ab}
	AC	75.33^{j}	15.50^{a-e}	5.80^{ef}	11.23^{de}	5.00^{jk}	16.00^{bc}
	BC	87.33^{a}	15.70^{a-d}	6.80^{ab}	14.20^{a}	7.30^{cd}	15.00^{cd}
	ABC	82.66^{cde}	15.56^{a-e}	6.80^{ab}	14.16^{a}	6.80^{ef}	14.00^{de}
Phytophthora citrophthora + *Phytophthora nicotianae*	control	70.33^{l}	13.66^{kl}	5.70^{f}	10.86^{e}	3.40^{m}	9.00^{g}
	A	73.66^{jk}	13.86^{jkl}	5.70^{f}	11.20^{de}	3.43^{m}	15.33^{bcd}
	B	80.00^{efg}	15.56^{a-e}	6.80^{ab}	13.90^{a}	6.33^{g}	17.66^{a}
	C	80.00^{efg}	15.00^{e-h}	6.80^{ab}	11.50^{cd}	4.86^{k}	14.66^{cd}
	AB	82.66^{cde}	15.46^{a-f}	6.80^{ab}	13.86^{a}	6.40^{fg}	16.66^{ab}
	AC	76.33^{hij}	15.46^{a-f}	6.80^{ab}	11.50^{cd}	5.10^{ijk}	16.00^{bc}
	BC	81.66^{def}	15.50^{a-e}	6.80^{ab}	13.76^{a}	7.86^{ab}	15.00^{cd}
	ABC	80.00^{efg}	15.33^{b-f}	6.80^{ab}	13.00^{b}	5.30^{ij}	14.00^{de}

Control: بدون اندوفیت، A: *Psychrobacillus psychrodurans*, B: *Kytococcus schroeteri*, C: *Paracraurococcus* sp. AB: *Psychrobacillus psychrodurans* و *Kytococcus schroeteri*, BC: *Kytococcus schroeteri* + *Paracraurococcus* sp. , AC: *Psychrobacillus psychrodurans* + *Paracraurococcus* sp. , ABC: *Psychrobacillus psychrodurans* + *Kytococcus schroeteri* + *Paracraurococcus* sp. (LSD test; $p < 0.01$).

میانگین‌های دارای حرف مشترک بر اساس آزمون **LSD** در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Average that have at least one letter in common are not significantly different from each othet based on the LSD test at the 5 percentage probability level.

داده‌ها (جدول ۶)، بیشترین وزن تر ساقه (۱۶/۰۳ گرم) در شرایط عدم حضور بیماری و وجود ترکیب باکتری‌های اندوفیت A، B و C مشاهده شد و نسبت به شاهد ۱۲/۶۴ درصد افزایش وزن تر ساقه مشاهده شد. کمترین وزن تر ساقه (۱۳/۵ گرم) در شرایط حضور بیمارگر *P.citrophthora* و عدم حضور باکتری‌های اندوفیت بود. بیشترین وزن خشک ساقه (۶/۹۶ گرم) هنگام مایه زنی با ترکیب باکتری‌های اندوفیت (C وB، A) و عدم حضور جدایه گونه‌های *Phytophthora* به دست آمد و نسبت به شاهد ۱۷/۹۶درصد افزایش وزن خشک ساقه مشاهده شد.

وزن تر و خشک ریشه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴)، تاثیر عامل باکتری‌های اندوفیت، عامل شبه قارچ‌های بیمارگر و نیز برهمکنش آن‌ها بر صفت وزن تر و خشک ریشه در سطح یک درصد معنی‌دار بود و با بررسی نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۶)، بالاترین مقدار وزن تر ریشه (۱۴ گرم) در ترکیب باکتری‌های اندوفیت (B و A) و باکتری اندوفیت B در شرایط عدم حضور *Phytophthora* مشاهده شد و نسبت به شاهد ۷۵ درصد افزایش وزن تر ریشه مشاهده شد. در اغلب موارد مایه زنی باکتری‌های اندوفیت سبب افزایش وزن تر ریشه شد. همچنین بالاترین مقدار وزن خشک ریشه (۸ گرم) در ترکیب باکتری‌های اندوفیت (C و B) و ترکیب باکتری‌های اندوفیت (B وA) و باکتری اندوفیت B در شرایط عدم حضور بیمارگر *Phytophthora* و در تیمار باکتری اندوفیت B در شرایط حضور گونه ی *P. nicotianae* مشاهده شد و نسبت به شاهد ۱۵۰ درصد افزایش وزن خشک ریشه مشاهده شد.

طول ریشه

بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۴)، تاثیر عامل باکتری‌های اندوفیت، عامل شبه قارچ‌های بیمارگر و نیز برهمکنش آن‌ها بر صفت طول ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و با بررسی نتایج مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۶)، در شرایط عدم حضور جدایه *Phytophthora* و حضور باکتری‌های اندوفیت، افزایش طول ریشه در مقایسه با شاهد (عدم حضور باکتری اندوفیت و جدایه بیمارگر) مشاهده شد. بیشترین طول ریشه (۱۷/۶۶ سانتی‌متر) درشرایط مایه زنی با باکتری اندوفیت B در تمام شرایط حضور و عدم حضور گونه‌های *Phytophthora* مشاهده شد و نسبت به شاهد ۳۵/۸۴ درصد افزایش طول ریشه مشاهده شد. کمترین طول ریشه (۹ سانتی‌متر) در شرایط حضور هر دو گونه‌ی بیمارگر و عدم حضور باکتری‌های اندوفیت بوده است.

بحث و نتیجه‌گیری

Phytophthora به عنوان عامل بیماری‌زای بسیاری از محصولات کشاورزی؛ سبب خسارت‌های قابل توجه در مراحل مختلف کشاورزی شده است. مشخص شده است که هرگاه تعداد زادمایه‌ی جدایه‌های *Phytophthora* کمتر از پنج عدد در سانتی‌مترمکعب خاک باشد، بر روی درختان بکرایی زیان اقتصادی وارد نمی‌کند ولی جمعیت ۱۰ تا ۲۰ عدد زادمایه می‌تواند خسارت وارد کند (Najafiniya *et al.* 2020). تاکنون برای کنترل و مهار بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه از روش‌های شیمیایی استفاده شده که سبب افزایش مقاومت عامل بیمارگر نسبت به درمان می‌شود. از طرفی تحقیقات زیادی نشان داده است که برخی از باکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت توانسته

اند از طریق فعال کردن سیستم‌های دفاعی در گیاهان بیماری‌های قارچی و باکتریایی را کنترل کنند (Rasolisedghiyani *et al.* 2005). با توجه به قدرت ضعیف گونه‌های *Phytophthora* از منظر پوده رستی و رقابت کم آن‌ها با سایر موجودات و تداخل با ریزموجودات زیستی ثانویه، جمعیت آن‌ها در خاک و بافت‌های آلوده به سرعت کاهش می‌یابد (Erwin & Riberio 1996).

تحقیق حاضر نشان داد که باکتری‌های اندوفیت *P. psychrodurans*، *K. schroeteri* و *Paracraurococcus* sp. (به عنوان یک عامل پیشنهادی کنترل زیستی) شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از دو گونه‌ی *P. nicotianae* و *P. citrophthora* در پایه بکرایی را کاهش دادند. این سه باکتری اندوفیت برای اولین بار از نارنگی جدا شده‌اند و تا کنون از گیاه دیگری جداسازی آن گزارش نشده است. در این راستا، کنترل زیستی جدایه *P. citrophthora* توسط باکتری‌های اندوفیت در درخت نارنگی (Zouaoui *et al.* 2019) و کنترل گونه‌ی *P. nicotianae* توسط باکتری *Pseudomonas protegens* strain 14D5 (Yang & Hong 2020) گزارش شده است. عملکرد باکتری‌های اندوفیت روی کنترل بیماری‌های آوندی در مرکبات نیز با موفقیت‌های زیادی همراه بوده است (Araújo *et al.* 2002). کنترل زیستی بیش از ۵۰ درصد ریزش برگ ناشی از بیمارگر *Phytophthora meadii* در درخت کائوچو، توسط شش باکتری اندوفیت گزارش شده‌است (Abraham *et al.* 2013).

اندوفیت‌ها سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند (Cheplick *et al.* 1989). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزایش وزن تر و خشک و طول ریشه، می‌تواند ناشی از اثر باکتری‌های اندوفیت باشد که بخشی از آن به دلیل تولید هورمون‌های گیاهی مانند ۳- ایندول استیک اسید(IAA)، سیتوکنین(Zou &Tan 2001) که برای رشد مطلوب گیاه ضروری می‌باشد (Hornschuh *et al.* 2002) و بخش دیگر به دلیل کمک اندوفیت‌ها در افزایش سطح جذب بهینه عناصر غذایی (Backman *et al.* 2008) به خصوص نیتروژن (Reis *et al.* 2000)، تثبیت نیتروژن(Whipps *et al.* 2001) و فسفر (Gasoni & De Gurfinkel 1997) است. در این پژوهش. به واسطه‌ی استقرار اندوفیت‌ها در گیاه بکرایی، خسارت ناشی از بیمارگر *Phytophthora* به حداقل رسید. باکتری‌های اندوفیت بدون ضرر رساندن به گیاهان، سبب انجام سازوکارهای مختلف از دو طریق یعنی مستقیم یا غیر مستقیم و ارتقای رشد مطلوب گیاه میزبان می‌شوند. به نحوی که هرگاه گیاه میزبان تحت تاثیر برخی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی قرار گیرد، از دو مسیر سبب بهبود رشد گیاه جهت مدیریت و گذراندن دوره‌ی تنش می‌شود. در مسیر اول باکتری با ترشح سیدروفور، تولید سیانید هیدروژن و نیز با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی نظیر لیپاز، پروتئاز، سلولاز، کتیناز، بتا- یک و سه گلوکوناز، آلفا- یک و چهار گتوکوناز و فسفاتاز (Zou &Tan 2001) سبب کاهش تنش (مثل فعالیت بیمارگر) شده و در مسیر دوم از طریق فعال کردن فرآیند مقاومت سیستماتیک القایی ISR(Induction of Systemic Resistance) و نیز تولید ترکیبات دور کننده شیمیایی (Allelochemical) در گیاه (Compant *et al.* 2005)، باعث کنترل تنش می‌شود. در همین راستا، می‌توان به نقش باکتری‌های اندوفیت در کنترل بیماری فوزاریوم توسط باکتری‌های اندوفیت جدا شده از نخود (*Cicer arietinum* L.) از طریق افزایش تنظیم کننده‌های رشد اشاره نمود (Mukheriee *et al.* 2020). با توجه به نقشی که باکتری-های اندوفیت در افزایش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز،

پلی‌فنل‌اکسیداز و ترکیبات فنلی (Safdarpour *et al.* 2019 Shi *et al.* 2011) در هنگام مواجه با تنش‌های زیستی دارند، دانهال‌های بکرایی آلوده به جدایه *Phytophthora* توانسته‌اند با کمترین آسیب این شرایط را تحمل کنند. همسو با نتایج تحقیق حاضر، کاهش معنی‌دار شدت بیماری آنتراکنوز ناشی از *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. در میوه‌های پاپایای *Carica papaya* Linnaeus مایه زنی شده با باکتری اندوفیت *Pseudomonas putida* MGY2، گزارش شده است (Shi *et al.* 2011).

تحقیق حاضر نشان داد که بهبود رشد در اندام‌های هوایی و در اندام‌های زیر زمینی (به خصوص ریشه) پایه بکرایی، ناشی از مایه زنی باکتری‌های اندوفیت و به دنبال آن تولید فاکتورهای موثر در رشد توسط این ریزموجودات می‌باشد. در این راستا، گزارش شده است سویه‌ای از باکتری‌های اندوفیت از ریزوسفر جو

Avena Sativa L. جداسازی شد که در شرایط کمبود آهن؛ سه نوع سیدروفور به نام‌های اسید سالسیلیک، پیوکلین و پیووردین تولید می‌کند که از فاکتورهای موثر در رشد گیاهان محسوب می‌شود (Iswandi *et al.* 1987. Alvani *et al.* 2012). بنابراین هر عاملی که در استقرار بهتر گیاه موثر باشد، توان گیاه را در مواجه با شرایط غیر عادی افزایش می‌دهد.

اندوفیت‌ها متابولیت‌های مختلفی را تولید می‌کنند که هر کدام از آن‌ها عملکرد متفاوتی دارند و این ترکیبات به طور اختصاصی در برخی از آن‌ها شناسایی شده است، مانند نفتا پیرون در *Aspergillus niger* که باعث بازدارندگی از اکسید شدن گزانتین و جلوگیری از رشد برخی میکروب‌ها می‌شود (Song *et al.* 2004) و پکتین-لیاز در *Paenibacillus amylolyticus* که باعث فعال کردن آنزیم پکتیناز می‌شود (Zhang *et al.* 1999). در گیاهان استفاده از ریز موجودات هم‌زیست با ریشه، سبب جذب بهتر مواد غذایی و بهبود رشد اندام‌های هوایی و در نتیجه فتوسنتز و عملکرد بهتر سلول‌های گیاهی هنگام مواجه با تنش‌ها می‌شود (Pal *et al.* 2006).

در این راستا استفاده از باکتری‌های اندوفیت، جهت کنترل عوامل بیماری‌زا در گیاهان، نوید تازه‌ای در مدیریت باغ‌ها و مزارع در مواجه با بیمارگرهای مختلف از جمله جدایه‌های *Phytophthora* را می‌دهد. مهار زیستی بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه در نارنگی با پایه بکرایی و کاهش شدت این بیماری توسط باکتری‌های اندوفیت *P. psychrodurans*، *K. schroeteri* و *Paracraurococcus* sp. برای اولین‌بار در ایران گزارش می‌شود، که سبب افزایش رشد بهینه در گیاه، نظیر افزایش طول ساقه، افزایش وزن ریشه و در نهایت جذب بهتر غذا و فعال کردن سیستم ایمنی گیاه می‌شود. بنابراین باکتری‌های اندوفیت معرفی‌شده در این تحقیق به خوبی اثرات منفی ناشی از حضور بیمارگر شبه قارچی *Phytophthora* که سبب آسیب به ریشه و ضعف و کاهش عملکرد درخت در جذب مواد غذایی می‌شود را جبران کرد و می‌توان این نوع اندوفیت‌های باکتریایی را به عنوان یک ابزار موثر در کنترل زیستی بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه بکرایی (به عنوان یک پایه‌ی مقاوم و مناسب) معرفی‌نمود.

منابع

Abraham A., Philip S., Jacob C. K. and Jayachandran K. 2013. Novel bacterial endophytes from Hevea brasiliensis as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease. Biological Control 58: 675-684.

Ahmadi K., Ebadzadeh H., Hatami F., Hosseinpour R., Ebdeshah H. 2020. Agricultur Statistics, 3st Volume, Horticulture Production. Ministry of Agriculture Planning and Economic Deputy. Information Technology Center Tehran Iran. 156 p.

Akbarpour K. and Banihashemi Z. 1998. Distribution and severity of citrus gummosis in Fars province. Iran. Iranian Journal Plant Pathology. 34: 18–31(in Persian with English Summary).

Alvani S., Rohani H. and Mehdikhani E. 2012. Relationship between hydrogen cyanide and siderophore production by fluorescent Pseudomonads of wheat rhizosphere with growth rate of the plant. Iranian Journal of Plant Protection Science 43:1-12 (in Persian with English Summary).

Araújo W. L., Marcon J., Maccheroni W., van Elsas J. D., van Vuurde J. W. and Azevedo J. L. 2002. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. Applied and environmental microbiology 68: 4906-4914.

Backman P. A. and Sikora R. A. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. Biological control 46: 1-3.

Barka E. A., Gognies S., Nowak J., Audran J. C. and Belarbi A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control 24: 135-142.

Banihashemi Z. 1983a. Detection and isolation of *Phytophthora* spp. In citrus soil and their distribution in citrus growing areas of Southern Iran. Proc. 7th Iran. Plant Protection. Congress. Tehran, Iran. (in Persian with English Summary).

Banihashemi Z. and Fatehi J. 1989. Reaction of cucurbit cultivars to *Phytophthora drechsleri* and *P. capsici* in greenhouse. Proceeding of 9th. Iranian Plant Protection Congress. Mashhad. Iran**:** 89.

Brasier C. M., Sanchez-Hernandez E. and Kirk S. A. 2003. Phytophthora inundata sp. nov., a part heterothallic pathogen of trees and shrubs in wet or flooded soils. Mycological Research 107: 477-484.

Cheplick G. P., Clay K. and Marks S. 1989. Interactions between infection by endophytic fungi and nutrient limitation in the grasses Lolium perenne and Festuca arundinacea. New Phytologist 111: 89-97.

Cho K. M., Hong S. Y., Lee S. M., Kim Y. H., Kahng G. G., Lim Y. P., Kim H. and Yun H. D. 2007. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. Microbial Ecology 54: 341-351.

Erwin D. C. And Riberio O. K. 1996. Phytophthora diseases worldwide. St. Paul, MN: American Phytopathological Society.

Fotouhi Ghazvini R. and Fattahi Moghadam J. 2006. Citrus cultivation in Iran.2th ed. University of Guilan Publications.

Hassan S. E. D. 2017. Plant growth-promoting activities for bacterial and fungal endophytes isolated from medicinal plant of *Teucrium polium* L. Journal of advanced research 8: 687-695.

Hornschuh M., Grotha R. and Kutschera U. 2002. Epiphytic bacteria associated with the bryophyte Funaria hygrometrica: effects of Methylobacterium strains on protonema development. Plant Biology 4: 682-687.

Ippolito A., Decicco V., Cicco E. and Salerno M. 1990. Role of *Phytophthora* spp. in citrus decline in Apulia and Basilicata, Italy. Bulletin EPPO 20: 91-94.

Iswandi A., Bossier P., Vandenabeele J. and Verstraete W. 1987. Effects of seed inoculation with the rhizopseudomonas strain 7NSK2 on the root microbiota of maize and barley. Biology and Fertility of Soil 3: 153-158.

Gilardi G., Demarchi S., Gullino M. L. and Garibaldi A. 2014. Control of *phytophthora nicotianae* of tomato by using non-conventional strategies. In VIII International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfestation 1044: 325-330.

Grech N. M. and Rijkenberg F. H. J. 1992. Injection of electrolytically generated chlorine into citrus microirrigation systems for the control of certain waterborne root pathogens. Plant disease 76: 457-461.

McInroy J. A. and Kloepper J. W. 1995. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. Plant and soil 173: 337-342.

Najafiniya M., Azadvar M. and Jahanshahiafshar F. 2020. Evaluation the Population of Citrus Root Nematode (*Tylenchulus semipenetranse* Cobb, 1913) and semi fungus *Phytophthora nicotianae* (Breda de Hann, 1896) in Healthy and Declining citrus Trees in south of Kerman province. Journal of Applied Research in Plant Protection 8: 29-46 (in Persian with English Summary).

Pal K. K. and Gardener B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor.

Rasolisedghiyani M., Rahimiyan P., Khavari K., and Malakoti M. H. 2005. Study of population density and identification of wheat phizospheric fluorescent pseudomonas in different region in Iran. Journal of Water and Soil Science 19**:**224-234.

Reis V. M., Baldani J. I., Baldani V. L. D. and Dobereiner J. 2000. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. Critical Reviews in Plant Science 19: 227-247.

Safdar A., Javed N., Khan S. A., Khan H. U., Rehman A. and Haq I. U. 2010. Survey and investigation of different citrus growing areas for citrus sudden death syndrome. Pakestanian Jornal of Phytopathology 22: 71-78.

Safdarpour F. and Khodakaramian G. 2019. Assessment of antagonistic and plant growth promoting activities of tomato endophytic bacteria in challenging with *Verticillium dahliae* under in-vitro and in-vivo conditions. Biological Journal of Microorganism 7: 77-90.

Sambroo K. J. and Russell D. W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York: 502- 510.

Sandler H. A., Timmer L. W., Graham J. H. and Zitko S. E. 1989. Effect of fungicide applications on populations of *Phytophthora parasitica*, and on feeder root densities and fruit yields of citrus trees. Plant Disease. 73: 902-906.

Siddiqui Y., and Meon S. 2009. Effect of seed bacterization on plant growth response and induction of disease resistance in chili. Agricultural Sciences in China 8: 963-971

Shekari A., Banihashemi S. Z., naserian E., Saboh Roh Monfared A .2011. Distribution, popopulation density, and virulence of citrus Gummosis and brown rot in Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Pathology 48: 39-53.

Shi J., Liu A., Li X., Feng S. and Chen W. 2011. Inhibitory mechanisms induced by the endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. Biological Control 56:.2-8.

Song Y. C., Li H., Ye Y.H., Shan C. Y., Yang Y. M. and Tan R. X. 2004. Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. FEMS Microbiology Letters 241:.67-72.

Sturz A. V. and Nowak J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Applied soil ecology 15: 183-190.

Waterhouse G. M. 1963a. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Paper 92: 30pp.

Waterhouse G. M. 1970b. The Genus *Phytophthora* deBary. Mycological Paper12: 259 pp.

Waterhouse G. M., Newhook F. J. and Stamps D. J. 1983c. Present criteria for classification of *Phytophthora*. pp:139-147.

Whipps J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of experimental Botany 52: 487-511.

Yang X. and Hong C. 2020. Biological control of *Phytophthora* blight by *Pseudomonas protegens* strain 14D5. European Journal of Plant Pathology 156(2): 591-601.

Tan R. X. and Zou W. X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. Natural product reports 18: 448-459.

Zhang B., Salituro G., Szalkowski D., Li Z., Zhang Y., Royo I., Vilella D., Díez, M. T., Pelaez F., Ruby C. and Kendall R. L. 1999. Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. Science 284: 974-977.

Zouaoui M., Essghaier B., Weslati M., Smiri M., Hajlaoui M. R. and Zouaoui N. S. 2019. Biological control of clementine branch canker caused by *Phytophthora citrophthora*. Phytopathologia Mediterranea 58: 547-558.