Publisher: Soil Science Society of Iran

Soil Biology Journal

/https://sbj.areeo.ac.ir

Research Article

Evaluation of fluorescent pseudomonads isolated from *satureja rechingeri* rhizosphere for the pyoverdine production and plant growth improvement under field conditions

Samaneh Samavat[1] and Mahdiyeh Salehi Vozhdehnazari[2]

[1]Assistant Professor, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; E-mail: samaneh.samavat@gmail.com

[2] Ph.D., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran; E-mail: mahdiyehsalehi1@gmail.com

Article Info

Received:
January 17, 2024
Accepted:
September 16, 2024

Keywords:
Pyoverdine, Rhizobacterium, Medicinalplant, Pseudomonas fluorescens, Satureja rechingeri

Corresponding author's email:
samaneh.samavat@gmail.com

DOI:
10.22092/SBJ.2024.364697.261

Extended Abstract

Background and objectives: In recent years, the growth-promoting effects of native and compatible isolates of *Pseudomonas* particularly the fluorescent pseudomonads, have gained attention for their potential to enhance medicinal plant cultivation. These bacteria, belonging to the genus *Pseudomonas*, produce a siderophore known as pyoverdine under iron-deficient conditions. Besides iron acquisition, *Pseudomonas fluorescens* enhances plant growth by fixing atmospheric nitrogen, synthesizing plant hormones, solubilizing phosphate, and suppressing pathogens. Among the native medicinal plants of Iran, *Satureja rechingeri* Jamzad. (Reshingari savory) is critically endangered and valuable for its medicinal properties. This species has applications in traditional medicine for its antioxidant, digestive, anti-inflammatory, sedative, and disinfectant qualities and is also used as tea and spice. The domestication and cultivation of this plant through eco-friendly means are essential for its conservation. This study aimed to identify native *Pseudomonas fluorescens* isolates with high pyoverdine production and to investigate their effects on the growth of *Satureja rechingeri* under field conditions.

Materials and methods: In this study, sampling was performed randomly from a depth of 25 cm from the roots and rhizospheric soil of *Satureja rechingeri* in its natural habitats in Mehran County, Ilam Province, Iran (n=3). The isolates of fluorescent pseudomonads were screened based on their production of a fluorescent green pigment on King's B medium. Out of 22 isolates, PF4, PF11, and PF19 showed the highest production of fluorescent green pigments around their colonies and were identified as the superior isolates. These isolates were characterized using various biochemical tests, including oxidase, arginine dihydrolase, KOH string test, oxidative-fermentative test, hypersensitive response (HR), levan production, nitrate reduction, catalase, pectinase, lecithinase, gelatinase, starch hydrolysis, and carbohydrate metabolism (involving glucose, fructose, galactose, sucrose, trehalose, xylose, arabinose, sorbitol, adonitol, meso-inositol, ethanol, and glycerol). The pyoverdine production of the superior isolates was measured using succinate medium and optical spectrometry at 400 nm in a completely randomized experiment with three replicates. Reshingari savory seeds were also collected from their natural habitats in Mehran County. After two months of growth in seedling trays under

greenhouse conditions, the 16-leaf seedlings were transferred to the research farm of the Research Institute of Forests and Rangelands, located in Tehran Province. Each two-year-old plant was treated with a suspension of the superior isolate (10^7 CFU/ml) added to the soil, based on a randomized complete block design (n=3, P≤0.05). Seven months after treatment, which coincided with the full flowering stage in the third year of planting, various vegetative traits such as plant height, canopy diameter, total number of branches per plant, number of flowering branches, shoot fresh and dry weights, root fresh and dry weights, root length, and root diameter were measured. For each treatment, three replicates were randomly selected from three blocks. The plots measured 2 x 2 meters, with a distance of two meters between them and a 3-meter distance between blocks.

Results: According to the results, isolates PF4, PF11, and PF19 were classified into biovars II, III, and V of *Pseudomonas fluorescens*, respectively. The highest concentration of the siderophore pyoverdine (0.42 mg/L) was produced by isolate PF11, which was statistically significant (P<0.05). In terms of plant growth parameters, the PF11 treatment resulted in the highest values for plant height (56.4 cm), canopy diameter (61.6 cm), total number of branches per plant (14.7), number of flowering branches (6.33), shoot fresh weight (161.67 g), shoot dry weight (114.3 g), root fresh weight (11.21 g), and root dry weight (7.22 g). Meanwhile, the PF4 treatment yielded the longest root length (14.53 cm) and largest root diameter (0.45 cm).

Conclusion: According to the findings of this study, treating Reshingari plants with the growth-promoting rhizobacterium PF11, a member of the fluorescent pseudomonads capable of producing the microbial siderophore pyoverdine, significantly enhanced plant growth parameters under field conditions. The results also demonstrated that bacterial isolates within the *Pseudomonas fluorescens* species exhibit significant variability in their effectiveness at promoting plant growth. Therefore, it is recommended to use the native and compatible isolate PF11 as a biofertilizer alternative to chemical fertilizers for the cultivation of Reshingari savory.

Cite this article: Samavat, S., Salehi Vozhdehnazari, M., 2024. Evaluation of fluorescent pseudomonads isolated from Satureja rechingeri rhizosphere for the pyoverdine production and plant growth improvement under field conditions. *Soil Biology Journal*, 12 (1), 1-17.

CC BY NC

DOI: 10.22092/SBJ.2024.364697.261
Publisher: Soil Science Society of Iran

دو فصل‌نامه

نشریه زیست‌شناسی خاک

https://sbj.areeo.ac.ir/

مقاله پژوهشی

ارزیابی سودوموناده‌ای فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر مرزه رشینگری برای تولید سیدروفور پایووردین و بهبود رشد گیاه در شرایط مزرعه

سمانه سماوات*[۱] و مهدیه صالحی وژده نظری[۲]

[۱]استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛
samaneh.samavat@gmail.com

[۲]دکتری، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛
mahdiyehsalehi1@gmail.com

دریافت:۱۴۰۲/۱۰/۲۷ پذیرش: ۱۴۰۳/۶/۲۶

چکیده

در سال‌های اخیر، کارآمدی جدایه‌های بومی از سودوموناده‌ای فلورسنت در بهبود رشد انواعی از گیاهان دارویی مورد توجه قرار گرفته‌است. در پژوهش حاضر، از ریشه و خاک ریزوسفر مرزه رشینگری (*Satureja rechingeri*) مستقر در رویشگاه‌های استان ایلام نمونه‌برداری شد. غربالگری سودوموناده‌ای فلورسنت، بر اساس تولید رنگدانه سبز فلورسنت در محیط King's B انجام شد. از بین ۲۲ جدایه، جدایه‌های PF4، PF11 و PF19 با بیشترین تولید رنگدانه سبز فلورسنت، به عنوان جدایه‌های برتر شناخته شدند و به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند. مقدار تولید سیدروفور پایووردین توسط جدایه‌های برتر به کمک محیط سوکسینات و روش طیف سنجی نوری ارزیابی شد. بذور مرزه رشینگری از رویشگاه‌های استان ایلام جمع‌آوری شدند. دو ماه پس از کاشت بذور در گلخانه، گیاهچه‌های ۱۶ برگی به مزرعه، منتقل شدند. هر یک از بوته‌های دو ساله مرزه با سوسپانسیونی (10^7 CFU/ml) از جدایه برتر، به روش افزودن به خاک در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی تیمار شدند ($n=3$, $P\leq0.05$). هفت ماه پس از اعمال تیمارها که مصادف با مرحله گل‌دهی کامل در سال سوم کاشت بود، صفات رویشی متعددی اندازه‌گیری شد. بر طبق نتایج، جدایه‌های PF4، PF11 و PF19 به ترتیب متعلق به بیووارهای II، III و V از *Pseudomonas fluorescens* بودند. بیشترین غلظت پایووردین (۰/۴۲ mg/l) به طور معنی‌داری توسط PF11 تولید شد ($P<0.05$). بیشترین میزان ارتفاع بوته (۵۶/۴ cm)، قطر تاج پوشش (۶۱/۶cm)، تعداد کل شاخه در بوته (۷/۱۴)، تعداد شاخه‌های گل‌دهنده (۶/۳۳)، وزن تر (۱۶۱/۶۷ g) و خشک (۱۱۴/۳ g) اندام‌های هوایی، وزن تر (۱۱/۲۱ g) و خشک (۷/۲۲ g) ریشه در تیمار با PF11 و بیشترین طول (۱۴/۵۳cm) و قطر ریشه (۰/۴۵ cm) در تیمار با PF4 مشاهده شد. به این ترتیب، به‌کارگیری ریزوباکتری بومی و کارآمد PF11 از سودوموناده‌ای فلورسنت، به عنوان جایگزینی برای کودهای شیمیایی در کشت مرزه رشینگری توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پایووردین، ریزوباکتری، گیاه دارویی، *Pseudomonas fluorescens*، *Satureja rechingeri*

استناد: سماوات، س.،صالحی وژده نظری، م.، ۱۴۰۳. ارزیابی سودوموناده‌ای فلورسنت جداسازی شده از ریزوسفر مرزه رشینگری برای تولید سیدروفور پایووردین و بهبود رشد گیاه در شرایط مزرعه. نشریه زیست شناسی خاک، (۱)۱۲، ۱۷-۱.

مقدمه

آهن سومین عنصر غذایی محدود کننده رشد و متابولیسم گیاهان محسوب می‌شود، زیرا عمدتاً در طبیعت به اشکال نامحلول و غیرقابل دسترس برای گیاهان، موجود است. آهن در فعالیت آنزیم‌ها، متابولیسم اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها، تکامل کلروپلاست، فتوسنتز، تنفس سلولی، احیای نیترات و سوخت و ساز اسیدهای آلی در گیاهان نقش مهمی دارد (روت و ساهو، ۲۰۱۵؛ ویجای و همکاران، ۲۰۲۳). کمبود آهن در بسیاری از گیاهان به صورت یک بیماری فیزیولوژیک تظاهر می‌یابد و منجر به کاهش کمیت و کیفیت محصولات گیاهی می‌شود. علایم اصلی کمبود آهن در گیاهان به صورت زردی فواصل بین رگبرگ‌ها و سبز ماندن رگبرگ‌ها، کوتولگی و کاهش رشد ریشه‌ها است (روت و ساهو، ۲۰۱۵؛ والترز و بینگهام، ۲۰۰۷).

از راهکارهای رقابتی گیاهان و میکروارگانیسم‌های هوازی جهت افزایش دسترسی به آهن قابل جذب در شرایط کمبود آهن، تولید انواعی از سیدروفورهاست. سیدروفورها ترکیبات آلی با وزن مولکولی پائین (۲۰۰۰Da -۲۰۰) هستند که پیوندهای شیمیایی با میل ترکیبی بالا و اختصاصی با Fe^{+3} دارند. به عبارت دیگر این ترکیبات نوع خاصی از حامل‌های یونی محسوب می‌شوند که وظیفه افزایش تحرک Fe^{+3} را بر عهده دارند (هیدر و کنگ، ۲۰۱۰؛ ویجای و همکاران، ۲۰۲۳).

باکتری‌های جنس *Pseudomonas* (زیررده گاماپروتئوباکترها[1])، گرم منفی، میله‌ای، فاقد توانایی تولید اسپور و متحرک هستند که از تنوع اکولوژیکی بالایی برخوردارند (پالرونی، ۱۹۹۳). سودوموناده‌های فلورسنت نیز در واقع گروهی از این باکتری‌ها هستند که در شرایط کمبود آهن، تولید سیدروفوری موسوم به پایووردین می‌کنند که به رنگ سبز فلورسنت است (بوسیس و همکاران، ۲۰۰۰). این گروه شامل گونه‌هایی چون *P. fluorescens*، *P. chlororaphis*، *P. putida*، *P. aeruginosa*، *P. syringae* و غیره هستند. بر طبق یافته‌های نصیرزاده و همکاران (۱۴۰۲)، کاربرد سویه‌هایی از جنس *Pseudomonas* منجر به افزایش معنی‌دار غلظت آهن اندام‌هوایی ذرت نسبت به شاهد شد ولی تفاوت معنی‌داری بین سویه‌ها از این نظر مشاهده نشد. توانایی برخی از اعضای این گروه از باکتری‌ها در تحریک رشد گیاهان به عنوان ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPR[2]) به اثبات رسیده است (بوسیس و همکاران، ۲۰۰۰). این عوامل PGPR می‌توانند مستقیماً از طریق تأمین عناصر غذایی چون نیتروژن و فسفر، و یا از طریق ترشح سیدروفورها، هورمون‌ها و ویتامین‌های گیاهی منجر به بهبود رشد گیاهان شوند (سماوات، ۱۳۸۸). داداش پور و همکاران (۱۳۹۹) گزارش کردند که جدایه‌های سودوموناس فلورسنت به‌دست آمده از نمونه‌های ورمی کمپوست از توانایی تحریک‌کنندگی رشد گیاهان برخوردار بودند و قادر به تولید فیتوهورمون اکسین، سیدروفور، و حل‌کنندگی فسفات نامحلول در شرایط آزمایشگاه بودند. ثقفی و همکاران (۱۳۹۸) نیز گزارش کردند که جدایه‌های متعلق به سودوموناس فلورسنت که از ریزوسفر درختان زیتون جداسازی شده بودند، از انواع مکانیسم‌های تحریک‌کنندگی رشد گیاه که شامل تولید سیدروفور، اکسین، سیانیدهیدروژن، و حل‌کنندگی فسفات برخوردار بودند.

اهمیت کاربرد کودهای زیستی به عنوان روش جایگزین کودهای شیمیایی، در رابطه با توسعه کشت گیاهان دارویی که در ارتباط مستقیم با سلامتی انسان هستند، محرز است. در واقع در این قبیل کودهای زیستی از عوامل PGPR به منظور حفظ کیفیت مطلوب خاک و افزایش راندمان جذب عناصر غذایی توسط گیاه بهره برده

1 - Gammaproteobacteria

2- Plant Growth Promoting Rhizobacteria

می‌شود. از جمله گیاهان دارویی باارزش می‌توان به گیاه مرزه (*Satureja* L.) اشاره کرد که متعلق به خانواده نعنا (Lamiaceae) و دارای تعداد زیادی گونه و زیرگونه است. در ایران، برای این جنس ۱۵ گونه معرفی شده که از میان آنها ۱۰ گونه بومی و انحصاری است (جمزاد، ۲۰۱۰؛ شهنازی و همکاران، ۲۰۰۸). از بین گونه‌های بومی، گونه‌ی مرزه رشینگری (*S. rechingeri* Jamzad.)، به عنوان گیاه دارویی چند ساله و معطر در مناطق خشک، آفتابی و خاک های سنگلاخی و آهکی استان ایلام رویش دارد (افضلی یار و همکاران، ۲۰۱۹). اسانس حاصل از این گونه، غنی از ترکیبات فنلی کارواکرول[3] و عصاره‌های آن‌ها شامل اسیدهای فنلی آزاد بویژه رزمارینیک اسید[4] است که باعث گردیده تا از فعالیت زیستی قابل ملاحظه‌ای برخوردار گردند (هادیان و همکاران، ۲۰۱۲). این گونه در طب سنتی به عنوان آنتی‌اکسیدان، تسهیل‌دهنده عمل هضم، ضد التهاب، مدر، مسکن و ضدعفونی کننده و نیز به عنوان دمنوش و ادویه مورد استفاده دارد (امیری و قاسمی رمضان آباد، ۲۰۱۸). همچنین براساس سه معیار گستره پراکنش، سطح اشغال و تعداد افراد بالغ (بر اساس بازدیدهای صحرایی) و با توجه به تعاریف[5] IUCN، گونه مرزه رشینگری در گروه در بحران انقراض[6] طبقه‌بندی شده‌است (محبی و همکاران، ۱۳۹۵).

بنابراین با توجه به اهمیت اهلی سازی و توسعه کشت گیاه دارویی بومی و ارزشمند مرزه رشینگری و تلاش در جهت بهبود استقرار و رشد آن از طریق اعمال روش‌های سازگار با محیط‌زیست، پژوهش حاضر با هدف غربالگری کارآمدترین جدایه‌های بومی و سازگار از سودوموناد‌های فلورسنت به لحاظ تولید سیدروفور پایووردین، و بررسی اثرات تحریک‌کنندگی آن‌ها بر فاکتورهای رویشی مرزه رشینگری تحت شرایط مزرعه انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط کاشت

بذور مرزه رشینگری از رویشگاه‌های منطقه مهران واقع در استان ایلام (۳۳ درجه و ۷ دقیقه و ۱۵ ثانیه عرض شمالی و ۴۶ درجه و ۹ دقیقه و ۵۱ ثانیه طول شرقی) جمع‌آوری شد و پس از شناسایی علمی براساس صفات ریخت‌شناختی (دارای برگ‌های نقره‌ای مایل به خاکستری و گلهایی زرد کمرنگ است)، در اوایل اسفند سال ۱۳۹۹ در سینی نشاء (حاوی ٪۸۰ پیت‌ماس و ٪۲۰ پرلیت) در گلخانه پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور کاشته شد. نشاءها به‌صورت یک روز در میان آبیاری شدند. پس از رسیدن نشاءها به ارتفاع حدود ۱۰ سانتی‌متر، در اواخر فروردین که مصادف با مرحله ۱۶ برگی بود، به مزرعه پژوهشی مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور واقع در استان تهران منتقل شدند. مختصات جغرافیایی محل کشت شامل عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۴۱ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۱۹ دقیقه شرقی، در ارتفاع ۱۳۲۰ متری از سطح دریا، با شیب اصلی ٪۲/۶ (شمال به جنوب) و شیب فرعی ٪۱/۹ (غرب به شرق) است. در سیستم طبقه‌بندی آمبرژه از آب و هوای خشک و سرد با میانگین درجه حرارت سالانه ۱۷/۲°C برخوردار است. حداکثر دمای سالانه ۴۳°C در تیرماه و حداقل آن ۱۵°C- در دی‌ماه با متوسط بارندگی سالانه ۲۳۰/۵ میلی‌متر است.

آزمایش مزرعه در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تیمار و سه تکرار به ازای هر تیمار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی شامل سه جدایه ریزوباکتری برتر از سودوموناد‌های فلورسنت و تیمار شاهد (عدم اعمال هر نوع تیماری) بود. هر بلوک شامل سه کرت و هر کرت با ابعاد ۲×۲ متر، شامل سه ردیف کاشت بود. فاصله بلوک‌ها

3- Carvacrol
4- Rosmarinic acid
5- International Union for Conservation of Nature
6-Critically endangered

از هم سه متر و فاصله کرت‌ها از هم نیم متر در نظر گرفته شد. فواصل ردیف‌های کاشت ۵۰ سانتی‌متر، و فاصله بوته‌ها روی ردیف ۳۰ سانتی‌متر بود. پس از اعمال تیمارها، انتخاب سه تکرار به ازای هر تیمار، به‌طور تصادفی و از بین سه بلوک هر تیمار، انجام شد. آبیاری به‌صورت قطره‌ای انجام شد که در ابتدای رشد گیاهچه‌ها، دو نوبت در هفته و پس از استقرار گیاه، به یک نوبت در هفته در روزهای خنک و یک روز در میان در روزهای گرم رسید. کنترل علف‌های هرز هم به روش دستی انجام شد. همچنین، برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه، مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفته است که اطلاعات حاصل در قسمت نتایج آورده شده است.

جداسازی و خالص‌سازی سودوموناداهای فلورسنت

تعداد ۲۲ جدایه متعلق به سودوموناداهای فلورسنت از سه نمونه خاک ریزوسفری و ریشه که به طور تصادفی و از عمق ۲۵ سانتی‌متری خاک بوته‌های مختلف مرزه رشینگری مستقر در رویشگاه‌های منطقه مهران واقع در استان ایلام (۳۳ درجه و ۷ دقیقه و ۱۵ ثانیه عرض شمالی و ۴۶ درجه و ۹ دقیقه و ۵۱ ثانیه طول شرقی) جمع‌آوری شده بودند، غربالگری و خالص‌سازی شدند. برای این منظور، از روش پورپلیت و کشت باکتری‌ها بر روی محیط کشت افتراقی King's B استفاده شد. به منظور ممانعت از رشد قارچ‌ها، آنتی‌بیوتیک سیکلوهگزمید به نسبت ۵۰۰mg/L به محیط‌کشت اضافه شد. پس از کشت، باکتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲±۲۷°C در انکوباتور قرار داده شدند. سپس اقدام به جداسازی پرگنه‌هایی شد که در برابر لامپ UV بیشترین خاصیت فلورسنس را نشان دادند (رسولی صادقیانی و همکاران، ۲۰۰۶).

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش کمی

مقدار ۱۰۰µL از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های باکتریایی برتر در محیط‌کشت مایع سوکسینات (K_2HPO_4: ۶g، KH_2PO_4: ۳ g، $MgSO_4.7H_2O$: ۰/۲ g، NH_4SO_4: ۱ g، سوکسینیک اسید: ۴ g، آب مقطر: ۱۰۰۰ml، pH= ۷) به ارلن‌های ۱۰۰mL حاوی ۴۰ mL محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲±۲۷°C و ۱۲۰ rpm روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژ کردن در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری‌ها میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰nm نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد (کاستاندا و همکاران، ۲۰۰۵). در این بررسی از یک جدایه غیرفلورسنت از باکتری *Pseudomonas* sp. که قادر به تولید سیدروفور پایووردین نبود، به عنوان شاهد استفاده شد. نتایج حاصل از میزان جذب نوری مایع رویی عصاره باکتری‌ها در طول موج ۴۰۰nm با استفاده از فرمول زیر بر حسب میلی‌گرم پایووردین خالص در لیتر محاسبه شد (شریفی، ۱۳۸۶).

$$Y= ۲/۹۲ X+ ۰/۲۳۷$$

Y: میزان جذب نوری قرائت شده در طول موج ۴۰۰nm

X: غلظت پایووردین بر حسب میلی‌گرم در لیتر

شناسایی سودوموناداهای فلورسنت

شناسایی سه جدایه باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19)، به کمک روش‌های بیوشیمیایی و مطابق با روش‌های استاندارد انجام گرفت. برای این منظور آزمون حساسیت به KOH 3% مطابق روش ساسلو و همکاران (۱۹۸۲)، آزمون هوازی یا بی‌هوازی بودن (O/F) طبق روش هوق و لیفسون (۱۹۵۳)، آزمون اکسیداز به روش کوواکس (۱۹۵۶)، آزمون فوق حساسیت در توتون بر اساس کلمنت و همکاران (۱۹۶۴)، تولید لوان در محیط کشت دارای سوکروز ۵٪ و احیای نیترات به روش للیوت و همکاران (۱۹۸۴)، هیدرولیز آرژنین مطابق تورنلی (۱۹۶۰)،

آزمون‌های گرم، کاتالاز، تحمل نمک طعام ۵٪، تولید آنزیم‌های پکتیناز، لهاندن سیب زمینی، رشد در دمای ۴ و ۴۱°C و تولید رنگ فلورسنت در محیط کشت King's B مطابق روش شاد و همکاران (۲۰۰۱)، هیدرولیز نشاسته گراهام و هوگکیس (۱۹۶۷)، آزمون‌های لستیناز و ذوب ژلاتین به روش مک فادین (۱۹۸۰) انجام شد.

در بررسی جدایه‌ها به لحاظ تولید قند از کربوهیدرات‌های گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، سوکروز، ترهالوز، زایلوز، آرابینوز، سوربیتول، آدونیتول، مزو-اینوزیتول، اتانول و گلیسرول و استفاده آن‌ها از اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی شامل نیکوتینات، سیترات، مالات، تریپتوفان و آرژنین از محیط پایه Ayer (آیر و همکاران، ۱۹۱۹)، استفاده شد. تمامی قندها، اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی پس از تندال شدن[7] با غلظت نهایی ۰/۲ درصد به محیط پایه Ayer که حاوی ۱/۲٪ آگارز بود اضافه شدند.

تیمار بوته‌های مرزه رشینگری با سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی برتر

از کشت ۴۸ ساعته هریک از سه جدایه باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19) از گونه *P. fluorescens*، در محیط کشت King's B، به کمک آب مقطر استریل، سوسپانسیونی با جمعیت 10^7cfu/ml بر اساس روش طیف‌سنجی نوری تهیه شد. در اواسط اردیبهشت، ۲۵ ml از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌های باکتریایی به روش افزودن به خاک به هر یک از بوته‌های دو ساله مرزه رشینگری کاشته شده در هر یک از سه بلوک (به ازای هر تیمار) در شرایط مزرعه، افزوده شد. به تیمار شاهد در شرایط مشابه فقط آب مقطر داده شد (بشان، ۱۹۹۸).

اندازه‌گیری فاکتورهای رویشی

پس از گذشت هفت ماه از زمان اعمال تیمارها که مصادف با مرحله گل‌دهی کامل در سال سوم کاشت بود، صفات رویشی متعددی از جمله ارتفاع بوته، قطر تاج پوشش، تعداد کل شاخه در بوته، تعداد شاخه‌های گل‌دهنده، طول ریشه، قطر ریشه، وزن تر اندام‌های هوایی، وزن خشک اندام‌های هوایی، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه بوته‌های تیمار شده در قیاس با شاهد اندازه‌گیری و ارزیابی شد. اندازه‌گیری صفات با استفاده ازخط‌کش و ترازوی الکتریکی صورت گرفت (بشان و د-بشان، ۲۰۰۵).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های حاصل از مطالعات مورفولوژیکی بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی و با سه تکرار مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آزمایش‌های صورت گرفته در شرایط آزمایشگاهی در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شدند. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (IBM SPSS Statistics V 26) انجام شد.

نتایج

آنالیز خاک مزرعه

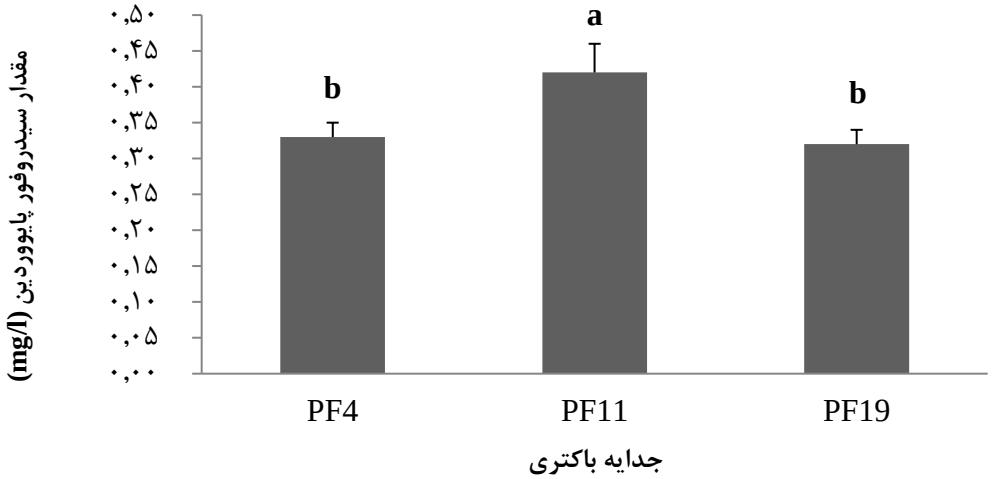
بر اساس آنالیز انجام گرفته، خاک منطقه دارای بافت لومی شنی و اسیدیته ۷/۸ بود. دیگر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه محل اجرای پروژه شامل: ازت کل: ۰/۰۶٪، کربن آلی: ۰/۴۹٪، پتاسیم قابل جذب: ۱۷/۴۳ ppm، فسفر قابل جذب: ۴/۳ ppm، شوری: dS/m ۱/۲۹، رطوبت اشباع: ۲۵/۶۱٪، آهک: ۵/۵٪، گچ: ناچیز، آهن: ۷/۷ mg/Kg، کربنات محلول: ۴/۸ mEq/L، بی

7- Tyndallization

کربنات محلول: mEq/L ۱۲، منیزیوم: mEq/L ۴/۴۸، کلسیم: mEq/L ۲/۱۶، و سدیم: mEq/L ۴۸/۶۴ بود.

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش کمی

بر اساس آزمون غربالگری اولیه به کمک محیط کشت افتراقی King's B، از میان ۲۲ جدایه باکتریایی به دست آمده، سه جدایه باکتریایی (PF4, PF11, PF19) به لحاظ کیفی از بیشترین توانایی در تولید رنگدانه سبز فلورسنت برخوردار بودند. بر این اساس، کارایی این سه جدایه به عنوان جدایه‌های باکتریایی برتر در سایر آزمون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. در آزمون کمی بررسی میزان تولید سیدروفور پایووردین توسط جدایه‌های باکتریایی برتر در محیط کشت سوکسینات مشخص شد که جدایه PF11 از بیشترین قابلیت (۰/۴۲ mg/l) از این نظر برخوردار بود و در سطح اطمینان ۹۵٪ با دو جدایه PF19 و PF4 اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس مربوطه در جدول (۱) آورده شده است.



شکل ۱- میزان سیدروفور پایووردین تولید شده توسط جدایه‌های باکتریایی مورد مطالعه در محیط کشت مایع سوکسینات تحت شرایط آزمایشگاهی. آزمون در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی انجام شد (n=3). حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است ($P<0.05$)

جدول ۱- تجزیه واریانس میزان تولید سیدروفور پایووردین توسط جدایه‌های باکتریایی متعلق به *P. fluorescens* تحت شرایط آزمایشگاهی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	معنی‌داری
بین تیمارها (میزان تولید سیدروفور)	۲	۰/۰۰۹*	۰/۰۱۲
خطا (درون تیمارها)	۶	۰/۰۰۱	
مجموع	۸		
ضریب تغییرات (%CV)	۱۵/۲۳		

* معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪

شناسایی سودوموناده‌های فلورسنت

شناسایی سه جدایه باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19) با تکیه بر روش‌های بیوشیمیایی انجام گرفت (جدول ۲). بر اساس نتایج به دست آمده جدایه PF4 متعلق به *P. fluorescens* bv. II، جدایه PF11 متعلق به *P. fluorescens* bv. III و جدایه PF19 متعلق به *P. fluorescens* bv. V تشخیص داده شدند

. جدول ۲- ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های باکتریایی برتر جداسازی شده از ریزوسفر مرزه رشینگری

آزمون	PF19	PF11	PF4
O/F	O	O	O
KOH 3%	+	+	+
کاتالاز	+	+	+
گرم	+	+	+
NaCl 5%	+	+	+
هیدرولیز نشاسته	−	−	−
رنگدانه فلورسنت	+	+	+
رنگدانه غیرفلورسنت	−	−	−
آرژنین دهیدرولاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
احیای نیترات	−	+	+
لستیناز	+	+	−
لهیدگی سیب زمینی	−	−	−
فوق حساسیت (HR)	−	−	−
لوان	−	−	+
رشد در ۴۲°C	−	−	−
رشد در ۴°C	+	+	+
ذوب ژلاتین	+	+	+
استفاده از ال-آرابینوز	+	+	+
استفاده از دی-زایلوز	+	+	+
استفاده از ال- تارتاریک اسید	+	+	−
استفاده از دی- آلانین	+	+	+
استفاده از سوربیتول	+	+	+
استفاده از ترهالوز	−	+	+
استفاده از دی- گالاکتوز	+	+	+
استفاده از سوکروز	+	+	+
استفاده از مزو اینوزیتول	+	+	+
استفاده از آدونیتول	−	+	−
استفاده از اتانول	+	+	+
استفاده از ژرانیول	−	−	−
استفاده از بوتیرات	+	+	+
استفاده از والرات	+	+	+
استفاده از نیکوتینات	+	−	−
استفاده از فنیل استات	−	−	−
استفاده از بوتیل آمین	+	+	−
استفاده از گلوکز	+	+	+
استفاده از فروکتوز	+	+	+
استفاده از گلیسرول	+	+	+
استفاده از سیترات	+	+	+
استفاده از مالات	+	+	+
استفاده از تریپتوفان	−	−	−
استفاده از آرژنین	+	+	+

(-): واکنش منفی، (+): واکنش مثبت

اندازه‌گیری فاکتورهای رویشی

ارتفاع بوته، قطر تاج پوشش، تعداد کل شاخه در بوته، تعداد شاخه‌های گل‌دهنده، طول ریشه، قطر ریشه، وزن تر اندام‌های هوایی، وزن خشک اندامهای هوایی، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه بوته‌های مرزه رشینگری تیمار شده با جدایه‌های باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19) اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه شدند. تجزیه واریانس فاکتورهای رویشی مورد بررسی تحت شرایط مزرعه در جدول (۳) آورده شده است

.

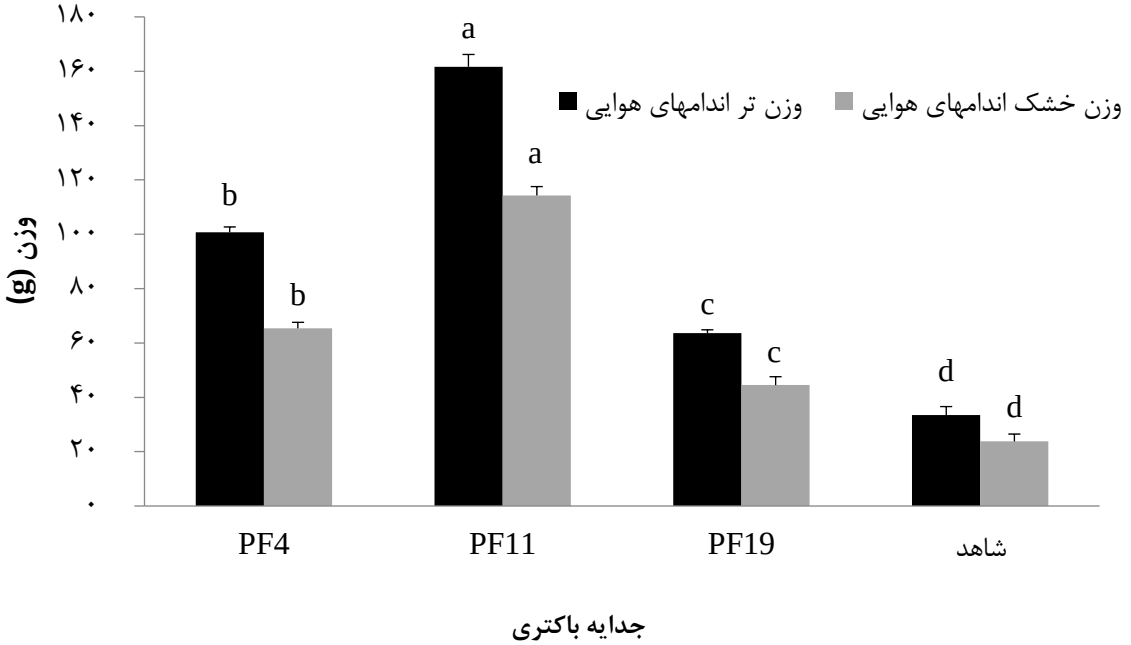
جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات رویشی بوته‌های مرزه رشینگری تیمار شده توسط جدایه‌های باکتریایی برتر متعلق به *P. fluorescens* تحت شرایط آزمایشگاهی. آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شده است (n=3) (P<0.05)

منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر اندامهای هوایی (g)	وزن خشک اندامهای هوایی (g)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ریشه (g)	ارتفاع بوته (cm)	طول ریشه (cm)	قطر ریشه (cm)	قطر تاج پوشش (cm)	تعداد کل شاخه در بوته	تعداد شاخه‌های گل‌دهنده
تکرار	۲	۰/۵	۴/۷	/۱۱	/۲۳	۸۶	/۰۹	۰۰	۲	۰	۷۵
				۰	۰	۲/	۰	۰/۱	۰/۴	۰/۸	۱/
تیمار با باکتری	۳	۹/۷*	/۶**	۵**	۷**	**	۵**	۰/۰۰۴ns	*	**	**
		۱۴۲	۴۵۱۲	۳۲/۶	۱۵/۲	۲۰۴/۶۱	۱۱/۷	*	۵۷۱/۵	۸/۳۱	۹/۴۲
خطا	۶	۱/۶	۹/۱	۰/۸	۰/۱	/۸	/۱۴	۰۰	۷	۶	۴۲
		۱				۴	۰	۰/۱	۴/۸	۰/۴	۰/

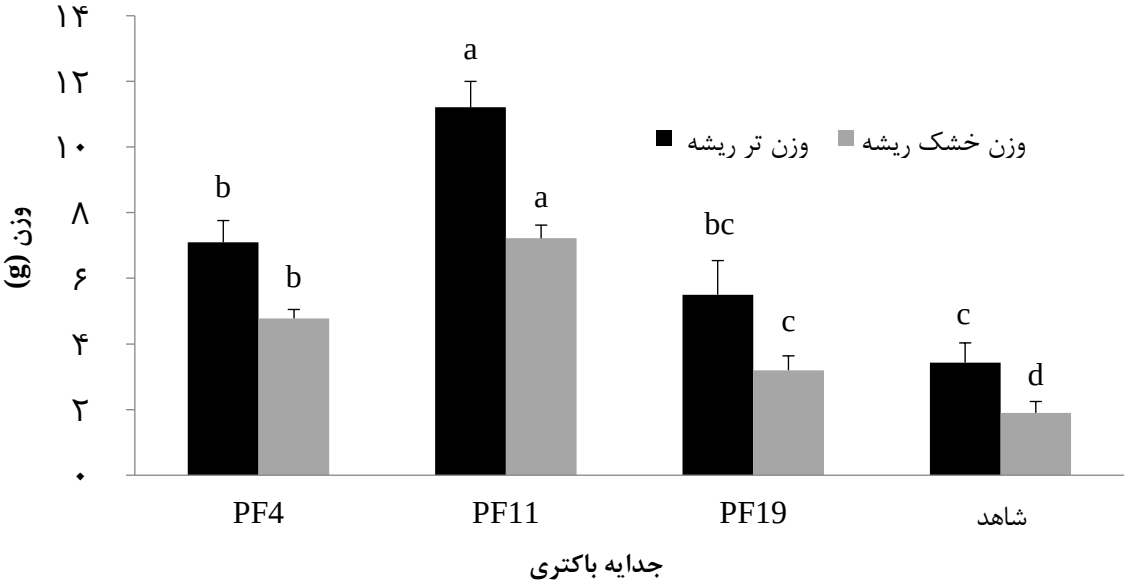
* معنی‌دار سطح اطمینان ۹۵٪
** معنی‌دار سطح اطمینان ۹۹٪
ns معنی‌دار نیست

وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه مرزه رشینگری

در بررسی اثر تیمار با سه جدایه باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19) بر فاکتورهای رویشی چون وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه بوته‌های مرزه رشینگری مشخص شد که تیمار با این جدایه‌های باکتریایی در اغلب مواقع به طور معنی‌داری منجر به بهبود میزان کمی این صفات در مقایسه با شاهد شد (P<0.05). جدایه PF11 نیز اختلاف آماری معنی‌داری در مقایسه با شاهد و سایر جدایه ها نشان داد و در گروه اول آماری قرار گرفت (شکل ۲ و ۳). پس از آن، جدایه‌های PF4 و PF19 به ترتیب از بیشترین کارایی از این نظر برخوردار بودند. جدایه PF19 به لحاظ اثر بر میزان وزن تر ریشه با شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداد (P<0.05).



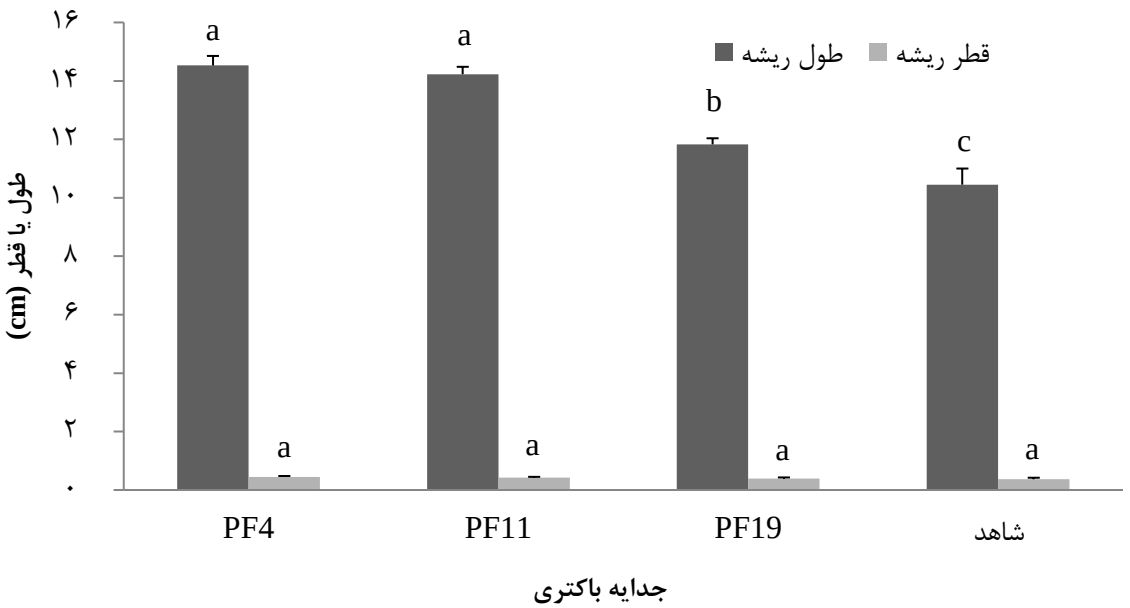
شکل ۲- اثر تیمار با جدایه‌های باکتریایی (PF4, PF11, PF19) بر وزن تر و خشک اندام‌های هوایی مرزه رشینگری تحت شرایط مزرعه. آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد (n=3). حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است (P<0.05)



شکل ۳- اثر تیمار با جدایه‌های باکتریایی (PF4, PF11, PF19) بر وزن تر و خشک ریشه مرزه رشینگری تحت شرایط مزرعه. آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد (n=3). حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است (P<0.05)

قطر و طول ریشه مرزه رشینگری

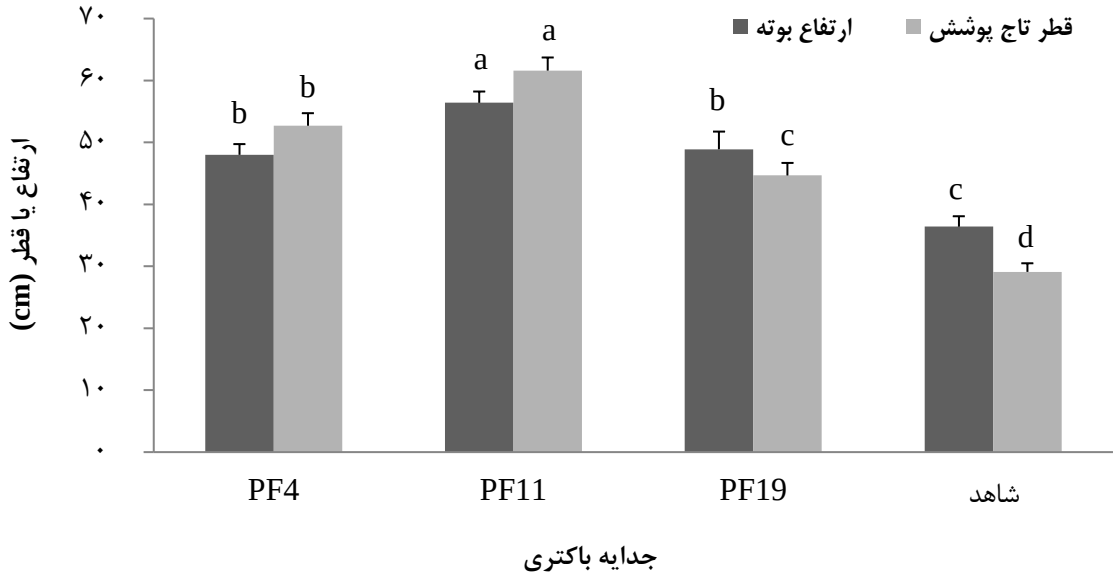
در بررسی اثر تیمار با سه جدایه باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19) بر قطر ریشه بوته‌های مرزه رشینگری مشخص شد که تیمار با این جدایه‌های باکتریایی به طور معنی‌داری منجر به بهبود میزان کمی این صفت در قیاس با شاهد شد (P<0.05). جدایه PF11 و PF4 نیز اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند و در گروه اول آماری قرار گرفت (شکل ۴). به لحاظ اثر بر میزان قطر ریشه، هر سه جدایه با شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نشان ندادند (P<0.05).



شکل ۴- اثر تیمار با جدایه‌های باکتریایی (PF4, PF11, PF19) بر قطر و طول ریشه مرزه رشینگری تحت شرایط مزرعه. آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد (n=3). حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است (P<0.05)

قطر تاج پوشش و ارتفاع بوته مرزه رشینگری

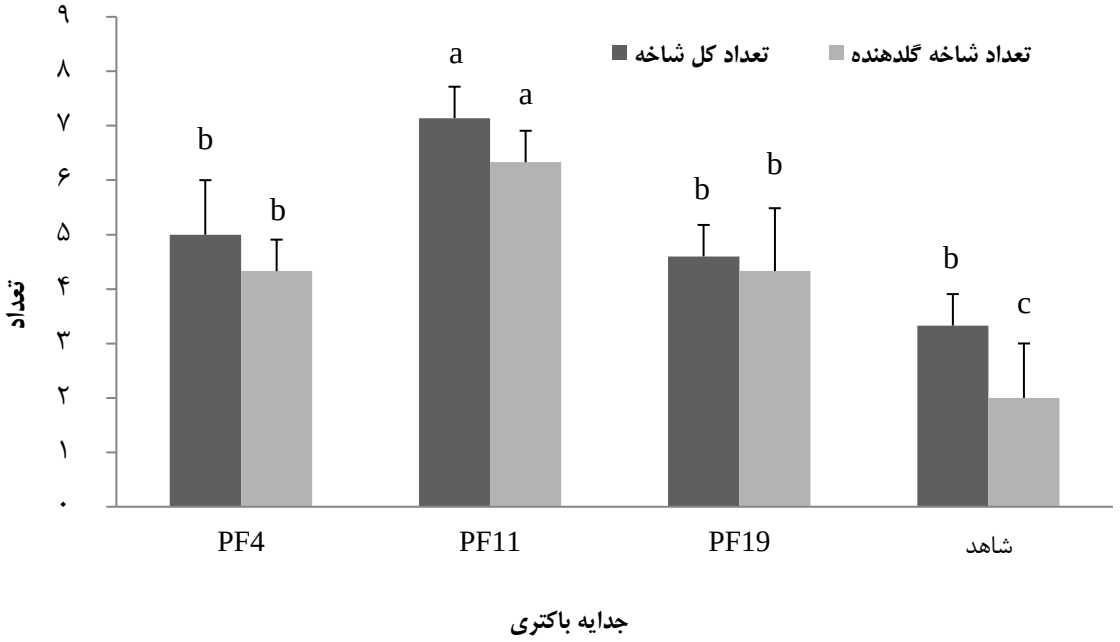
در بررسی اثر تیمار با سه جدایه باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19) بر فاکتورهای رویشی چون قطر تاج پوشش و ارتفاع بوته‌های مرزه رشینگری مشخص شد که تیمار با این جدایه‌های باکتریایی به طور معنی‌داری منجر به بهبود میزان کمی این صفات در قیاس با شاهد شد (P<0.05). در خصوص هر دو صفت، جدایه PF11 بیشترین کارایی را نشان داد و در گروه اول آماری قرار گرفت (شکل ۵). جدایه‌های PF4 و PF19 به لحاظ اثر بر ارتفاع بوته اختلاف آماری معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ولی در خصوص اثر بر قطر تاج پوشش جدایه PF4 کاراتر بود و اختلاف آماری معنی‌داری با PF19 نشان داد (P<0.05).



شکل ۵- اثر تیمار با جدایه‌های باکتریایی (PF4, PF11, PF19) بر قطر تاج پوشش و ارتفاع بوته مرزه رشینگری تحت شرایط مزرعه. آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد (n=3). حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است (P<0.05)

تعداد شاخه گل‌دهنده و تعداد کل شاخه بوته‌های مرزه رشینگری

در بررسی اثر تیمار با سه جدایه باکتریایی برتر (PF4, PF11, PF19) بر فاکتورهای رویشی چون تعداد شاخه گل‌دهنده و تعداد کل شاخه بوته‌های مرزه رشینگری مشخص شد که تیمار با جدایه PF11 از بیشترین کارایی برخوردار بود و در قیاس با شاهد و سایر جدایه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری نشان داد و در گروه اول آماری قرار گرفت ($P<0.05$). دو جدایه PF4 و PF19، اگرچه به لحاظ اثر بر تعداد کل شاخه با شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند ولی در اثر بر تعداد شاخه گل‌دهنده با شاهد اختلاف آماری معنی‌داری نشان دادند (شکل ۶).



شکل ۶- اثر تیمار با جدایه‌های باکتریایی (PF4, PF11, PF19) بر تعداد شاخه گلدهنده و تعداد کل شاخه مرزه رشینگری تحت شرایط مزرعه. آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد (n=3). حروف مشابه بیانگر عدم اختلاف آماری است ($P<0.05$)

بحث

امروزه به منظور افزایش باروری خاک و تولید محصولات در کشاورزی پایدار، کودهای زیستی می‌تواند جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی (اعم از فسفات، ازت، گوگرد و آهن) محسوب شوند. کودهای زیستی در قیاس با کودهای شیمیایی مزیت‌های قابل توجهی دارند، از جمله این‌که در چرخه غذایی، تولید مواد سمی نمی‌کنند، قابلیت تکثیر خود به خودی دارند، باعث اصلاح خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک می‌شوند، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و سازگار با محیط‌زیست هستند (آقاعلیخانی و همکاران، ۱۳۹۲). اگرچه کاربرد عوامل PGPR به صورت انواعی از کودهای زیستی به منظور بهبود عملکرد کمی و کیفی برخی محصولات کشاورزی قدمت زیادی دارد ولی در حوزه گیاهان دارویی مطالعات معدودی در این زمینه انجام گرفته است.

بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، مشخص شد که از بین ۲۲ جدایه به دست آمده از سودوموناده‌های فلورسنت مستقر در ریزوسفر مرزه رشینگری، سه جدایه PF4، PF11، و PF19، که متعلق به گونه *P. fluorescens* بودند، از بیشترین قابلیت به لحاظ تولید سیدروفور برخوردار بودند. همچنین، توانایی این جدایه‌ها در میزان تولید سیدروفور نوع پایووردین، متفاوت از یکدیگر بود. به طوری که جدایه PF11 به طور معنی‌داری، بیشترین میزان پایووردین را

تولید کرد و در گروه اول آماری قرار گرفت. سماوات (۱۳۸۸) نیز گزارش کرد که دو جدایه UTPF68 و UTPF109 متعلق به *P. fluorescens* از قابلیت یکسانی از نظر تولید سیدروفور نوع پایووردین تحت شرایط کمبود آهن و در محیط کشت سوکسینات برخوردار نبودند. در ارزیابی فلور میکروبی ریزوسفر گونه‌های مختلف گیاهی، نیز مشخص شده است که به لحاظ تعداد، گروه سودوموناد‌های فلورسنت از برتری بیشتری در مقایسه با سایر گروه‌های باکتریایی برخوردار هستند و جدایه‌ها و گونه‌های متنوع درون این گروه، از نظر توانایی در تولید انواع مختلف سیدروفور متنوع هستند (رسولی صدقیانی و همکاران، ۲۰۰۶).

در پژوهش حاضر نیز اثرات تیمار بوته‌های مرزه رشینگری با سه جدایه باکتریایی برتر PF4، PF11، و PF19، از *P. fluorescens*، بر فاکتورهای رویشی گیاه تحت شرایط مزرعه مورد ارزیابی قرار گرفت. بر طبق یافته‌های به دست آمده مشخص شد که تیمار بوته‌های مرزه با این ریزوباکترها در اغلب مواقع منجر به افزایش معنی‌داری در صفات رویشی مورد بررسی که شامل وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی، ارتفاع بوته، قطر و طول ریشه، قطر تاج پوشش، تعداد شاخه گل‌دهنده و تعداد کل شاخه در بوته بود، در مقایسه با شاهد شد. در این زمینه نیز کارایی جدایه‌ها متفاوت از یکدیگر بود و جدایه PF11 به طور معنی‌داری، از بیشترین قابلیت در بهبود فاکتورهای رشدی مرزه رشینگری در قیاس با سایر تیمارها برخوردار بود. فاطما و همکاران (۲۰۰۶)، نیز نشان دادند که کاربرد کودهای زیستی (باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و حل‌کننده فسفات) روی گیاه مرزنجوش، منجر به بهبود شاخص‌های رشدی آن شد. خالدیان و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که کاربرد توأم سویه‌هایی از عوامل PGPR (شامل: *Sinorhizobium meliloti* Rm1021، *Bacillus subtilis* BS119m، *Bradyrhizobium* sp. USDA4438، و *P. fluorescens* WCS417r) منجر به افزایش معنی‌داری در ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن خشک و تر ریشه و اندام‌های هوایی، تعداد انشعابات شاخه، و تعداد شاخه‌های گل‌دهنده گیاهان دارویی ریحان کوهی (*Ocimum basilicum* L.) و مرزه دارویی (*Satureja hortensis* L.) شد. همچنین مشخص شد که محتوای عناصری چون ازت، مس، فسفر، پتاسیم، و آهن در گیاهان تیمار شده در قیاس با شاهد تیمار نشده افزایش یافت. رای و همکاران (۲۰۲۳) نیز نشان دادند که تیمار بوته‌های آلوئه ورا با سویه‌هایی از باکتری‌های *P. putida* و *Pseudomonas* sp. که از توانایی در حل‌کنندگی فسفات معدنی برخوردار بودند، منجر به افزایشی معنی‌دار در میزان رشد این گیاه دارویی باارزش شد. در واقع، عوامل PGPR با بهبود جذب عناصر غذایی در گیاه و متعاقباً افزایش میزان فتوسنتز و رشد گیاه، در نهایت باعث بهبود گلدهی و افزایش تعداد سرشاخه گلدار در گیاهان دارویی می‌شود (ویسانی و همکاران، ۱۳۹۱). به این ترتیب یافته‌های حاصل آمده، با نتایج سایر محققین مبنی بر اثرات مثبت کاربرد سودوموناد‌های فلورسنت بر فاکتورهای رویشی گیاه دارویی مرزه رشینگری مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

با توجه به یافته‌های پژوهش حاضر، تیمار بوته‌های مرزه رشینگری با ریزوباکتری محرک رشد PF11 از گروه سودوموناد‌های فلورسنت با قابلیت تولید سیدروفور میکروبی پایووردین منجر به بهبود شاخص‌های رشدی گیاه تحت شرایط مزرعه شد. همچنین مشخص شد که کارآمدی جدایه‌های باکتریایی متعلق به گونه *P. fluorescens* از نظر اثرگذاری بر صفات مورد مطالعه می‌تواند به طور معنی‌داری متفاوت از یکدیگر باشد. بر این اساس، بکارگیری جدایه بومی و سازگار PF11 به عنوان جایگزینی برای مصرف کودهای شیمیایی، در کشت مرزه رشینگری توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاران بخش گیاهان دارویی و معطر مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، قدردانی می‌شود

فهرست منابع

[۱] آقاعلیخانی، م.، ایرانپور، الف. و نقدی بادی، ح. ۱۳۹۲. تغییرات عملکرد زراعی و فیتوشیمیایی سرخارگل (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) تحت تأثیر اوره و کود زیستی. فصلنامه گیاهان دارویی ۱۲ (۲): ۱۲۱-۱۳۶.

[۲] ثقفی، ک.، احمدی، ج.، اصغرزاده، الف.، رکنی زاده، ح. و حسینی مزینانی، س.م. ۱۳۹۸. جداسازی، شناسایی و بررسی ویژگی‌های محرک رشدی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر درختان زیتون در خاک‌های شور دوفصلنامه زیست شناسی خاک ۷ (۱): ۱۳-۲۷.

[۳] داداش پو، ت.، سلطانی طولارود، ع.الف.، قویدل، الف. و عباس‌زاده دهجی، پ. ۱۳۹۹. رزیابی صفات محرک رشد گیاهی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جداسازی شده از ورمی‌کمپوست. دوفصلنامه زیست شناسی خاک ۸ (۲): ۱۶۵-۱۷۶.

[۴] سماوات، س. ۱۳۸۸. بررسی برهمکنش جدایه هایی از جنس *Rhizobium* و *Pseudomonas* در کنترل مرگ گیاهچه لوبیا سبز ناشی از *Rhizoctonia solani*. پایان نامه کارشناسی ارشد. پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران ۱۰۹ صفحه.

[۵] شریفی، ر. ۱۳۸۶. بررسی نقش سیدروفور سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل *Rhizoctonia solani* روی لوبیا و تأثیر برخی شرایط محیطی روی آن. پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی. گروه گیاهپزشکی. دانشگاه تهران. ۸۹ صفحه.

[۶] محبی، ج.، جم‌زاد، ز. و بخشی‌خانیکی، غ.ر. ۱۳۹۵. جایگاه حفاظتی شش گونه انحصاری مرزه در ایران. نشریه طبیعت ایران ۱ (۱): ۷۴-۷۹.

[۷] نصیرزاده، الف.، عباس‌زاده دهجی، پ.،, حمیدپور، م.، اخگر.، ع. و کریمان، خلیل. ۱۴۰۲. تأثیر کابرد باکتری‌های حل‌کننده ترکیبات نامحلول روی و پودر لاستیک بر رشد و محتوای روی و آهن در گیاه ذرت دوفصلنامه زیست شناسی خاک. ۱۱ (۱): ۶۳-۸۳.

[۸] ویسانی، و.، رحیم‌زاده، س. و سهرابی، ی. ۱۳۹۱. تأثیر کودهای بیولوژیک بر صفات مورفولوژیک، فیزیولوژیک و میزان اسانس گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.). تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۸ (۱): ۷۳-۸۷.

[9] Afzalifar, M., Hadian, J., Mirjalili, M.H. and Enayati Shariatpanahi, M. 2019. Study of androgenesis of two medicinal plants *Satureja khuzistanica* Jamzad and *S. rechingeri* Jamzad. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology) 31 (4): 458-470.

[10] Amiri, H. and Ghasemi Ramadanabad. Z. 2018. The effects of salinity on chemical composition of essential oil of *Satureja rechingeri*. Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology) 31(2): 248-257.

[11] Ayer, S.H., Rupp P. and Johnson, W.T. 1919. A study of alkali-forming bacteria in milk. U.S. Department of Agriculture, Bullock. 782.

[12] Bashan, Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances 16(4): 729-770.

[13] Bashan, Y. and de-Bashan, L.E. 2005. Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: A critical examination. Soil Biology & Biochemistry. Soil Biology and Biochemistry 37 (10): 1795-1804 10.1016/j.soilbio.2005.02.013.

[14] Bossis, E., Lemanceau, P., Latour, X. and Gardan, L. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie 20: 51-63.

[15] Castaneda, G.C., Mounoz, T.J.J. and Videa, J.R.P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. Microchemical Journal 81: 35-40.

[16] Fatma, E.M., El-Zamik, I., Tomader, T., El-Hadidy, H.I., Abd El-Fattah, L. and Seham Salem, H. 2006. Efficiency of biofertilizers, organic and in organic amendments application on growth and essential oil of marjoram (*Majorana hortensis* L.) plants grown in sandy and calcareous. Zagazig University and Soil Fertility and Microbiology Department, Desert Research Center, Cairo, Egypt.

[17] Graham, D. C. and Hodgkiss, W. 1967. Identification of gram negative, yellow pigmented, fermentative bacteria isolated from plants and animals. Journal of Applied Bacteriology 30: 175-189.

[18] Hadian, J., Akramian, M., Heydari, H., Mumivand, H. and Asghari, B. 2012. Composition and in vitro antibacterial activity of essential oils from four *Satureja* species growing in Iran. Natural Product Research 26(2): 98-108.

[19] Hider, R.C. and Kong, X. 2010. Chemistry and biology of siderophores. Natural Product Reports 27: 637-657.

[20] Hugh, R. and Leifson, E. 1953. Taxonomic significance of versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology 66: 24-26.

[21] Jamzad, Z. 2010. A new species of *Satureja* (Lamiaceae) from Iran. The Iranian Journal of Botany 16 (2): 213-217.

[22] Khalediyan, N., Weisany, W. and Schenk, P.M. 2021. Arbuscular mycorrhizae and rhizobacteria improve growth, nutritional status and essential oil production in *Ocimum basilicum* and *Satureja hortensis* Industrial Crops and Products. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113163

[23] Klement, Z., Farkas G.L. and Lovrekovich, H. 1964. Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology 54: 474-477.

[24] Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas* pyocyanean by the oxidase reaction. Nature 178: 703.

[25] Lelliot, R.A. and Dickey, R.S. 1984. Genus VII Erwinia, In: Krieg, eds. N. R., Halt, J. G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co., The Baltimore Vol, 1, P. 469-476.

[26] Mac Faddin, J.F. 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins, Baltimore.

[27] Palleroni, N.J. 1993. *Pseudomonas* classification. Antonie van Leeuwenhoek 64: 231-251.

[28] Rai, A., Singh, V.K., Sharma, N.K., Singh, J.S., Singh, V.K., Dwivedi, B.S. and Rai, P.K. 2023. Effect of fluorescent *Pseudomonas* on plant growth promotion of *Aloe vera*. Journal of Plant Nutrition. https://doi.org/10.1080/01904167.2023.2294936

[29] Rasouli Sedghiani, M.H., Khavazi, K., Rahimian, H., Malakouti, M.J. and Asadi Rahmani, H. 2006. An evaluation of the potentials of indigenous fluorescent Pseudomonades of wheat rhizosphere for producing siderophore. Iranian Journal of Soil and Water Sciences 20(1):133-143.

[30] Rout G.R. and Sahoo, S. 2015. Role of iron in plant growth and metabolism. Reviews in Agricultural Science 3: 1-24.

[31] Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.

[32] Shahnazi, S., Khalighi-Sigaroodi, F., Ajani, Y., Yazdani, D., Taghizad–Farid, R., Ahvazi, M et al. 2008. The chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Satureja intermedia* C. A. Mey. Journal of Medicinal Plants 7 (25): 85-92.

[33] Suslow, T.U., Schroth, M.N. and Isaka M. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72: 917-918.

[34] Thornley, M.J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology 23: 37-52.

[35] Vijay, K., Shibasini, M., Sivasakthivelan, P. and Kavitha, T. 2023. Microbial siderophores as molecular shuttles for metal cations: sources, sinks and application perspectives. Archives of Microbiology 205(9): 322. https://doi.org/10.1007/s00203-023-03644-3

[36] Walters, D.R. and Bingham, I.J. 2007. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. Annals of Applied Biology 151: 307-324.