فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال دوم، شماره ۵، بهار ۱۳۹۲، صفحه ۵۱- ۶۰
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۹ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۲/۱۸

مطالعه باکتری‌های اندوفیتیک جداشده از گیاه سویا و نقش آن‌ها در کنترل برخی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

یاسمین خطیری: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، ایران، yasminkhatiri@yahoo.com *
نیما بهادر: استادیار میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات فارس، ایران، dr.bahador@fsriau.ac.ir
حمیدرضا پردلی: استادیار میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، ایران، hr.pordeli@gorganiau.ac.ir

چکیده

مقدمه: باکتری‌های اندوفیتیک باکتری‌هایی هستند که در درون بافت‌های گیاهان بدون ایجاد آسیب ظاهری به گیاه زندگی می‌کنند. به تازگی این گروه از میکروارگانیسم‌ها از بخش‌های مختلف گیاهان جدا شده اند که توانایی فعالیت ضد قارچی و باکتریایی را از خود نشان می‌دهند. از آنجایی‌که امروزه از اندوفیت‌ها به عنوان بارور کننده‌ها و یا ترکیبات شیمیایی میکروب کش در کشاورزی استفاده می‌شود، بنابراین هدف از تحقیق حاضر، جداسازی این باکتری‌ها از گیاه سویا و تاثیر متابولیت‌های ضد میکروبی تولید شده توسط این ارگانیسم‌ها بر پاتوژن‌های قارچی فوزاریوم سولانی و و آلترناریا آلترناتاست.

مواد و روش‌ها: در تحقیق حاضر، ابتدا جداسازی باکتری‌های اندوفیتیک از ساقه و برگ گیاه سویا به‌شکل رقت متوالی بر روی محیط کشت برین‌هارت اینفیوژن آگار انجام شد. سپس، نمونه‌ها از نظر توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی علیه دو پاتوژن قارچی آلترناریا الترناتا (PTCC۵۲۲۴) و فوزاریوم سولانی (PTCC۵۲۸۴) در شرایط آزمایشگاهی به روش خطی و انتشار در چاهک مطالعه شدند. باکتری‌هایی که توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی را داشتند با استفاده از کیت Api20NE شناسایی و منحنی رشد آن‌ها ارزیابی شد.

نتایج: در مجموع ۳۹ باکتری از ساقه و برگ سویا جداسازی شد که از بین آن‌ها ۲۰ باکتری متعلق به ساقه‌ها و ۱۹ باکتری از برگ‌های گیاه سویا جداسازی شدند. از کل باکتری‌های جداسازی شده ۳ باکتری اثر ممانعتی نشان دادند که نمونه‌های شناسایی شده توسط Api، به جنس سودوموناس آئروجینوزا متعلق هستند. از بین باکتری‌های تولید کننده متابولیت‌های ضد میکروبی، سودوموناس ائروجینوزا بیش‌ترین تاثیر را روی فوزاریوم سولانی داشت. همچنین نتایج به‌دست آمده از منحنی رشد باکتری‌ها بیانگر آن است که بیشتر میکروارگنیسم‌ها ترکیبات خود را در ۱۸ ساعت اولیه تولید نموده اند که در برخی از سوش‌ها تا ۷۲ ساعت ادامه یافته است.

بحث و نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که گیاه سویا حاوی باکتری‌های اندوفیتیکی است که اثر ممانعتی علیه پاتوژن‌های گیاهی دارذ و می‌توان از ترکیبات تولید شده در تحقیقات بعدی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: Glycine sp.، باکتری‌های اندوفیتیک، قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

قارچ‌های فوزاریوم سولانی[1] و آلترناریا الترناتا[2] از جمله قارچ‌های موثر درایجاد بیماری در گیاهان هستند این قارچ‌ها از معمول‌ترین قارچ‌های جداسازی شده در آرژانتین و سایر مناطق جهان هستند (۱ و ۴). آلترناریا الترناتا در همه مکان‌ها دیده شده و تقریبا از تمامی زیستگاه‌ها ایزوله شده است (۵ و ۱۰). بیماری‌های ایجاد شده توسط این قارچ خیلی رایج هستند. گیاهان میزبان مهمی برای این ارگانیسم به شمار می‌آیند به‌طوری‌که می‌تواند از گیاهانی مانند سیب، بروکلی، هویج، انواع سیب زمینی، گوجه فرنگی، لیمو، گل کلم و حتی گیاهان علفی جدا شود. این قارچ به طور معمول قسمت‌های هوایی گیاهان را مورد تهاجم قرار می‌دهد (۱۱) و می‌تواند علائم مختلفی را شامل: لکه‌ها و زخم‌ها را برروی برگ‌ها ایجاد کند (۱۲). در واقع این قارچ موجب بیماری‌های نکروتیک در گیاهان مختلف (۱۳ و ۱۴) و در نهایت به مرگ کامل گیاه منجر می‌شود. از طرف دیگر این پاتوژن سبب بیماری بادزدگی در گیاهانی از جمله پنبه می‌شود (۱۵).

قارچ فوزاریوم سولانی یکی دیگر از فراوان‌ترین قارچ‌های جداسازی شده از خاک و گیاهان از بین رفته است (۱۶ و ۱۷). این قارچ در بسیاری از محصولات زراعی سبب پژمردگی و به میزان در خور توجهی سبب از بین رفتن محصول می‌شود (۱۸). همچنین می‌تواند سبب قهوه ای شدن درونی ساقه‌ها و ریشه نیز شود (۱۹). سویه‌های فوزاریوم سولانی به‌قدری فراوانی‌شان در خاک و مواد گیاهی فاسد زیاد است که به‌عنوان تجزیه کنندگان محسوب می‌شوند. همچنین آن‌ها پاتوژن‌هایی با اختصاصیت میزبانی در شمار زیادی از گیاهان با اهمیت در کشاورزی از جمله لوبیا، خیار و سیب زمینی شیرین محسوب می‌شوند. علاوه بر این آن‌ها در رابطه با عفونت‌های فرصت طلب در انسان و حیوان نیز موثر هستند و سبب عفونت سیستمیک با میزان مرگ و میر بالا می‌شوند (۲۰). با توجه به این‌که این دو قارچ از قارچ‌های مهم در ایجاد بیماری در گیاهان به شمار می‌آیند، هدف از تحقیق حاضر، جداسازی باکتری‌های اندوفیتیک از گیاه سویا و تاثیر متابولیت‌های ضد میکروبی تولید شده توسط این ارگانیسم‌ها بر پاتوژن‌های قارچی فوزاریوم سولانی و آلترناریا الترناتا است.

مواد و روش‌ها

قارچ‌های تهیه شده

در تحقیق حاضر، برای ارزیابی ترکیبات ضد قارچی تولید شده توسط باکتری‌های اندوفیتیک جداسازی شده از گیاه سویا از نمونه‌های قارچی معتبر (*Alternaria alternate*PTCC 5224; *Fusarium solani* complex PTCC5284) به شکل آمپول‌های لیوفلیزه از مرکزکلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های ایران استفاده شد و طبق دستورالعمل مرکز احیا شدند.

شرایط کشت گیاه سویا

بذرهای گیاه سویا به نام D. P. X کتول از سازمان دانه‌های روغنی گرگان خریداری شدند و در گلدان‌های به اندازه ۱۲۰ در ۸۴ با عمق ۸۰ سانتی‌متری کاشته شدند. سه روز پس از کاشت، جوانه‌ها بیرون زدند. به علت سردی هوا گلدان‌ها در دمای اتاق (۲۷ تا ۳۰) درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای رشد گیاهان، آبیاری گلدان‌ها به شکل سه روز یک‌بار به مقدار لازم انجام می‌شد و به مدت ۵۰ تا ۷۰ روز در مجاورت نور خورشید به شکل دائمی قرار داده شدند.

جداسازی باکتری‌های اندوفیتیک از گیاه سویا

باکتری‌های اندوفیتیک بر اساس روش ارائه شده توسط هونگ و آناپورنا جداسازی شدند (۲۱). به این ترتیب که ابتدا چند گیاه سالم را که قبلاً در گلدان‌ها کاشته شده بودند با ریشه از خاک در آورده و به آزمایشگاه منتقل شدند. گیاهان به آرامی در زیر آب قرار گرفتند تا گل و لایشان زدوده شود. در مرحله بعد چند برگ تازه وبه ظاهر سالم نیز از قسمت‌های نزدیک جوانه‌ها و قسمت‌های بالایی و میانی انتخاب کرده و در یک پلیت بزرگ گذاشته شدند. علاوه بر این ساقه‌های گیاه را از ۱۰ سانتی‌متر بالاتر از سطح زمین و قسمت‌های بین برگ‌ها جدا نموده و با یک تیغه استریل به قطعات ۳ تا ۴ سانتی‌متری بریده شدند ودر یک پلیت بزرگ جداگانه قرار داده شدند. سپس بخش‌های جداسازی شده با آب مقطر در پلیت شسته، به‌وسیله یک پنس استریل به پلیت دیگر منتقل و به مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد قرار داده شدند. سپس دوباره با پنس استریل به پلیت دیگر منتقل و به مدت ۵ دقیقه درهایپرکلریت سدیم ۲ درصد غوطه ور شدند. در مرحله بعد با پنس استریل به پلیت استریل دیگر منتقل و ۵ بار با آب مقطر استریل شسته شدند تا به طور کامل سطح آن‌ها عاری از مواد ضد عفونی کننده شود. سپس دو هاون و دسته تمیز برداشته، درون آن‌ها الکل ریخته و شعله ور شده تا بدین ترتیب استریل و عاری از میکروب شوند. سپس دو سی سی آب مقطر استریل داخل هاون ریخته شده و بخوبی با دسته هاون ساقه‌ها و برگ‌ها کوبیده شدند تا به طور کامل عصاره شان بیرون آمده و به شکل یک سوسپانسیون همگن شوند.

شایان ذکر است که برای جداسازی باکتری‌های اندوفیتیک از سوسپانسیون‌های تهیه شده از برگ و ساقه به میزان یک میلی‌لیتر و به طور جداگانه به ۹ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث استریل افزوده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد از محیط‌های کشت کدر شده به کمک آب مقطر استریل رقت متوالی ($۱۰^{-۸}$-$۱۰^{-۱}$) تهیه شد. از سه رقت نهایی به میزان یک دهم میلی‌لیتر برداشته و به شکل سفره‌ایی به کمک میله شیشه ای استریل در سطح پلیت حاوی محیط کشت برین‌هارت اینفیوژن آگار تلقیح شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت انکوبه شدند. پس از گذشت زمان ذکر شده کلونی باکتری‌های ظاهر شده بر روی پلیت‌ها که از نظر شکل و قوام متفاوت بودند، بر اساس باکتری‌های اندوفیتیک ایجاد شده از ساقه و برگ به‌طور جداگانه شماره گذاری شدند. شایان ذکر است که خالص‌سازی در طی چند مرحله و در زمان‌های مختلف پس از کشت انجام شد (۲۱).

ارزیابی اثر مهاری باکتری‌های اندوفیتیک بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

انتشار در چاهک

در این مرحله ابتدا محیط کشت سابورود دکستروز براث[۳] برای رشد قارچ‌های تهیه شده از مرکز ذخایر ژنتیکی تهیه نموده، نمونه‌های مذکور در محیط‌های اشاره شده تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین، باکتری‌های اندوفیتیک جداسازی شده به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه انکوبه شدند. سپس سوسپانسیون باکتریایی (اندوفیتیک) در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و سانتریفوژ شدند. پس از آن به میزان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌ها برداشته و بر روی محیط کشت مولر

هینتون آگار به شکل سفره ایی به طور کامل به کمک میله شیشه ای استریل کشت داده شدند. سپس به کمک بورل استریل چهار چاهک به‌طور منظم درپلیت‌ها ایجاد شدند. به کمک سمپلر از سوپرناتانت اندفیتیک‌ها به میزان ۵۰ لاندا برداشته و به آرامی چاهک‌ها پر شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند. پس از گذشت زمان یاد شده قطر هاله‌ها ارزیابی و نتایج ثبت شد (۲۲).

روش خطی موازی

در این روش هر کدام از پاتوژن‌ها برروی پلیت مولر هینتون آگار[۴] به شکل خطی کشت داده شدند و باکتری‌های اندوفیتیک به شکل عمود با قارچ‌های پاتوژن کشت داده شدند. پلیت‌ها در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت قرار داده، نتایج ارزیابی و ثبت شدند (۲۳).

شناسایی باکتری‌های تولید کننده ترکیبات ضد قارچی با استفاده از کیتAPi (بیومریکس[۵] فرانسه)

نمونه‌هایی که تاثیر ضد قارچی را از خود نشان دادند انتخاب شده و پس از انجام آزمون‌های اولیه مانند رنگ آمیزی گرم، آزمایش‌های اکسیداز، کاتالاز و اکسیداتیو/فرمنتاتیو توسط کیت‌های NE 20 شناسایی شدند. به این ترتیب که نمونه های خالص شده اندوفیتیکی، به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت نوترینت براث تلقیح شدند. سپس، تحت شرایط استریل نمونه ها به هریک از لوله های کیت‌ها اضافه و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در نهایت، پس از افزودن برخی از معرف‌ها بر اساس دفترچه شناسایی کیت و تغییر رنگ ایجاد شده از طریق سایت بیومریکس شناسایی شدند.

منحنی رشد باکتری‌های تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی

در این مرحله ۳ باکتریی که اثر ممانعتی از خود نشان داده بودند در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شدند. پس از گذشت زمان‌های متوالی (۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۷۲ ساعت) جذب نوری میکروارگانیسم‌های تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی در طول موج ۶۲۰ نانومتر ارزیابی و منحنی رشد آن‌ها رسم شد.

نتایج

جداسازی باکتری‌های اندوفیتیک از گیاه سویا

در آزمایش یاد شده ۳۹ باکتری جداسازی شد که ۲۰ باکتری از ساقه و ۱۹ باکتری از برگ‌های گیاه سویا بودند. پس از انجام آزمایش‌های اولیه برای شناسایی مشخص شد که ۱۰ باکتری جداشده از ساقه و ۷ باکتری جداشده از برگ گرم منفی و ۱۰ باکتری جدا شده از ساقه و ۱۲ باکتری جداشده از برگ گرم مثبت بودند. این باکتری‌ها به شکل‌های کوکسی، میله ای، فیلامنتوس و باسیلوس مشاهده شدند.

ارزیابی اثر مهاری باکتری‌های اندوفیتیک بر قارچ‌های بیماری زای گیاهی

از بین ارگانیسم‌های جداسازی شده ۳ باکتری تأثیر ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های خریداری شده را نشان دادند که تمامی آن‌ها گرم منفی بودند. از این تعداد دو ارگانیسم به ساقه و یک ایزوله دیگر به برگ گیاه سویا مربوط بودند. نتایج اثر آنتاگونیستی ایزوله‌هایی که هاله عدم رشد را نشان داده اند به شکل مجزا علیه پاتوژن‌ها در جداول۱ و۲ آمده است. همچنین شکل‌های ۱ و ۲ عدم رشد را به شکل خطی موازی و انتشار در چاهک نشان داده است.

جدول ۱- قطرهاله‌های ایجاد شده علیه آلترناریا الترناتا به روش انتشار در چاهک

ردیف		۱	۲	۳
کد		Cl9	Cs9	Cl17
قطر هاله عدم رشد علیه آلترناریا الترناتا (میلی متر)	۲۴ ساعت	۲۲	۰	۲۰
	۴۸ ساعت	۲۱	۰	۲۰
	۷۲ ساعت	۱۸	۱۰	۱۶

Cl:کلونی جداشده از برگ

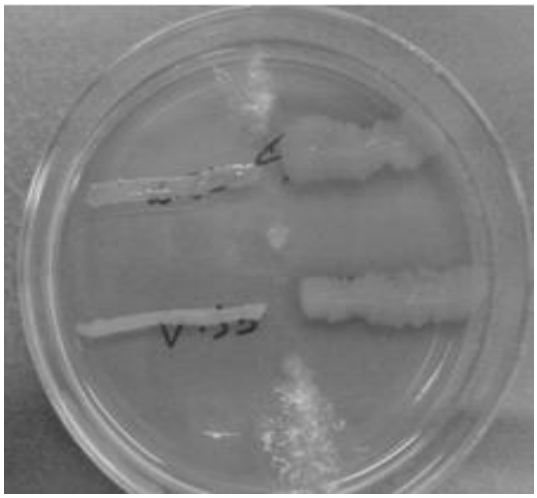
Cs: کلونی جداشده از ساقه

جدول ۲- قطرهاله‌های ایجاد شده علیه فوزاریوم سولانی به روش انتشار در چاهک

ردیف		۱	۲	۳
کد		Cl9	Cs9	Cl17
قطرهاله عدم رشد علیه فوزاریوم سولانی (میلی متر)	۲۴ ساعت	۲۲	۰	۱۸
	۴۸ ساعت	۲۱	۰	۲۲
	۷۲ ساعت	۱۸	۱۰	۱۶

Cl:کلونی جداشده از برگ

Cs: کلونی جداشده از ساقه



شکل ۱- نمونه ایی از تأثیر باکتری‌های جداسازی شده بر قارچ آلترناریا آلترناتا به روش خطی موازی

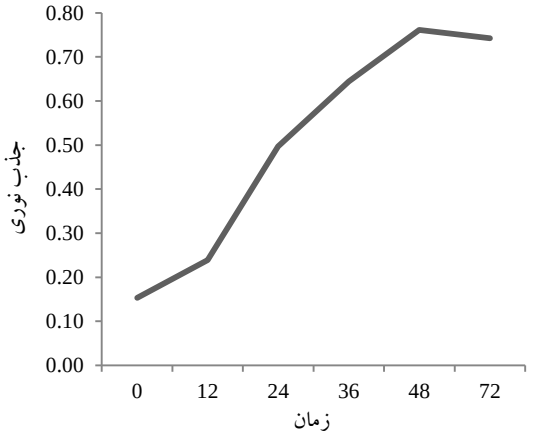
شکل ۲- تأثیر آنتاگونیستی برخی از سویه‌ها علیه فوزاریوم سولانی به روش انتشار در چاهک

شناسایی باکتری‌های تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی با استفاده از کیت APi

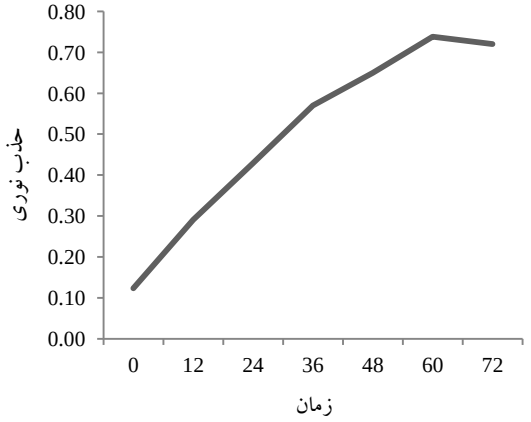
شناسایی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از کیت‌های Api انجام شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از شبکه Api، هر سه ارگانیسم مورد نظر سودموناس آئروجینوزا بوده اند. ویژگی تأثیر دو تای آن‌ها که از برگ (Cl9,Cl17) به‌دست آمده است مشابه بود؛ به‌طوری‌که شماره پروفیل به‌دست آمده از طریق شبکه برای هر دونمونه یکسان (۰۱۵۴۵۷۴) و با ۹۸/۹ درصد نزدیکی سودوموناس آئروجینوزا گزارش شده است. نمونه دیگر (Cs9) که از ساقه به‌دست آمده است با نزدیکی ۹۸/۸ درصد وشماره پروفیل (۱۵۴۴۷۴) نیز سودموناس آئروجینوزا گزارش شده است. شایان ذکر است که در برخی ازآزمایش‌ها تفاوت‌هایی مشاهده شده است که می‌توان آن را مربوط به استرین‌های متفاوت از جنس سودموناس نسبت داد.

منحنی رشد باکتری‌های تولید کننده ترکیبات ضد میکروبی

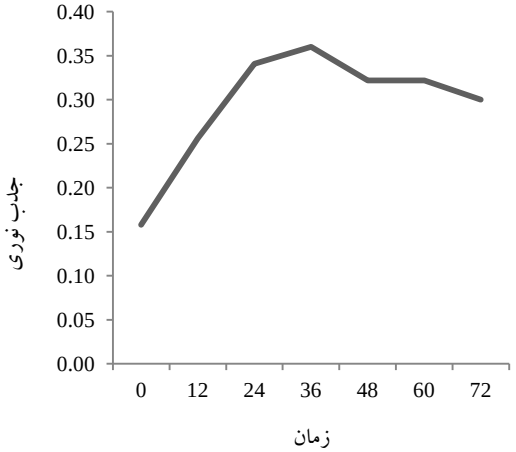
شکل‌های۳ تا ۵ بیانگر رشد میکروارگانیسم در فازهای مختلف زمانی است. از طرف دیگر در این فازهای زمانی، تولید متابولیت توسط ارگانیسم نیز ارزیابی شد که در جداول بالا به آن‌ها اشاره شده است. به طور کلی ارگانیسم‌های جداسازی شده از زمان صفر تا ۴۸ ساعت رو به رشد بوده و پس از آن رشد باکتری رو به کاهش رفته است. نتایج به‌دست آمده از منحنی رشد باکتری‌ها بیانگر آن است که بیشتر ترکیبات ضد قارچی در طول دوران رشد تولید شده است زیرا به‌طور هم‌زمان در همان بازه زمانی تاثیر ترکیبات تولیدی نیز ارزیابی شده است.



شکل ۳- منحنی رشد نمونه Cl9



شکل ۴- منحنی رشد نمونه Cl17



شکل ۵- منحنی رشد نمونه Cs9

بحث و نتیجه گیری

باکتری‌های اندوفیتیک تقریباً در بیشتر گیاهان مطالعه شده یافت شده اند (۲۴). گزارشات زیادی در رابطه با باکتری‌های اندوفیتیک و گیاهانی که در آن‌ها ساکن اند شامل: برنج، موز، گندم، چغندر قند، هویج، سویا، سیب زمینی، لیمو، گوجه فرنگی و غیره داده شده است (۲۵ و ۲۶). گاهی این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند به‌عنوان عوامل بیوکنترل دربرابر پاتوژن‌ها و بهبود باروری و توسعه گیاهان بدون هیچ آسیب محیطی عمل کنند. اندوفیت‌ها می‌توانند متابولیت‌های ثانویه، آنزیم‌های خارج سلولی، هورمون‌های گیاهی مشابه و موادی که اجزای بیوشیمیایی را در تعامل مثبت با گیاهان فعال می‌کند را تولید کنند (۲۷). همچنین، اندوفیت‌ها نقش مهمی در حمایت از میزبان‌شان در برابر پاتوژن‌ها نیز دارا هستند. این میکروارگانیسم‌ها منبع جدیدی از ترکیبات فعال زیستی وشیمیایی با پتانسیلی بالقوه برای بهره‌برداری در پزشکی، کشاورزی و عرصه‌های صنعتی هستند که مطالعاتی روی آن‌ها انجام شده است (۲۸). بر همین اساس در تحقیق حاضر به تنوع باکتری‌های اندوفیتیک و بررسی اثر آنتاگونیستی آن‌ها بر روی پاتوژن‌های قارچی پرداخته شده است.

سویا یک گیاه لگومینوز آسیایی است که در بیشتر کشورها مانند چین، هندوستان، برزیل و امریکا برای تولید روغن و پروتئین آن کشت می‌شود و به‌طور وسیع در تولید مواد غذایی حیوانات و انسان استفاده می‌شود (۲۹). این گیاه به‌طور متوسط دارای ۴۰ درصد پروتئین است که وزن خشک آن دارای ۲۰ درصد روغن و ۸۵ درصد آن بدون کلسترول و غیر اشباع است. تمام طول چرخه رشد سویا به حمله حشرات حساس است (۳۰) و بیشتر مورد حمله عفونت‌های قارچی در طی کاشت یا پس از آن در هنگام حمل و نقل یا ذخیره‌سازی قرار می‌گیرد که به میزان در خور توجهی روی تولید محصول اثر می‌گذارد (۳۱). بنابراین، در پروژه حاضر ضمن جداسازی و شناسایی اولیه باکتری‌های اندوفیتیک گیاه سویا به تولید متابولیت‌های ضد میکروبی اندوفیت‌ها و تأثیر آن بر پاتوژن‌های قارچی منتخب مانند: فوزاریوم و آلترناریا پرداخته شده است.

فوزاریوم و *آلترناریا* از جمله بیش‌ترین پاتوژن‌های قارچی جدا شده از سویا در آرژانتین و سایر مناطق جهان به شمار می‌آیند (۱ و ۴). معمول‌ترین گونه *آلترناریای* جدا شده از دانه‌های سویا، *آلترناریا الترناتا* است. چنان‌که حدود ۸۰ درصد از نمونه‌ها، آلودگی با سویه‌های *آلترناریا* را در حدود ۲ تا ۸۴ درصد نشان دادند (۳۲). زینیل و همکارانش[۶] در پژوهشی توانستند۸۵۳ سویه باکتری اندوفیتیک از اندام‌های هوایی ۴ گونه گیاه زراعی و ۲۷ گونه گیاه علفی جداسازی کنند که ۱۷ ایزوله به گیاه سویا مربوط بوده است. این بررسی تفاوت مهمی را در باکتری‌های جدا شده از گونه‌های مختلف گیاه میزبان نشان داده و نیز حضور مساوی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی را در گیاهان مختلف گزارش کرده است (۳۳).

در تحقیق حاضر، ۳۹ ارگانیسم از ساقه و برگ جداسازی شد که ۲۰ باکتری از ساقه و ۱۹ باکتری از برگ گیاه بود. به‌دنبال آن ارزیابی تولید ترکیبات ضد میکروبی با استفاده ازروش‌های خطی موازی و انتشار در چاهک ارزیابی شد.

حسنین و همکارانش در سال ۲۰۰۹، ۶۰ باکتری اندوفیتیک از ریزوسفر گندم جداسازی نمودند و اثر آن‌ها را بر روی ۱۳ پاتوژن قارچی گیاه با استفاده از ۳ تکنیک مختلف استفاده از فیلترهای کاغذی، روش دیسک آگار و روش انتشار در چاهک نشان دادند. از بین باکتری‌های جداسازی شده ۲۳ باکتری اثر ممانعتی نشان دادند. دو باکتری بیش‌ترین اثر ممانعتی را د نشان دادند که به شکل مولکولی نیز شناسایی شدند و به جنس *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس فیرموس* متعلق هستند.

بیشتر مشاهدات بیانگر آن است که درصد بالایی از باکتری‌های اندوفیتیک به گاماپروتئوباکتریا متعلق بوده است. این باکتری‌ها جزو باکتری‌های هستند که در پزشکی و از نظر اکولوژیکی بسیار با اهمیت اند و گروه‌های مانند خانواده انتروباکتریاسه، سودوموناسه و ویبریوناسه در این گروه قرار دارند (۳۴). باکتری‌های جداسازی شده با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، همگام است و نشان دهنده این است که بیشتر باکتری‌های اندوفیتیک به این گروه تعلق دارند و سودوموناس از جمله بارزترین اندوفیتیکی است که از گیاهان جداسازی شده است (۳۵- ۳۷). علاوه بر مطالب ارائه شده، نوع سوش گیاهی کار شده نیز بسیار با اهمیت است (۲۱). در بررسی حاضر، مطالعات روی گونه *Glycine max* انجام شده است. بیشتر باکتری‌ها به گرم مثبت‌ها متعلق بوده ولی در بیشتر مقالات باکتری‌های

گرم منفی در بافت‌های گیاهان مختلف گزارش شده است (۳۸ و ۳۹).

مقایسه بین تحقیقات گذشته و اکنون بیانگر این است که باکتری‌های اندوفیتیک جداسازی شده از گیاهان و بافت‌های مختلف‌شان از نظر تنوع و پراکندگی متفاوت هستند. همچنین، شرایط آب و هوایی، نوع محیط کشت انتخابی، نوع پاتوژن گیاهی مورد آزمایش و ماده تولید شده توسط باکتری‌های اندوفیتیک می‌تواند با یکدیگر فرق داشته باشد.

براساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر جداسازی شده اند که در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین نیز این امر تأیید شده است (۲۱) در حالی‌که نمونه‌های گرم منفی توانایی بیشتری در تولید ترکیبات ضد میکروبی داشته اند. از طرف دیگر با توجه به منحنی رشد ارگانیسم‌هایی که متابولیت ضد میکروبی تولید کرده‌اند بیشتر این ترکیبات پس از گذشت زمان ۲۴ ساعت تولید شده که گاهی تا ۷۲ ساعت نیز ادامه داشته اند که با رشد باکتری در همان محدوده زمانی مرتبط است. به‌طوری‌که می‌تواند احتمال وجود باکتریوسین را برای باکتری‌های اندوفیتیک مطرح نماید. از طرف دیگر حضور آنزیم‌های پکتینولیتیک توسط برخی از گونه‌های سودموناس می‌تواند علتی بر تاثیر آن برروی قارچ‌ها به حساب آید (۴۰)؛ و یا تولید ترکیباتی حاوی گوگرد توسط باکتری‌های اندوفیتیک می‌تواند علتی بر کاهش اثر آن بر روی قارچ‌های مذکور باشد. از آنجایی که قارچ‌ها باعث مشکلات گیاهی می‌شوند، استفاده از این ترکیبات می‌تواند برای کنترل بیماری‌های گیاهی کاربرد داشته باشد. از طرف دیگر، استفاده از بذرهای مناسب سبب شده که سویای منطقه گرگان به علت وجود اندوفیتیک‌ها با کم‌ترین آسیب مواجه شوند.

References

(1) Roy KW,Baird RE,Abney TS. A review of soybean (Glycine max) seed, pod andflowermycofloras in North America, with methods and a key for identification ofselectedfungi *Mycopathologia* 2001; 150 (1): 15- 27.

(2) Gally T, Gonzalez BA, Pastuso F. Efectoconjunto de Fusarium sp. y Phomopsissp. , patógenostransmitidosporlassemillas en plántulas de soja [Glycine max (L.) Merrill]*Revista Mexicana de Fitopatologia* 2006; 24 (2): 156-8.

(3) Broggi L, González HHL, Resnik S, Pacin A. *Alternariaalternata* prevalence incereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina*RevistaIberoamericanadeMicologí a*2007; 24 (2): 1130-406

(4) Boca RT, Pacin AM, Gonzalez HHL, Resnik SL, Souza JC. *Sojaymicotoxinas: Flora fúngica- Variedades - Prácticasagronómicas.* Editorial: INIAAceitesyGrasas 2003; 53 (1): 510-515.

(5) Ellis MB. *Dematiaceous Hyphomycetes*. 1th ed. UK: Caby Publication. Common wealth Mycological Institute; 1971.

(6) Domsch KH, Gams W, Anderson TH. *Compendium of Soil Fungi*. London; New York: Academic Press; 1980.

(7) Farr DF, Bills GF, Chamuris GP, Rossman AY. *Fungi on Plant and Plant Products.* 1th ed. USA: APS Press ; 1989.

(8) EL-Morsy EM. Microfungi isolated from the ectorhizosphere-rhizoplane zone ofdifferent halophytic plants from the Red Sea Coast of Egypt. *Mycologia*1999; 91 (2) : 228-36.

(9) EL-Morsy EMFungi isolated from the endorhizosphere of halophytic plants from theRed Sea Coast of Egypt. *Fungal Diversity*2000; 5 (1): 43-54.

(10) EL-MorsyEM, Serag MS, ZahranJAT,RashedIG. The occurrence ofmicrofungi in the ectorhizosphere-rhizoplane zone of some selected macrophytes from theNile Delta of Egypt. *Bulletin of the Faculty of Science, Assiut University* 2000; 2 (2-D): 15- 26.

(11) Laemmlen F. *Alternaria diseases*. ANR Publication 8040. California Univ. Okland, CA: Agriculture and natural resources; 2001.

(12) El-Morsy EM,Dohloband SM, Hyde KD. Diversity of *Alternariaalternate*acommon destructive pathogen of Eichhorniacrassipesin Egypt and its potential use inbiological control *Fungal Diversity* 2006; 23 (21): 139-58.

(13) Kohmoto K, Otani H, Tsuge T. *Alternriaalternate* pathogenesis. In:kohmoto K, singh US, singhRP,editor. Pathogenesis and host specificity in plant diseases: histopathological biochemical, genetic and molecular bases, Eukaryotes. vol 2. *Pergamon,* Oxford, United Kingdom; 1995 (2): 51- 63.

(14) Thomma BPHJ. Alternariaspp. from general saprophyte to specific parasite. *Mol. PlantPathol*2003; 4 (4): 225-36.

(15) Hadas S,Jakoby T. The Alternariadisease of cotton. *Phytoparasitica* 1981; 9(11) : 252.

(16) Booth C. *The Genus Fusarium*. Common wealth Mycological Institute. England: KEW, Surrey; 1977: 237

(17) Summerbell RC. *Aspergillus, Fusarium, Sporothrix, Piedraia, and their relatives.* In: Howard DH (ed.). Pathogenic fungi in humans and animals. New York: Marcel Dekker Inc; 2003.

(18) Joseph B, DarandMA,KumarVBioefficacy of Plant Extracts to Control FusariumsolaniF. Sp. MelongenaeIncitant of BrinjalWilt*Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*2008; 3 (2): 56- 59.

(19) Rajput NA,PathanMA,Jiskani MM, Rajput AQ,Arani RR. Pathogenisity and host range of *Fusariumsolani* (MART) sacc. Causing dieback of shisham (Dalbergiasissooroxb). Pak *Bot* 2008;40 (6): 2639-31.

(20)KrcmeryV,KrcmeryJr,JesenskaZ,SpanikS, GyarfasJ, NogovaJ, et al. Fungaemia due to Fusariumspp. in cancer patients*HospInfect* 1997; 36 (3):223-8.

(21) Hung PQ, Annapurna K. Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria in Soybean (Glycine sp.) *Omonrice* 2004; 12 (4): 92-101.

(22) HassaneinWA, AwnyNM, El-MougithAA, Salah El-DienS. H. Characterization and Antagonistic Activities of Metabolite Produced by *Pseudomonasaeruginosa*. *Journal of Applied Sciences Research* 2009; 5 (4): 392-403.

(23) Erden KA, Yurudu SNOThe Evaluation of Antibacterial Activity of Fabrics Impregnated with Dimethyltetradecyl (3-(Trimethoxysilyl) Propyl) Ammonium Chloride. *Journal of Biology Research Article* 2008; 67 (2):115-122.

(24) Ryan RP,Germaine K, Franksand A, RyanDJ. Bacterial endophytes: recent developments and applications*FEMS Microbiol. Lett* 2008; 278 (1) :1-9.

(25) Sturz AV, Christie BR,Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production*Crit. Rev. Plant. Sci* 2000; 19 (24): 1-30.

(26) Rosenblueth M, Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *The American phytopathological society*2006; 19 (8): 827-837.

(27) Cherry AJ. Development of biopesticide registration and risk assessment guidelines for Ghana*Natural Resources Institute.* University of Greenwich. ,*GRZYWACZ* 2005: (2) ;1-5.

(28) Haggag WM. Role of Entophytic Microorganisms in Biocontrol of Plant Diseases*Life science journal* 2010; 7 (2) : 57- 62.

(29) Robbs CF, BittencourtAM. Controlebiológico de insetos. O

controlebiológico de insetosnocivosaagricultura com o emprego de fungosimperfeitosouhifomicetos. *Biotecnologia, CiênciaeDesenvolvimento* 1998; 2 (1): 10-12.

(30) Smith TM, Stratton GW. Effects ofsyntheticpyrethroid insecticides on nontargetorganisms. *Residue Reviews* 1986; 97(41): 93- 120.

(31) BraseS, EncinasA, KeckJ,NisingCFChemistry and biology of mycotoxins and realted fungal metabolites*Chemical Reviews* 2009; 109 (9) : 3903- 90.

(32) Barros GG, Oviedo MS, Ramirez ML, Chulze SN. *Safety Aspects in Soybean Food and Feed Chains: Fungal and Mycotoxins Contamination*. In: Tzi-Bun Ng, editor. Soybean - Biochemistry, Chemistry and Physiology. [S. l.]: Agricultural and Biological Sciences. ; 2011. 1-2.

(33) Zinnel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z,Kuczmarski D, Higley P, et al. Isolation and Characterization of endiphytic colonizing bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and Environmental Microbioligy*2002; 68 (5): 2198- 208.

(34) CheliusMK, TriplettEW. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of Zea mays L. *Microb. Ecol* 2001; 41 (3): 252- 63.

(35) KaisarO, PuhlerA,SelbitschkaWP. hylogenetic analysis of microbial diversity in the rhizoplane of oilseed Rape (Brassica napuscv. Westar) employing cultivation-dependent and cultivation-independent approaches. *Microb. Ecol* 2001; 42 (2) : 136-49.

(36) SunL,Qiu F, Zhangand X, Dai X. Endophytic bacterial diversity in rice (Oryza sativa L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol* 2008; 55(3): 415- 24.

(37) Stoltzfus JR, SoR, MalarvithiPP,LadhaandJK, de BruijnFJIsolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen*plant soil* 1997; 194 (12): 25- 36.

(38) ElbeltagyA,NishiokaK,Suzuki H, Sato T, SatoYI,Morisaki H, et al. Isolation andcharacterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated ricevarieties. *Soil Sci. Plant Nutr* 2000; 46 (7): 617- 9.

(39) Schell MA, Denny TP, Huang J. Extracellular Virulence Factors of Pseudomonas Solanacearum: Role in Disease and their Regulation. In:Kado CL, Crosa JH, editors. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence, Kluwer Academic Press, The Netherlands; 1994 (2): 311-4.

(40) Hallmann J , Quadt-Hallmann A , Mahaffee WF, Kloepper J W. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can. *J. Microbiol.* 1997. 43: 895-914.

---

[1]. *Fusarium solani*
[2]. *Alternaria alternate*
[3]. Sabouraud dextrose broth
[4]. Mueller hinton agar
[5]. https://apiweb. Biomerieux.com
[6]. Zinnel DK et al.

A study on isolated endophytic bacteria from Glycine sp. and their role on control of some plant pathogenic fungi

Yasmin Khatiri *
M.Sc of Microbiology, Science and Research Branch Islamic Azad University, Fars, Iran, yasminkhatiri@yahoo.com
Nima Bahador
Associate professor of Microbiology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran, dr.bahador@fsriau.ac.ir
Hamidreza Pordeli
Associate professor of Microbiology, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Iran, hr.pordeli@gorganiau.ac.ir

Abstract

Introduction: The endophytic bacteria are group of bacteria, which live in plants tissues without any apparent harmful effects to the plants. Recently they have been isolated from different parts of plants with capability to produce anti fungi or bacterial activity. Nowadays, the endophytes instead of the fertilizers and germicidal chemical substances are used in agriculture hence the present study evaluated the presence of these organism in Glycine sp. in order to investigate their possible antifungal metabolites.

Materials and methods: First, in the present study, endophytic bacteria were isolated from the stems and leaves of soybean using serial dilutions on the brain heart infusion agar .Then, the isolates were evaluated for ability to produce anti microbial metabolites against two fungal pathogens: *Alternaria alternate* (PTCC 5224) and *Fusarium solani* (PTCC 5284) based on parallel streak and well diffusion agar methods .The bacterial strains with ability to produce antimicrobial metabolites were identified using Api 20E, 20NE kites and then their growth curves were studied.

Results: Totally, 39 bacterial endophytes were isolated from stem and leaves of the soybean plants among wich 20 belonged to the stems and 19 were isolated from the leaves. Among, all bacterial isolates 3 showed the antimicrobial effect which identified with Api kits and they belonged to the genus of Pseudomonas. Among the bacteria with anti microbial activity *Pseudomonas aeroginosa* was the most effective on the *fusarium solani*. In addition, the results obtained from the growth curves of the bacteria indicated that most of the microorganisms produced their compounds at the first 18 hours which was continued up to 72 hrs in some isolates.

Discussion and conclusion: The present study showed that soybean plant containing endophytic bacteria had the ability to produce antimicrobial effect against plant pathogens and that the produced compounds can be used in further researches.

Key words: Glycine sp., Endophytic bacteria, Pathogenic plant fungi

* Corresponding Author
Received: January 8, 2013/ **Accepted:** May 8, 2013