

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۸۲-۱۷۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت نعنای فلفلی، بابونه، مارچوبه و بررسی تأثیر جدایه‌ها در بازدارندگی فعالیت قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

وحیده فغانی زاده: دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، ایران، arshad_faghani@yahoo.com
محمد حسین ارزانش: استادیار پژوهشی بیولوژی خاک، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران، marzanesh@yahoo.com
سجاد یزدان ستاد*: دانشجوی دکتری تخصصی میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران، sajjad.yazdansetad@gmail.com
رضا نظام زاده: استادیار ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، سمنان، ایران، nezamzadeh@yahoo.com

چکیده

مقدمه: باکتری‌های اندوفیت از میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زای ساکن بافت‌های گیاهی اند که با تولید فاکتورهای رشد باعث افزایش متابولیسم، رشد و مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و تنش‌های محیطی می‌شوند. این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت گیاهان دارویی نعنای فلفلی، بابونه و مارچوبه و بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها علیه چندین پاتوژن گیاهی (آسپریژیلوس نایجر، آلترناریا آلترناتا، فوزاریوم آکسی پوروم و موکورهایمالیس) و نیز بررسی تأثیر جدایه‌های اندوفیت بر عملکرد رشد گیاهان، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: باکتری‌های اندوفیت از بافت ریشه نعنای فلفلی، بابونه و مارچوبه جداسازی شد. فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اندوفیت روی پاتوژن‌های قارچی آسپریژیلوس نایجر، آلترناریا آلترناتا، فوزاریوم آکسی پوروم و موکورهایمالیس با استفاده از روش ایجاد چاهک در محیط مولر هینتون آگار بررسی شد. هر بذریه گیاه به سوسپانسیون جدایه‌های اندوفیت تلقیح و در گلدان‌های حاوی ۳۰۰ گرم خاک کاشته شد. تأثیر جدایه‌های تلقیح شده روی پارامترهای رویشی گیاهان بررسی و با نرم‌افزار آماری SAS 9.2 تحلیل شد.

نتایج: در مجموع ۶ جدایه اندوفیت متعلق به جنس *باسیلوس* از ریشه گیاهان مورد مطالعه جدا شد. بررسی‌های آماری و نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که جدایه‌ها تأثیر معنی‌داری را در فعالیت بازدارندگی پاتوژن‌های قارچی و نیز در رشد گیاهان آزمایش شده داشتند. رشد سه گیاه نعنای فلفلی، بابونه، و مارچوبه نشان داد که نمونه‌های گیاهی تیمار شده با باکتری‌های اندوفیت در مقایسه با نمونه‌های فاقد تیمار باکتری، طول بیشتر داشت.

بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه، باکتری‌های اندوفیت از سه گیاه نعنای فلفلی، بابونه، و مارچوبه جدا شد و تأثیر فعالیت بازدارندگی جدایه‌ها روی پاتوژن‌های قارچی رایج و نیز در بهبود رشد گیاهان تأیید شد. با توجه به پتانسیل بالقوه اندوفیت‌ها، این میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترل در کشاورزی، جهت افزایش مقاومت گیاهان در برابر بیماری‌زاهای قارچی و تنش‌های محیطی و نیز در بهبود رشد و باروری گیاهان می‌توانند استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، بابونه، قارچ‌های بیماری‌زا، مارچوبه، نعنای فلفلی.

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

باکتری‌های اندوفیت از میکروارگانیسم‌های غیربیماری‌زای گیاهان هستند که حداقل بخشی از زندگی خود را در بافت‌های گیاهی به سر می‌برند. از نظر تکاملی به نظر می‌رسد که باکتری‌های اندوفیت حد واسط باکتری‌های ساپروفیت و بیماری‌زای گیاهی باشند و در واقع این باکتری‌ها ساپروفیت‌هایی هستند که بدون ایجاد آسیب در میزبان، توانسته‌اند خود را در پناهگاهی حفظ کنند. فسیل‌ها ارتباط بین گیاهان و اندوفیت‌ها را نشان می‌دهند و این حاکی از نقش مهم اندوفیت‌ها در تکامل گونه‌های گیاهی و حیات در کره زمین است (۱). ریزوسفر، خاستگاه اغلب باکتری‌های اندوفیت است. باکتری‌های ساکن ریزوسفر به طریق شیمیوتاکسی به میزبان نزدیک می‌شوند و ورود این باکتری‌ها به بافت‌های گیاهی از طریق روزه، عدسک، زخم‌های حاصل از شکسته شدن تریکوم‌ها، منطقه خروج ریشه‌های جانبی و منطقه خروج رادیکال‌های ریشه صورت می‌گیرد. اغلب باکتری‌های اندوفیت در فضای بین سلولی ریشه تکثیر می‌یابند و یا ممکن است وارد سلول‌های دایره محیطیه شوند و سپس وارد سلول‌های پارانشیم شوند (۲۱). سپس، سیستم‌های ژنتیکی اختصاصی بین باکتری و گیاه فعال می‌شود (۳). باکتری‌های اندوفیت ضمن استفاده از مواد مغذی که گیاه تولید کرده، با تثبیت نیتروژن، تولید مواد معدنی در دسترس، تولید ۲۳ بوتان دی‌آل، استوئین (۴) و نیز با تولید هورمون‌هایی همچون اتیلن، اکسین، سیتوکینین و جیبرلین باعث افزایش متابولیسم و رشد گیاه و با تولید تربونوئید، فلاونوئید، و ایزوفلاونوئید باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و مقابله گیاه با استرس‌ها و تنش‌های محیطی می‌شوند. علاوه بر این،

باکتری‌های اندوفیت با تولید ترکیبات ضدقارچی، تولید سیدروفور، رقابت برای مواد غذایی، محدود کردن نیچ اکولوژیکی و مقاومت القایی گیاه نقش مهمی را در کنترل بیولوژیکی آفات و ارگانیسم‌های مزاحم و بیماری‌زا ایفا می‌کنند (۳). علاوه بر این، از باکتری‌های اندوفیت در مهندسی ژنتیک جهت انتقال ژن‌های خاص به میزبان استفاده می‌شود (۵). این میکروارگانیسم‌ها پتانسیل بالقوه جهت بهرمندی در صنعت کشاورزی و ارتقای کیفیت محصولات زراعی را دارند (۶).

قارچ‌های جنس *فوزاریوم*، *آسپرژیلوس*، *آلترناریا* و *موکور* از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهان هستند که باعث پژمردگی، فساد و از بین رفتن محصولات زراعی می‌شوند (۷-۹). دلیل انتخاب گیاهان تیره نعنای فلفلی، بابونه و مارچوبه در این مطالعه این است که این‌ها از مهم‌ترین گیاهان دارویی و تولیدکننده مواد ضد میکروبی متعدد هستند. این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت (درون همزیست) گیاهان دارویی نعنای فلفلی، بابونه و مارچوبه و بررسی فعالیت ضد میکروبی جدایه‌ها علیه چندین پاتوژن گیاهی (*آسپرژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا*، *فوزاریوم اکسی پوروم* و *موکور هایمالیس*) و نیز بررسی تأثیر جدایه‌های اندوفیت روی عملکرد رشد گیاهان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: نمونه‌های ریشه گیاهان دارویی نعنای فلفلی، مارچوبه و بابونه به همراه ریزوسفر یا خاک اطراف ریشه آن‌ها از مناطق مختلف استان گلستان (باغ مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان واقع در ۶ کیلومتری شمال گرگان به طول جغرافیایی ۲۵° ۵۴' و عرض

خالص‌سازی کشت‌های باکتری: جهت خالص‌سازی

باکتری‌ها از روش کشت خطی استفاده شد. باکتری‌های خالص شده تحت بررسی‌های مورفولوژیکی، ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفت (۱۱).

شناسایی مقدماتی جدایه‌های باکتری: جدایه‌ها با

استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز، احیای نیتрат، MR-VP، SIM، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، مصرف قندهای مختلف و فعالیت‌های آنزیمی اوره‌آز، آمیلاز، و پروتئاز بررسی شد. ضمن اینکه توانایی رشد جدایه‌ها در غلظت ۷ درصد کلرید سدیم نیز بررسی شد (۱۲).

استخراج DNA باکتری‌ها: استخراج DNA باکتری‌ها

با استفاده از کیت استخراج DNA کیاژن (کیاژن، آلمان) انجام گرفت.

تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها با استفاده از

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر فرورارد و ریورس، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase انجام شد. واکنش PCR با روش استاندارد (۱۳) و با استفاده از پرایمرهای عمومی (F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', R: 5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3') در دستگاه ترمال سایکلر (اپندورف، آلمان) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، طولیل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و در نهایت طولیل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت

جغرافیایی ۵۴° ۳۶'، منطقه توسکستان واقع در ۱۸ کیلومتری جنوب شرقی گرگان به طول جغرافیایی ۳۴° ۵۴' و عرض جغرافیایی ۴۶° ۳۶' و منطقه کتول واقع در ۴۰ کیلومتری شرق گرگان به طول جغرافیایی ۵۲° ۵۴' و عرض جغرافیایی ۵۴° ۳۶' جمع آوری شد. نمونه‌ها در ظروف سترون با ذکر تمامی مشخصات به آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروبیولوژی منتقل شد.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت: برای جداسازی

باکتری‌های اندوفیت از ریشه گیاهان دارویی، ابتدا نمونه‌های خاک ریشه به منظور زدودن گل و لای سطحی با آب شهری شستشو داده شد تا به همراه گل و لای، میکروب‌های سطحی نیز زدوده شود. سپس نمونه‌های ریشه توسط اسکالپل استریل برش داده شد و به قطعات ۲-۳ سانتی‌متری تبدیل شد. قطعات خردشده با احتیاط با آب مقطر استریل در پلیت شستشو داده شد و به وسیله یک پنس استریل به پلیت دیگر منتقل شد و به مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک (مرک، آلمان) ۷۰ درصد و بعد به مدت ۵ دقیقه در هاپیوکلریت سدیم (مرک، آلمان) ۲ درصد غوطه‌ور شد. سپس، نمونه‌ها با استفاده از پنس استریل به پلیت استریل دیگر منتقل شد و ۵ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد تا مواد ضد عفونی کننده به طور کامل از نمونه‌ها زدوده شود. در مرحله بعد، نمونه‌ها به پلیت حاوی کلرید جیوه (مرک، آلمان) ۰/۱ درصد انتقال یافت و به مدت ۲ دقیقه تیمار شد. در نهایت نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. نمونه‌های ریشه در پلیت استریل در کنار شعله توسط میله شیشه‌ای ته گرد کاملاً له شد. با استفاده از سواپ استریل از نمونه‌های له شده و از بافت درونی ریشه برداشته و روی محیط کشت نوترینت آگار و پپتون سویا آگار کشت و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد (۱۰ و ۱۱).

۵ دقیقه انجام گرفت. در نهایت، قطعه تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن، کره جنوبی^۴ فرستاده شد.

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها: قارچ‌های

آسپرژیلوس نایجر (PTCC No.5012)، آلترناریا آلترناتا (PTCC No.5224)، فوزاریوم اکسی پوروم (PTCC No.5115) و موکوره‌هایمالیس (PTCC No.5292) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی (بانک قارچ و مخمر) سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران^۵ تهیه شد. جدایه‌های اندوفیت به محیط نوترینت برات تلقیح و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. از سوسپانسیون باکتری‌ها روی محیط مولر هینتون آگار به صورت یک خط موازی کشت داده شد. قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر، آلترناریا آلترناتا، فوزاریوم اکسی پوروم و موکوره‌هایمالیس نیز در محیط سابوراد دکستروز برات کشت داده و گرماگذاری شد. مقدار مناسبی از کشت تازه قارچی به محیط کشت نوترینت برات استریل تلقیح شد تا آنجایی که چگالی نوری محیط، معادل استاندارد نیم مک فارلند شد. از سوسپانسیون موجود مقدار ۲۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط مولر هینتون آگار به فاصله ۵ میلی‌متر از خط کشت باکتری‌های اندوفیت به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت گرماگذاری شد (۱۴). علاوه بر این، از روش ایجاد چاهک در محیط مولر هینتون آگار استفاده شد. در این روش، سوسپانسیون قارچی با روش کشت متراکم روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس چهار چاهک هم‌اندازه در محیط ایجاد شد. سوسپانسیون باکتری در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از مایع رویی به مقدار ۵۰

میکرولیتر در چاهک‌ها بارگذاری شد و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. بعد از این مدت، قطر بازدارندگی رشد قارچی بررسی شد (۱۵).

اثر تلقیح باکتری‌های اندوفیت روی پارامترهای

رویش گیاهان دارویی: بذرها، گیاهان دارویی نعنای فلفلی، مارچوبه و بابونه از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر^۶ خریداری شد. یک گرم از هر بذر گیاه به ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها با جمعیت احتمالی معادل استاندارد نیم مک فارلند تلقیح و پس از تیمار به مدت ۸ ساعت، بذرها در گلدان‌های حاوی ۳۰۰ گرم خاک کاشته شد.

مرحله کاشت: طرح آزمایشی در این مرحله از

مطالعه، طرح کامل تصادفی با شش سطح باکتری و سه شاهد با سه تکرار بود. برای این منظور، مقدار یک گرم از هر بذر گیاه در عمق ۵/۰ سانتی‌متری خاک نهاده شد و با ۲ میلی‌لیتر آب شهری آبیاری شد. ضمن اینکه در تیمارهای آزمایشی حاوی باکتری، هر گرم بذر به همراه ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بود. نمونه شاهد (کنترل) نیز هر گرم بذر گیاه آبیاری شده با ۲ میلی‌لیتر آب شهری بود.

مرحله داشت و تنک کردن: تمامی گلدان‌ها در

روزهای اولیه با ۲ میلی‌لیتر و در روزهای بعدی با ۵ میلی‌لیتر آب شهری آبیاری شد. پس از جوانه‌زنی گیاهان، هر گیاه در گلدان مجزایی کاشته شد و هر گلدان روزانه با ۳ میلی‌لیتر آب شهری آبیاری شد.

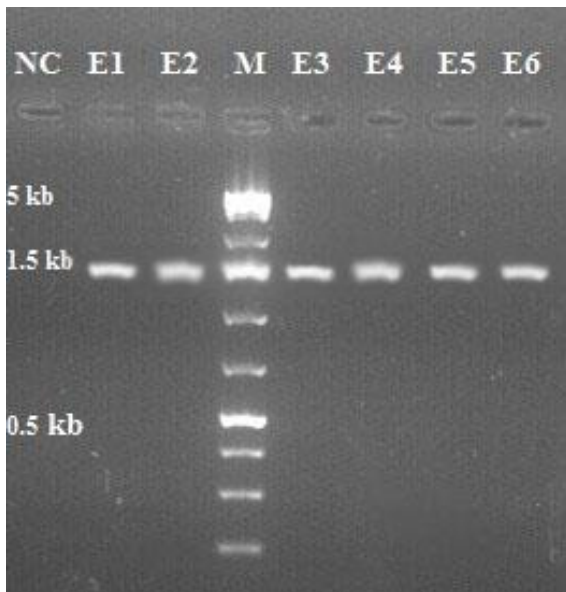
اندازه‌گیری رشد طولی گیاه: بعد از ۱۴ روز از

کاشت، رشد طولی گیاهان در همه تیمارهای مورد آزمایش با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و با نمونه شاهد مقایسه شد.

نتایج

همه جدایه‌های اندوفیت سه گیاه دارویی نعنای فلفلی، مارچوبه و بابونه از نظر واکنش گرم مثبت بودند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول آورده شده است.

تکثیر قطعه 16S rDNA جدایه‌های باکتری با استفاده از واکنش PCR: تکثیر قطعه ژنی 16S rDNA باکتری‌های اندوفیت باند مناسب در اندازه حدوداً ۱۴۹۴ جفت باز را نشان داد (شکل ۱). توالی تعیین شده قطعه ژنی با نرم‌افزار بلاست موجود در وب سایت NCBI بررسی شد و درصد شباهت جدایه‌ها مقایسه شد (جدول ۲).



شکل ۱- تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌های اندوفیت (E1-E6)، NC: کنترل منفی، M: نشانگر 1kb plus (Fermentas)

جدول ۱- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های اندوفیت

Biochemical tests	E1*	E2*	E3*	E4*	E5*	E6*
Citrate utilization	+	+	-	+	-	-
VP (Voges-Proskauer)	+	-	+	+	+	+
Nitrate reduction	+	-	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	-	-
Growth in salt 7%	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Urease	-	+	-	-	-	-
Glucose utilization	+	+	+	+	+	+
Mannitol utilization	-	+	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+
Hemolysis blood Agar	+	-	+	+	+	+
Acid and gas production from glucose	-	-	-	-	-	-
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Growth in 65°C	-	-	-	-	-	-

* E1, E2 باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه مارچوبه، E3, E4 باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه نعنای فلفلی و E5, E6 باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه بابونه هستند.

جدول ۲- شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت

جدایه اندوفیت	NCBI باکتری مرجع	درصد شباهت	شماره دسترسی در بانک ژنی
E4	<i>Bacillus</i> sp. CNJ732 PL04	97%	DQ448749.1
E3	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain z8b-52 16	95%	HQ238661.1
E5	<i>Bacillus</i> sp. CNJ732 PL04	96%	FJ946999.1
E6	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ucsc27	97%	FJ217159.1
E1	<i>Bacillus cereus</i> strain KU4	96%	JF895480.1
E2	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain ucsc27	96%	FN667913.1

که به غیر از اثر متقابل زمان در تیمارهای باکتری، بقیه پارامترها روی رشد طولی گیاه معنی‌دار است. نتایج آماری تجزیه واریانس حاصل از اندازه‌گیری رشد طولی گیاه در جدول ۴ آورده شده است. رشد سه گیاه نعناع فلفلی، بابونه، و مارچوبه نشان داد که نمونه‌های گیاهی تیمار شده با باکتری‌های اندوفیت در مقایسه با نمونه‌های فاقد تیمار باکتری (نمونه‌های شاهد)، طول بیشتر داشت (شکل ۲ تا ۴).

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اندوفیت: همه
جدایه‌های اندوفیت علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی انتخاب شده فعالیت بازدارندگی داشتند. میانگین اثر ضدقارچی جدایه‌های اندوفیت علیه گونه‌های قارچی با استفاده از نرم‌افزار SAS^{9.2} بررسی و نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است.

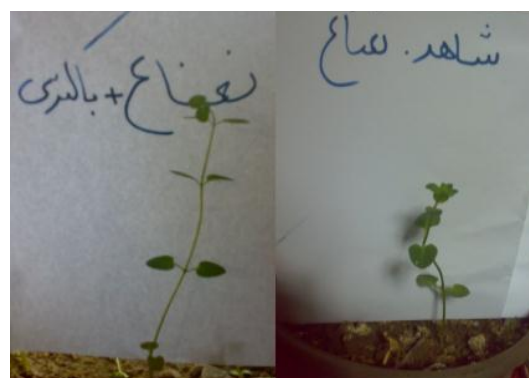
اثر تلقیح باکتری‌های اندوفیت روی پارامترهای رویشی گیاهان دارویی: نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.2 نشان داد

جدول ۳- میانگین فعالیت ضدقارچی جدایه‌های باکتری (E1-E6) علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی (واحد به سانتی‌متر)

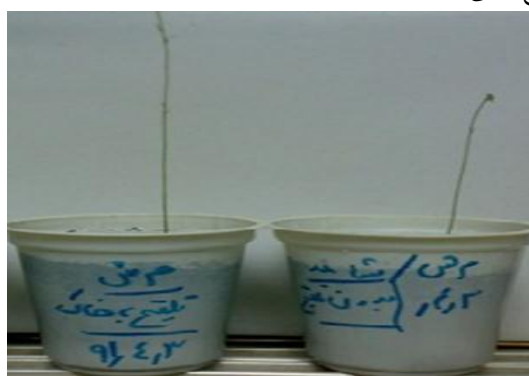
جدایه باکتری	آسپرژیلوس نایجر	فوزاریوم آکسی پوروم	آلترناریا آلترناتا	موکورهایمالیس
E1	۰/۱	۱/۴۶	۰	۰
E2	۰/۶۳	۲/۸	۱/۰۳	۰/۱
E3	۰/۲۶	۱/۳۶	۰	۰
E4	۰/۱	۱/۳۳	۰	۰
E5	۰/۱۶	۱/۴۳	۰/۱	۰
E6	۰/۱۶	۱/۴۵	۰/۱۳	۰



شکل ۳- عدم تلقیح (سمت راست) و تلقیح (سمت چپ) باکتری‌های اندوفیت در گیاه بابونه



شکل ۲- عدم تلقیح (سمت راست) و تلقیح (سمت چپ) باکتری‌های اندوفیت در گیاه نعناع فلفلی



شکل ۴- عدم تلقیح (سمت راست) و تلقیح (سمت چپ) باکتری‌های اندوفیت در گیاه مارچوبه

جدول ۴- تجزیه واریانس حاصل از اندازه‌گیری رشد طولی گیاه

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	فاکتور F
زمان	۶	۹۶۶/۴۵۴	۱۶۱/۰۷۶*	۱۴۷/۵۸
گیاه	۲	۱۷۳۹/۰۴	۸۶۹/۵۱۹*	۷۹۹/۶۶
باکتری	۲	۷۰/۲۷۹۸	۳۵/۱۳۹۹*	۳۲/۲۰
زمان در گیاه	۱۲	۷۸۳/۷۹۹	۶۵/۳۱۶۶*	۵۹/۸۴
زمان در باکتری	۱۲	۲۳/۴۰۶۱	۱/۱۹۰۵۱ ^{ns}	۱/۷۹
باکتری در گیاه	۴	۵۰/۴۴۹۱	۱۲/۶۱۲۳*	۱۱/۵۶
خطای آزمایشی	۱۵۰	۱۶۳/۷۱۸		
مجموع	۱۸۸	۳۷۹۷/۱۴		
* معنی دار در سطح ۰/۰۵ ^{ns} غیر معنی دار				

بحث و نتیجه‌گیری

یکی از چالش‌های عمده در قرن بیست و یکم، کشاورزی سازگار با محیط زیست و تولید محصول سالم است. استفاده از روش‌ها و فناوری‌های نوین زیستی در کشاورزی همچون تیمار میکروبی بذر (خیساندن بذر در سوسپانسیون میکروب‌های مفید یا تزریق سوسپانسیون میکروبی به داخل بذر) خیساندن خاک با سوسپانسیون میکروبی، تزریق به درون ساقه و اسپری سوسپانسیون میکروبی روی سطح اندام‌های گیاه در راستای نیل به هدف مذکور است. از جمله این میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های اندوفیت هستند که در ریشه، برگ و دانه گیاهان زندگی می‌کنند. اندوفیتیک‌بودن میکروارگانیسم‌ها در گیاهان، یک مزیت اکولوژیکی محسوب می‌شود که باعث افزایش رشد و باروری گیاه و بالابردن تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی و پاتوژن‌ها می‌شود (۱۶). عواملی نظیر ژنوتایپ گیاه، مرحله رشد، وضعیت فیزیولوژیکی، نوع بافت گیاهی، شرایط محیطی و شیوه‌های کشاورزی تعیین‌کننده کلونیزاسیون میکروارگانیسم‌های اندوفیت است. علاوه بر این، صفات ذاتی میکروارگانیسم‌ها نیز از عوامل مهم

در کلونیزاسیون و تنوع اندوفیت‌ها است (۱۷). آنچه مسلم است، عواملی از قبیل درجه حرارت، شرایط خاک و اشعه ماورای بنفش به صورت مستقیم روی گیاه میزبان و به صورت غیرمستقیم روی باکتری‌های اندوفیت اثر می‌گذارد. فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی خاک نیز همچون اسیدیته، شوری و بافت خاک نیز جمعیت باکتری‌های اندوفیتیک را با تغییر در جمعیت باکتری‌های ریزوسفری به صورت غیرمستقیم تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۸). میکروارگانیسم‌های اندوفیتیک با تولید متابولیت‌های ثانویه، آنزیم‌های خارج سلولی، هورمون‌های گیاهی مشابه و مواد دیگر باعث فعال‌سازی اجزا و مسیرهای بیوشیمیایی سلول‌های گیاهی می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها منبع جدیدی از ترکیبات فعال زیستی-شیمیایی با پتانسیل بالقوه جهت بهره‌مندی در عرصه‌های پزشکی، کشاورزی و صنعتی هستند (۱۹). با این حال، مطالعات کمی روی آن‌ها انجام شده است. گیاهان تیره نعنای، مارچوبه و بابونه به صورت وحشی در اکثر نقاط دنیا می‌رویند. اهمیت طبی-دارویی این گیاهان بر کسی پوشیده نیست؛ بنابراین، این گیاهان در این مطالعه انتخاب و به منظور بهبود رشد و باروری با

کممک باکتری‌های اندوفیتیک مطالعه شدند.

روی^۹ و بانرجی^{۱۰} باکتری‌های اندوفیتیک *باسیلوس کواگولانس* و سایر گونه‌های *باسیلوس* را از گیاه *Vinca rosea* جداسازی کردند (۲۰). آراویند^{۱۱} و همکاران نیز گزارش کردند که از بین باکتری‌های اندوفیت جداشده از گیاهان مختلف، باکتری‌های اندوفیت متعلق به گونه‌های *باسیلوس* بعد از گونه‌های *آرتروباکتر* و میکروکوکوس جمعیت غالب هستند (۱۰). در مطالعه ماهافی^{۱۲} و کلپر^{۱۳} نیز اغلب جدایه‌های اندوفیت مربوط به گونه‌های *باسیلوس*، *آرتروباکتر* و *سودوموناس* بود (۲۱).

این مطالعات نشان داد که با وجود تنوع در جدایه‌های اندوفیتیک گیاهان مختلف، اغلب جدایه‌ها متعلق به جنس *باسیلوس* هستند که با مطالعه ما نیز مطابقت داشت. گونه‌های مختلف جنس *باسیلوس* به دلیل ویژگی‌هایی همچون حضور گسترده در محیط، هوازی تابی‌هوازی اختیاری، تحمل دمای بالا و فرم مقاوم به صورت اسپور داخلی از باکتری‌های مهم و مطرح در کنترل بیولوژیکی اند (۲۲). از سوی دیگر، یافته‌های اخیر مبنی بر وجود *باسیلوس*‌ها به صورت اندوفیتیک در داخل آوندهای گیاهانی نظیر افرا، نارون، سرو و سایر گونه‌های گیاهی، افق جدیدی را در راستای استفاده از این باکتری‌ها به عنوان عوامل بیوکنترل بیماری‌های آوندی گشوده است (۱۶).

حسین^{۱۴} و همکاران باکتری‌های اندوفیتیک *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس فیرموس* را از ریزوسفر گندم جداسازی و تأثیر بازدارندگی این جدایه‌ها را روی پاتوژن قارچی *آسپریژیلوس*^{۱۵}، *فوزاریوم*^{۱۶}، *آلترناریا*^{۱۷}، *کلادوسپوریوم*^{۱۸}، *هلمیندوسپوریوم*^{۱۹} و *ریزوکتونیا*^{۲۰} بررسی کردند. این دو

جدایه و به‌ویژه *باسیلوس فیرموس* اثر قابل توجهی را در مهار رشد پاتوژن‌های قارچی داشت (۱۵).

دالال^{۲۱} و همکاران اثر آنتاگونیستی گونه‌های مختلف *باسیلوس* (*Bacillus* sp.) را روی *آسپریژیلوس نایجر*، *فوزاریوم اکسی پوروم*، *کاندیدا آلیکنس* و *موکور بررسی* و مشاهده کردند که بین قارچ‌های مختلف از لحاظ مهار رشد تفاوت معنی‌داری وجود دارد به طوری که بیشترین بازدارندگی روی *آسپریژیلوس نایجر* مشاهده شد (۲۳). این مطالعه به لحاظ جدایه‌های اندوفیتیک و آزمون بازدارندگی این جدایه‌ها روی پاتوژن‌های مهم قارچی (*آسپریژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا*، *فوزاریوم اکسی پوروم* و *موکور هیمالیس*) با مطالعه ما مطابق بود. به طوری که اثر بازدارندگی به ترتیب روی *فوزاریوم اکسی پوروم*، *آسپریژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا* و *موکور* مشاهده شد.

در مطالعه حاضر، تیمار گونه‌های گیاهی نعنای فلفلی، مارچوبه و بابونه با جدایه‌های اندوفیت، نشان‌دهنده افزایش رشد طولی این گیاهان در مقایسه با نمونه‌های فاقد تیمار (شاهد) بود. نتایج آماری نشان داد که با افزایش زمان تیمار، ارتفاع گیاه افزایش یافت و بیشترین ارتفاع گیاه در روزهای پایانی آزمایش مشاهده شد. با افزایش زمان تیمار، غلظت فاکتورهای مؤثر در رشد گیاه توسط اندوفیت‌ها افزایش پیدا می‌کند. این امر علت احتمالی رشد فزاینده گیاه با افزایش زمان تیمار است که با مطالعه رودریگز^{۲۲} و همکاران و استورز^{۲۳} و همکاران نیز مطابقت داشت. مطالعه رودریگز و همکاران در بررسی هم‌زیستی اندوفیت‌ها با گیاهان نشان داد که از این ارتباط هم‌زیستی متابولیت‌های ثانویه تولید می‌شود و با افزایش زمان تیمار و تعامل اندوفیت و گیاه به حداکثر مقدار خود می‌رسد (۲۴). استورز و همکاران

تأثیر داشتند.

در راستای این پژوهش، جداسازی بیشتر میکروارگانیسم‌های اندوفیت از گیاهان مختلف و مطالعه مولکولی و عملکردی آن‌ها جهت به‌کارگیری این میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترل در برابر پاتوژن‌های گیاهی و بهبود رشد و باروری گیاهان و نیز افزایش مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های مختلف محیطی توصیه و پیشنهاد می‌شود.

References

- Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Klopper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 1997; 43(10): 895-914.
 - Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Rodriguez-Kbana R, Klopper JW. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998; 30(1): 925-37.
 - Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*. 2008; 16(10): 463-71.
 - Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2000; 19(1): 1-30.
 - Tomasino SF, Leister RT, Dimock MB, Beach RM, Kelly JL. Field performance of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* expressing the insecticidal protein gene *cryIA (c)* of *Bacillus thuringiensis* against European corn borer in field corn. *Biological Control*. 1995; 5 (3): 442- 48.
- نیز تأثیر اندوفیت‌های باکتریایی کورتوباکتریوم سیتروم^{۲۴} و ریزوبیوم لگومینوساروم^{۲۵} را در افزایش رشد طولی شبدر و سیب‌زمینی بررسی کردند. این جدایه‌ها به میزان ۶۳ درصد باعث افزایش ارتفاع اندام‌های هوایی گیاه و به‌میزان ۶۶ درصد باعث افزایش وزن اندام‌های هوایی و به‌میزان ۵۵ درصد باعث افزایش وزن ریشه شدند (۴). عوامل متعددی در افزایش رشد و مقاومت گیاهان توسط باکتری‌های اندوفیت وجود دارد. این عوامل شامل افزایش مواد معدنی و بهبود روابط آبی در گیاه با کلونیزه‌شدن اندوفیت‌ها در ریشه گیاه، تولید هورمون‌های رشد مانند اتیلن، اکسین، سیتوکینین و جیبرلین توسط اندوفیت‌ها، تنظیم عملکردهای آنزیمی مهم در مسیرهای بیوشیمیایی دخیل در تنش‌ها و استرس‌های محیطی است (۱۷). لی^{۲۶} و همکاران تولید ایندول استیک اسید (۲۵) و خان و دوتی^{۲۷} تثبیت نیتروژن ملکولی توسط باکتری‌های اندوفیت در ریشه را در افزایش رشد و باروری گیاهان ذکر کردند (۲۶). در مطالعه ما تأثیر هر کدام از مکانیسم‌های اشاره‌شده در بالا نیز می‌تواند علت احتمالی افزایش رشد و ارتفاع گیاه باشد.
- در جمع‌بندی نتایج حاصل از این پژوهش و با مقایسه فعالیت ضدقارچی و اثر تلقیح اندوفیت‌ها روی رشد گیاهان انتخاب‌شده می‌توان گفت که از بین اندوفیت‌های جداشده از گیاه مارچوبه، جدایه E2 تأثیر معنی‌داری در رشد گیاه و جدایه E1 تأثیر معنی‌داری در فعالیت ضدقارچی داشت. از بین اندوفیت‌های جداشده از گیاه نعنای فلفلی جدایه E4 تأثیر معنی‌داری را هم در فعالیت ضدقارچی و هم در رشد گیاه و جدایه E3 تأثیر معنی‌داری را تنها در فعالیت ضدقارچی داشت. از بین اندوفیت‌های جداشده از گیاه بابونه جدایه‌های E5 و E6 به یک میزان در فعالیت ضدقارچی و رشد گیاه بابونه

- (6) Rosenblueth M, & Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2006; 19(8): 827-37.
- (7) Joseph B, Ahmad Dar M, Kumar V. Bioefficacy of Plant Extracts to Control *Fusarium solani* F. Sp. Melongenae Incitant of Brinjal Wilt. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry Research* (GJBBR). 2008; 3(2): 56-9.
- (8) Ramamoorthy V, Raguchander T, Samiyappan R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Plant and Soil*. 2002; 239(1): 55-68.
- (9) Narisawa K, Kawamata H, Currah RS, Hashiba T. Suppression of Verticillium wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology*. 2002; 108(1):103-9.
- (10) Aravind R, Antony D, Eapen SJ, Kumar A, Ramana KV. Isolation and evaluation of endophytic bacteria against plant parasitic nematodes infesting black pepper (*Piper nigrum* L.). *Indian Journal of Nematology*. 2009; 39(2): 211-17.
- (11) Hung PQ and Annapurna K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in soybean (*Glycine* sp.). *OmonRice*. 2004; 12(4): 92-101.
- (12) John GH, Noel RK, Peter HS, James TS, Stanley TW. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (In Russian). 9th Ed. Moscow: Mir Publishers 2; 1997.
- (13) Sambrook J, Russell D. Irwa N et al. Eds. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- (14) Kimiran Erden A, Sanli Yurudu NO. The evaluation of antibacterial activity of fabrics impregnated with dimethyltetradecyl (3-(Trimethoxysilyl) Propyl) ammonium chloride. *IUFS Journal of Biologiy*. 2008; 67 (2): 115-22.
- (15) Hassanein WA, Awany NM, El-Moughith AA, Salah El-Dien S. H. Characterization and antagonistic activities of metabolite produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Sciences Research*. 2009; 5(4): 392-403.
- (16) Haggag WM. Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases. *Life Science Journal*. 2010; 7(2): 57-62.
- (17) Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F, Sessitsch A. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014; 27(1): 30-7.
- (18) Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*. 2008; 278(1): 1-9.
- (19) Berg G, Hallmann J. *Control of plant pathogenic fungi with bacterial endophytes*. In: Schulz BJE, Boule CJC, Sieber TN editors. *Microbial Root Endophytes*. Berlin: Springer-Verlag; 2006. p. 53-69.
- (20) Roy S, Banerjee D. Isolation of antimicrobial compound by endophytic bacteria from *Vinca rosea*. *International Journal of Current Research*. 2010; 5(1): 47-51.
- (21) Mahafee WF, Kloepper JW. Bacterial communities of the rhizosphere and endorhiza associated with field-grown cucumber plants inoculated with a plant growth promoting rhizobacterium or its genetically modified derivative. *Canadian Journal of Microbiology*. 1997; 43(4): 344-53.
- (22) Peterson CA, Emanuel ME, Humphreys GB. Pathway of movement of apoplastic fluorescent dye tracers through the endodermis at the site of secondary root formation in corn (*Zea mays*) and broad bean (*Vicia faba*). *Canadian Journal of Botany*. 1981; 59(5): 618-25.
- (23) Dalal J, Kulkarni N. Antagonistic and plant growth promoting potentials of

- indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merrill). *Current Research in Microbiology and Biotechnology*. 2013; 1(2): 62-9.
- (24) Rodriguez RJ, White JR, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 2009; 182(2): 314-30.
- (25) Lee S, Flores-Encarnacion M, Contreras-Zentella M, Garcia Flores L, Escamilla JE, Kennedy C. Indole-3-acetic acid biosynthesis is deficient in *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains with mutations in cytochrome C biogenesis genes. *Journal of Bacteriology*. 2004; 186(16): 5384-91.
- (26) Khan Z, Doty SL. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant and Soil*. 2009; 332(1-2): 197-207.

¹- Merck, Germany

²- QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Germany

³- Mastercycler® nexus; Eppendorf, Germany

⁴- MacroGen, Korea-<http://www.macrogen.com>

⁵- <http://portal.irost.org/persian/PTCC>

⁶- <http://www.spii.ir>

⁷- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁸- Statistical Analysis System

⁹- Roy

¹⁰- Banerjee

¹¹- Aravind

¹²- Mahafee

¹³- Kloepper

¹⁴- Hassanein

¹⁵- *Aspergillus*

¹⁶- *Fusarium*

¹⁷- *Alternaria*

¹⁸- *Cladosporium*

¹⁹- *Helminthosporium*

²⁰- *Rhizoctonia*

²¹- Dalal

²²- Rodriguez

²³- Sturz

²⁴- *Curtobacterium citreum*

²⁵- *Rhizobium leguminosarum*

²⁶- Lee

²⁷- Khan & Doty

Isolation and molecular characterization of endophytic bacteria from peppermint, chamomile, asparagus and antagonistic effect of isolates on fungal plant pathogens

Vahideh Faghanizadeh

Ph.D. Student of Microbiology, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran, arshad_faghani@yahoo.com

Mohamad Hosein Arzanesh

Assistant Professor of Soil Biology, Agriculture and Natural Resources Research Center, Gorgan, Iran, marzanesh@yahoo.com

Sajjad Yazdansetad*

Ph.D. Candidate of Microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran, sajjad.yazdansetad@gmail.com

Reza Nezamzadeh

Assistant Professor of Genetics, Islamic Azad University, Damghan Branch, Semnan, Iran, nezamzadeh@yahoo.com

Abstract

Introduction: The endophytic bacteria are non-pathogenic organisms residing plant tissues which produced growth factors to increase metabolism, growth and resistance of plants to the pathogens and environmental tensions. The present study was aimed (i) to isolate and molecular characterization of endophytic bacteria from peppermint, chamomile, and asparagus (ii) to investigate antagonistic effect of isolates on fungal pathogens including *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Mucor hiemalis* (iii) to survey of isolates effect on plant growth characters.

Materials and methods: The endophytic bacteria were isolated from root tissue of peppermint, chamomile, and asparagus. The antagonistic effect of endophytic isolates were investigated on fungal pathogens including *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Mucor hiemalis* using agar well diffusion assay testing on Mueller-Hinton agar. The seeds of plants inoculated to the bacterial suspension and then were cultured in vases containing 300 g soil. The isolates effect was studied on plant growth parameters and analyzed by statistical software SAS 9.2.

Results: A total of 6 endophytic bacteria (E1-E6) belonging Bacillus sp. were isolated from the plant root. The statistical and variance analysis indicated significance effect of isolates on fungal pathogens inhibition and plant growth improvement. The growth of peppermint, chamomile, and asparagus were showed high length of the plants which had been treated with the endophytic bacteria rather than the non-treatment of plants.

Discussion and conclusion: In this study, the endophytic bacteria were isolated from peppermint, chamomile, and asparagus, then verified antagonistic effect of isolates on current fungal pathogens, also on plant growth improvement. Regarding the potential of endophytic bacteria, the organisms can be used as biocontrols in agriculture, increasing resistance of plants against fungal pathogens, environmental stresses and improving growth of plants.

Key words: Endophytic bacteria, Peppermint, Chamomile, Asparagus, Fungal pathogens

* Corresponding author

Received: December 17, 2014 / **Accepted:** December 30, 2015