Archive of SID

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 نعناع 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 گیاهی‌اند که با تولید فاکتورهای رشد باعث افزایش متابولیسم، رشد و مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و تنش‌های محیطی می‌شوند. این مطالعه به‌منظور جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت گیاهان دارویی نعناع فلفلی، بابونه و مارچوبه و بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌ها علیه چندین پاتوژن گیاهی (*آسپرژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا*، *فوزاریوم اکسی پوروم* و *موکور هایمالیس*) و نیز بررسی تأثیر جدایه‌های اندوفیت بر عملکرد رشد گیاهان، انجام گرفت.
مواد و روش‌ها: باکتری‌های اندوفیت از بافت ریشهٔ نعناع فلفلی، بابونه و مارچوبه جداسازی شد. فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اندوفیت روی پاتوژن‌های قارچی *آسپرژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا*، *فوزاریوم اکسی پوروم* و *موکور هایمالیس* با استفاده از روش ایجاد چاهک در محیط مولر هینتون آگار بررسی شد. هر بذر گیاه به سوسپانسیون جدایه‌های اندوفیت تلقیح و در گلدان‌های حاوی ۳۰۰ گرم خاک کاشته شد. تأثیر جدایه‌های تلقیح‌شده روی پارامترهای رویشی گیاهان بررسی و با نرم‌افزار آماری SAS 9.2 تحلیل شد.
نتایج: در مجموع ۶ جدایهٔ اندوفیت متعلق به جنس *باسیلوس* از ریشهٔ گیاهان موردمطالعه جدا شد. بررسی‌های آماری و نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس داده‌ها نشان داد که جدایه‌ها تأثیر معنی‌داری را در فعالیت بازدارندگی پاتوژن‌های قارچی و نیز در رشد گیاهان آزمایش‌شده داشتند. رشد سه گیاه نعناع فلفلی، بابونه، و مارچوبه نشان داد که نمونه‌های گیاهی تیمارشده با باکتری‌های اندوفیت در مقایسه با نمونه‌های فاقد تیمار باکتری، طول بیشتر داشت.
بحث و نتیجه‌گیری: در این مطالعه، باکتری‌های اندوفیت از سه گیاه نعناع 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 بالقوهٔ 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، نعناع فلفلی.

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

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 درواقع 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 کرهٔ زمین است (۱). ریزوسفر، خاستگاه اغلب باکتری‌های اندوفیت است. باکتری‌های ساکن ریزوسفر به‌طریق شیمیوتاکسی به میزبان نزدیک می‌شوند و ورود این باکتری‌ها به بافت‌های گیاهی از طریق روزنه، عدسک، زخم‌های حاصل از شکسته‌شدن تریکوم‌ها، منطقهٔ خروج ریشه‌های جانبی و منطقهٔ خروج رادیکال‌های ریشه صورت می‌گیرد. اغلب باکتری‌های اندوفیت در فضای بین سلولی ریشه تکثیر می‌یابند و یا ممکن است وارد سلول‌های دایرهٔ محیطیه شوند و سپس وارد سلول‌های پارانشیم شوند (۱و۲). 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 ۳و۲ بوتان دی اُل، استوئین (۴) و نیز با تولید هورمون‌هایی همچون اتیلن، اکسین، سیتوکینین و جیبرلین باعث افزایش متابولیسم و رشد گیاه و با تولید ترپونوئید، فلاوونوئید، و ایزوفلاوونوئید باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و مقابلهٔ گیاه با استرس‌ها و تنش‌های محیطی می‌شوند. علاوه بر این، باکتری‌های اندوفیت با تولید ترکیبات ضدقارچی، تولید سیدروفور، رقابت برای مواد غذایی، محدودکردن 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 ازبین‌رفتن محصولات زراعی می‌شوند (۷- ۹). دلیل انتخاب گیاهان تیرهٔ نعناع فلفلی، بابونه و مارچوبه در این مطالعه این است که این‌ها از مهم‌ترین گیاهان دارویی و تولیدکنندهٔ مواد ضدمیکروبی متعدد هستند. این مطالعه به‌منظور جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت (درون همزیست) گیاهان دارویی نعناع فلفلی، بابونه و مارچوبه و بررسی فعالیت ضدمیکروبی 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 ریشهٔ گیاهان دارویی نعناع فلفلی، مارچوبه و بابونه به همراه ریزوسفر یا خاک اطراف ریشهٔ آن‌ها از مناطق مختلف استان گلستان (باغ مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان واقع در ۶ کیلومتری شمال گرگان به طول جغرافیایی '۲۵ °۵۴ و عرض

www.SID.ir

Archive of SID

جغرافیایی '۵۴ °۳۶، منطقهٔ 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) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در ظروف سترون با ذکر تمامی مشخصات به آزمایشگاه مرکز تحقیقات میکروبیولوژی منتقل شد.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت: برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ریشهٔ گیاهان دارویی، ابتدا نمونه‌های خاک ریشه به‌منظور 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 ۳-۲ سانتی‌متری تبدیل شد. قطعات خردشده با احتیاط با آب مقطر استریل در پلیت شستشو داده شد و به‌وسیلهٔ یک پنس استریل به پلیت دیگر منتقل شد و به‌مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک (مرک، آلمان[۱]) ۷۰درصد و بعد به‌مدت ۵ دقیقه در هایپوکلریت سدیم (مرک، آلمان) ۲درصد 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 ضدعفونی‌کننده به‌طور کامل از نمونه‌ها زدوده شود. در مرحلهٔ بعد، نمونه‌ها به پلیت حاوی کلرید جیوه (مرک، آلمان) ۰/۱ درصد انتقال یافت و به‌مدت ۲ دقیقه تیمار شد. درنهایت نمونه‌ها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شد. نمونه‌های ریشه در پلیت استریل در کنار شعله توسط میلهٔ شیشه‌ای ته گرد کاملاً له شد. با استفاده از سواپ استریل از نمونه‌های له‌شده و از بافت درونی ریشه برداشته و روی محیط کشت نوترینت آگار و پپتون سویا آگار کشت و در دمای ۳۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد (۱۰و۱۱).

خالص‌سازی کشت‌های باکتری: جهت خالص‌سازی باکتری‌ها از روش کشت خطی استفاده شد. باکتری‌های خالص‌شده تحت بررسی‌های مورفولوژیکی، ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار گرفت (۱۱).

شناسایی مقدماتی جدایه‌های باکتری: جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، 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[۲]) انجام گرفت.

تکثیر قطعهٔ 16S rDNA باکتری‌ها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۰/۴ میکرومولار از هر پرایمر فوروارد 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[۳]) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت‌شدن اولیه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌شدن در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، طویل‌شدن در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه و درنهایت طویل‌شدن نهایی در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت

www.SID.ir

Archive of SID

۵ دقیقه انجام گرفت. درنهایت، قطعهٔ تکثیرشده 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 *موکور هایمالیس* (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 براث تلقیح و در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. از سوسپانسیون باکتری‌ها روی محیط مولر هینتون آگار به‌صورت یک خط موازی کشت داده شد. قارچ‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا*، *فوزاریوم اکسی پوروم* و *موکور هایمالیس* نیز در محیط سابوراد دکستروز براث کشت داده و گرماگذاری شد. مقدار مناسبی از کشت تازهٔ قارچی به محیط کشت نوترینت براث استریل تلقیح شد تاآنجایی‌که چگالی نوری محیط، معادل استاندارد نیم مک فارلند شد. از سوسپانسیون موجود مقدار ۲۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط مولر هینتون آگار به فاصلهٔ ۵ میلی‌متر از خط کشت باکتری‌های اندوفیت به صورت نقطه‌ای کشت داده شد و در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸-۲۴ 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و از مایع رویی به‌مقدار ۵۰ میکرولیتر در چاهک‌ها بارگذاری شد و در ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شد. بعد از این مدت، قطر بازدارندگی رشد قارچی بررسی شد (۱۵).

اثر تلقیح باکتری‌های اندوفیت روی پارامترهای رویشی گیاهان دارویی: بذرهای گیاهان دارویی نعناع 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 به‌مدت ۸ ساعت، بذرها در گلدان‌های حاوی ۳۰۰ گرم خاک کاشته شد.

مرحلهٔ 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 ۰/۵ 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. نمونهٔ شاهد (کنترل) نیز هر گرم بذر گیاه آبیاری‌شده با ۲ میلی‌لیتر آب شهری بود.

مرحلهٔ داشت و تنک‌کردن: 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 همهٔ تیمارهای موردآزمایش با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و با نمونهٔ شاهد مقایسه شد.

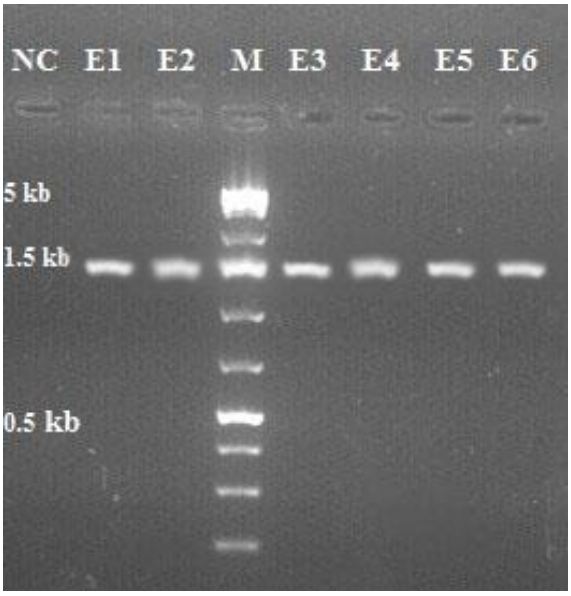
www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

همهٔ جدایه‌های اندوفیت سه گیاه دارویی نعناع فلفلی، مارچوبه و بابونه از نظر واکنش گرم‌مثبت بودند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌ها در جدول ۱آورده شده است.

تکثیر قطعهٔ *16S rDNA* جدایه‌های باکتری با استفاده از واکنش PCR: تکثیر قطعهٔ ژنی *16S rDNA* باکتری‌های اندوفیت باند مناسب در اندازهٔ حدوداً ۱۴۹۴ جفت باز را نشان داد (شکل ۱). توالی تعیین‌شدهٔ قطعهٔ ژنی با نرم‌افزار بلاست موجود در وب سایت NCBI[۷] بررسی شد و درصد شباهت جدایه‌ها مقایسه شد (جدول ۲).



شکل ۱- تکثیر قطعهٔ *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_2S production	-	-	-	-	-	-
Catalase test	+	+	+	+	+	+
Hemolysis blood Agar	+	-	+	+	+	+
Acid and gas production from glucose	-	-	-	-	-	-
Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
Growth in 65°C	-	-	-	-	-	-

* E1, E2 باکتری‌های اندوفیت جداشده از گیاه مارچوبه، E3, E4 باکتری‌های اندوفیت جداشده از گیاه نعناع وE5, E6 باکتری‌های اندوفیت جداشده از گیاه بابونه هستند.

جدول ۲- شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت

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

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اندوفیت: همهٔ جدایه‌های اندوفیت علیه قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی انتخاب‌شده فعالیت بازدارندگی داشتند. میانگین اثر ضدقارچی جدایه‌های اندوفیت علیه گونه‌های قارچی با استفاده از نرم‌افزار SAS[۸] 9.2 بررسی و نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است.

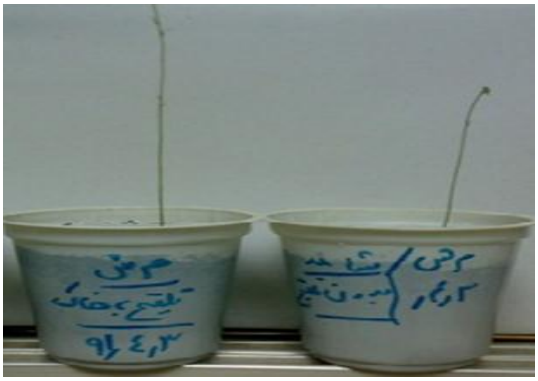
اثر تلقیح باکتری‌های اندوفیت روی پارامترهای رویشی گیاهان دارویی: نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.2 نشان داد که به غیر از اثر متقابل زمان در تیمارهای باکتری، بقیهٔ پارامترها روی رشد طولی گیاه معنی‌دار است. نتایج آماری تجزیهٔ واریانس حاصل از اندازه‌گیری رشد طولی 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).

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

جدایهٔ باکتری	*آسپرژیلوس نایجر*	*فوزاریوم اکسی پوروم*	*آلترناریا آلترناتا*	*موکور هایمالیس*
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 ۲- عدم تلقیح (سمت راست) و تلقیح (سمت چپ) باکتری‌های اندوفیت در گیاه نعناع فلفلی

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



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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴- تجزیهٔ واریانس حاصل از اندازه‌گیری رشد طولی گیاه

منبع تغییرات	درجهٔ 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	۱/۱۹۰۵۱ns	۱/۷۹
باکتری در گیاه	۴	۵۰/۴۴۹۱	۱۲/۶۱۲۳*	۱۱/۵۶
خطای آزمایشی	۱۵۰	۱۶۳/۷۱۸		
مجموع	۱۸۸	۳۷۹۷/۱۴		

* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ ns غیر معنی‌دار

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 جملهٔ این میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های اندوفیت هستند که در ریشه، برگ و دانهٔ 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، مرحلهٔ رشد، وضعیت فیزیولوژیکی، نوع بافت گیاهی، شرایط محیطی و شیوه‌های کشاورزی تعیین‌کنندهٔ کلونیزاسیون میکروارگانیسم‌های اندوفیت است. علاوه براین، صفات ذاتی میکروارگانیسم‌ها نیز از عوامل مهم در کلونیزاسیون و تنوع اندوفیت‌ها است (۱۷). آنچه مسلم است، عواملی از قبیل درجهٔ حرارت، شرایط خاک و اشعهٔ ماورای بنفش به‌صورت مستقیم روی گیاه میزبان و به‌صورت 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 به‌صورت 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 نعناع، مارچوبه و بابونه به‌صورت وحشی در اکثر نقاط دنیا می‌رویند. اهمیت طبی-دارویی این گیاهان بر کسی پوشیده نیست؛ بنابراین، این گیاهان در این مطالعه انتخاب و به‌منظور بهبود رشد و باروری با

www.SID.ir

Archive of SID

کمک 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 مطالعهٔ ماهافی[۱۲] و کلوپر[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 مطالعهٔ ما نیز مطابقت داشت. گونه‌های مختلف جنس *باسیلوس* به‌دلیل ویژگی‌هایی همچون حضور گسترده در محیط، هوازی تا بی‌هوازی اختیاری، تحمل دمای بالا و فرم مقاوم به‌صورت اسپور داخلی از باکتری‌های مهم و مطرح در کنترل بیولوژیکی‌اند (۲۲). از سوی دیگر، یافته‌های اخیر مبنی بر وجود *باسیلوس‌ها* به‌صورت اندوفیتیک در داخل آوندهای گیاهانی نظیر افرا، نارون، سرو و سایر گونه‌های گیاهی، افق جدیدی را در راستای استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترل بیماری‌های آوندی گشوده است (۱۶).

حسنین[۱۴] و همکاران باکتری‌های اندوفیتیک *سودوموناس آئروژینوزا* و *باسیلوس فیرموس* را از ریزوسفر گندم جداسازی و تأثیر بازدارندگی این جدایه‌ها را روی پاتوژن قارچی *آسپرژیلوس*[۱۵]، *فوزاریوم*[۱۶]، *آلترناریا*[۱۷]، *کلادوسپوریوم*[۱۸]، *هلمینتوسپوریوم*[۱۹] و *ریزوکتونیا*[۲۰] بررسی کردند. این دو جدایه و به‌ویژه *باسیلوس فیرموس* اثر قابل‌توجهی را در مهار رشد پاتوژن‌های قارچی داشت (۱۵).

دالال[۲۱] و همکاران اثر آنتاگونیستی گونه‌های مختلف *باسیلوس* (*Bacillus* sp.) را روی *آسپرژیلوس نایجر*، *فوزاریوم اکسی پاروم*، *کاندیدا آلبیکنس* و *موکور* بررسی و مشاهده کردند که بین قارچ‌های مختلف ازلحاظ مهار رشد تفاوت معنی‌داری وجود دارد به‌طوری‌که بیشترین بازدارندگی روی *آسپرژیلوس نایجر* مشاهده شد (۲۳). این مطالعه به‌لحاظ جدایه‌های اندوفیتیک و آزمون بازدارندگی این جدایه‌ها روی پاتوژن‌های مهم قارچی (*آسپرژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا*، *فوزاریوم اکسی پوروم* و *موکور هایمالیس*) با مطالعهٔ ما مطابق بود. به‌طوری‌که اثر بازدارندگی به‌ترتیب روی *فوزاریوم اکسی پوروم*، *آسپرژیلوس نایجر*، *آلترناریا آلترناتا* و *موکور* مشاهده شد.

در مطالعهٔ حاضر، تیمار گونه‌های گیاهی نعناع فلفلی، مارچوبه و بابونه با جدایه‌های اندوفیت، نشان‌دهندهٔ 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 فزایندهٔ گیاه با افزایش زمان تیمار است که با مطالعهٔ رودریگز[۲۲] و همکاران و استورز[۲۳] و همکاران نیز مطابقت داشت. مطالعهٔ 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 ۶۳درصد باعث افزایش ارتفاع اندام‌های هوایی گیاه و به‌میزان ۶۶درصد باعث افزایش وزن اندام‌های هوایی و به‌میزان ۵۵درصد 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 ریشهٔ 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 مطالعهٔ ما تأثیر هرکدام از مکانیسم‌های اشاره‌شده در بالا نیز می‌تواند علت احتمالی افزایش رشد و ارتفاع گیاه باشد.

در جمع‌بندی نتایج حاصل از این پژوهش و با مقایسهٔ فعالیت ضدقارچی و اثر تلقیح اندوفیت‌ها روی رشد گیاهان انتخاب‌شده می‌توان گفت که از بین اندوفیت‌های جداشده از گیاه مارچوبه، جدایهٔ E2 تأثیر معنی‌داری در رشد گیاه و جدایهٔ E1 تأثیر معنی‌داری در فعالیت ضدقارچی داشت. از بین اندوفیت‌های جداشده از گیاه نعناع فلفلی جدایهٔ E4 تأثیر معنی‌داری را هم در فعالیت ضدقارچی و هم در رشد گیاه و جدایهٔ 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 تأثیر داشتند.

در راستای این پژوهش، جداسازی بیشتر میکروارگانیسم‌های اندوفیت از گیاهان مختلف و مطالعهٔ 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

(1) Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*. 1997; 43(10): 895-914.

(2) Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Rodriguez-Kbana R, Kloepper JW. Interactions between Meloidogyne incognita and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998; 30(1): 925-37.

(3) 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.

(4) 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.

(5) 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.

www.SID.ir

Archive of SID

(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, Awny NM, El-Mougith 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 deriative. *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). *Cannadian Journal of Botany*. 1981; 59(5): 618-25.

(23) Dalal J, Kulkarni N. Antagonistic and plant growth promoting potentials of

www.SID.ir

Archive of SID

indigenous endophytic bacteria of soybean (*Glycine max* (L) Merril). *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

www.SID.ir

Archive of SID

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

www.SID.ir