Archive of SID

مقاله تحقیقی

بررسی نقش باکتری‌های اندوفیت گندم در القاء مقاومت علیه *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در گلخانه

مهناز گجری محمدآبادی، غلام خداکرمیان و دوستمراد ظفری

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

مسئول مکاتبات: مهناز گجری محمدآبادی، پست الکترونیک: Mahnazgajari88@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۱۵ ۷(۲) ۶۳-۷۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۵/۰۸

چکیده

در این بررسی امکان القای مقاومت در گندم (رقم پیشگام) علیه بیماری پاخوره ناشی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritic*i (Ggt) با کاربرد پنج استرین باکتریایی اندوفیت در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شدت بیماری در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد ۵۶/۶٪کاهش یافت و مقاومت گندم در برابر بیمارگر به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. در این پژوهش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و بتا–۱ و ۴–گلوکاناز در گیاهان گندم تیمار شده با پنج باکتری اندوفیت جدا شده از گندم شامل: *Pseudomonas fluorescens*، *Serratia marcescens*، *Microbacterium phyllosphaerae*، *Bacillus pumilus* و *Streptomyces argenteolus* در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه با Ggt به عنوان نشانگرهای القای مقاومت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد فعالیت این دو آنزیم در گیاهان آلوده تیمار شده با استرین‌های اندوفیت به طور معنی‌داری بالا بود. حداکثر فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تیمار شده در زمان ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی گندم با Ggt مشاهده شد. در زمان ۴۸ ساعت فعالیت آنزیم β–۱ و ۴– گلوکاناز در گندم در اثر مایه‌زنی با استرین *Serratia marcescens* معادل ۰/۰۲۹۱ U/mg protein در مقایسه با شاهد سالم بدون باکتری اندوفیت و بیمارگر به میزان ۰/۰۰۵۵ U/mg protein و شاهد بیمار آلوده به بیمارگر و تیمار نشده با باکتری اندوفیت به میزان ۰/۰۰۷۵ بود. فعالیت آنزیم کیتیناز در اثر مایه‌زنی با استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* و *Serratia marcescens* به ترتیب معادل ۰/۰۰۵۶ U/mg protein و ۰/۰۰۴۵ در مقایسه با شاهد سالم بدون باکتری اندوفیت و بیمارگر به میزان ۰/۰۰۳۰ و شاهد بیمار آلوده به بیمارگر و تیمار نشده با باکتری اندوفیت به میزان ۰/۰۰۳۱ بود.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های اندوفیت، پاخوره، کیتیناز، بتا–۱ و ۴– گلوکاناز

مقدمه

بیمارگرهای خاکزاد شامل کمپلکسی از قارچ‌های خاکزاد و نماتدها هستند. این عوامل بیماری‌زا به بافت‌های گیاهی مرتبط با ریشه و طوقه حمله می‌کنند. نتیجه نهایی تخریب بافت‌های ریشه و طوقه است که در جذب آب و استفاده از مواد مغذی خاک دخالت دارند. قارچ *Gaeumannomyces* از مهمترین عوامل بیماری‌زای خاک است. گونه‌ی *G.graminis* مهمترین گونه‌ی جنس *Gaeumannomyces* است که به غلات و سایر گرامینه‌ها حمله می‌کند. واریته‌ی بیماری‌زای آن روی گندم با نام *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) توسط والکر نامگذاری شد که باعث بروز بیماری خطرناک پاخوره یا Take–all در مناطق گندم‌خیز دنیا می‌شود (Cook & Rovira, 1976 ؛Asher & Shipton, 1981). در گیاهان آلوده علائم بیماری عمدتاً در زمان خوشه‌دهی ظاهر می‌شود. بوته‌ها ارتفاع نابرابر دارند و خوشه‌های آلوده به طور معمول کوچکتر و سفید هستند که اصطلاحاً خوشه‌سفیدی (White Head) نامیده می‌شود. از علائم بارز

www.SID.ir

Archive of SID

پاخوره سیاه‌شدگی ریشه‌هاست که ممکن است از همان مراحل اولیه‌ی رشد گیاهچه‌ای خود را نشان دهد (Clarkson & Polly, 1981). تحقیقات بسیاری نشان داده جمعیت‌های اندوفیتی وجود دارند که به نفع گیاهان هستند وموجب تحریک رشد از طریق تثبیت نیتروژن می‌شوند (Hurek *et al.*, 1994). همچنین باعث تولید فیتوهورمون‌ها، مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی در ناحیه‌ی ریشه، از طریق تولید عوامل ضدقارچ و ضدباکتری، تولید سیدروفور، رقابت غذایی، القای مقاومت سیستمیک میزبان و ایمنی و یا افزایش در دسترس بودن مواد معدنی می‌شوند (Sturz & Nowak, 2000). به طور کلی باکتری‌های اندوفیت ممکن است باعث افزایش رشد گیاه، افزایش نرخ جوانه زنی، زیست توده، سطح برگ، میزان کلروفیل، نیتروژن،پروتئین، طول ریشه و ساقه، عملکرد و تحمل به تنش غیرزنده مانند خشکی، سیل، شوری و غیره شوند. باکتری‌های گیاهی مرتبط می‌توانند رشد گیاه را به طورمستقیم از طریق تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، تولید و انحلال فسفات، مهار ارتقای بیوسنتز اتیلن را در پاسخ به استرس زنده یا غیرزنده و یا به طور غیرمستقیم با ایجاد مقاومت به عامل بیمارگر افزایش دهند (Bhattacharyya & Jha, 2012). گیاهان فاقد سیستم ایمنی سازگار چرخشی برای محافظت از خود در مقابل بیمارگرها هستند، اما مکانیسم‌های دفاعی ضد میکروبی ساختاری و قابل القاء بسیار زیادی دارند (Scheel, 1998). مقاومت القایی یک روش محافظت بیولوژیک محسوب می‌شود که هدف آن محدود کردن بیمارگر از طریق فعال کردن پاسخ‌های دفاعی گیاه است. ایده اصلی مربوط به بیان ژن‌هایی است که ایجاد مقاومت کرده ولی بطور معمول بیان نمی‌شوند. مگر اینکه یک تیمار القاءکننده مقاومت آن‌ها را فعال کند و یا بیان آن‌ها را افزایش دهد. القاء مقاومت در گیاه شدیداً تحت تأثیر شرایط محیطی به ویژه نور و درجه حرارت در طول شبانه روز و وضعیت رشد است. به طورکلی القاء مقاومت در گیاهان با استفاده ازمحرک‌های زنده یا غیرزنده و یا استفاده از رقم‌های گیاهی ناسازگار با بیمارگر، از جمله راهکارهای مورد توجه محققان در مدیریت آفات و بیماری‌های گیاهی است. تاکنون اثر القاء کنندگی قارچ‌هایی نظیر *Colletotrichum lindemuthianum* گونه‌های غیربیماریزای *Fusarium*، *Rhizoctonia* و جدایه‌های *Trichoderma*.sp و باکتری‌های تسریع کننده رشد گیاه (PGPR) مورد بررسی قرار گرفته است (Yeidia *et al.*, 2001).

گیاهان حضور بیمارگر را از طریق الیسیتورهای مختلف یا طرح مولکول‌های همراه پاتوژن درک کرده و مکانیسم‌های مختلف دفاعی را فعال می‌کنند که منجر به القاء سطح بالایی از مقاومت می‌گردد (Ton *et al.*, 2002). در سطح مولکولی دفاع میزبان در برابر بیمارگر به صورت افزایش در غلظت متابولیت‌ها و آنزیم‌های وابسته به مکانیسم‌های دفاعی همچون آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیولیاز و کالسون سنتتیز که در بیوسنتز فیتوالکسین‌ها، گلوکانازها و کیتینازها دخالت دارند است، که بیشتر آن‌ها روی ساختار بیمارگر اثر تخریبی دارند (Chen *et al.*, 1995). حضور باکتری‌ها در انواع مختلفی از بافت‌ها و در گونه‌های مختلف و متعدد گیاهی به اثبات رسیده است (Hallmann *et al.*, 1997). به طور کلی در میان باکتری‌هایی که تحت عنوان اندوفیت طبقه‌بندی شده‌اند انواعی با نام اندوفیت‌های توانمند وجود دارند که این‌ها به دلیل داشتن خصوصیات ژنتیکی منحصر به فرد حائز اهمیت هستند. به عبارتی دیگر مفهوم اندوفیت‌های توانمند به عنوان راهی برای توصیف باکتری‌هایی است که دارای تجهیزات ژنتیکی کلیدی جهت کلونیزه کردن اندوسفر و تداوم در آن ارائه می‌شود (Hardoim *et al.* 2008). در مواردی اندوفیت‌های باکتریابی باعث ایجاد مقاومت میزبان در مقابل بیماری پوسیدگی نرم درارقام سیب‌زمینی شده‌اند. به کارگیری شش استرین باکتریایی اندوفیت از جمله *Bacillus* توانست به طور متوسط Take–all را ۳۹/۴٪ در مقایسه با شاهد آلوده کاهش دهد (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). تحقیقات زیادی مبنی بر استفاده از باکتری‌هایی نظیر: *Pseudomonas fluorescens*، *Bacillus subtilis* و همچنین قارچ *Trichoderma harzianum*، باکتری‌های جنس: *Streptomyces* spp. به عنوان عوامل موثر در مهار

www.SID.ir

Archive of SID

زیستی بیماری پاخوره گندم معرفی شده‌اند که برخی از این عوامل به صورت تجاری نیز تولید شده‌اند (Quecine *et al*., 2008; Ghahfarokhi & Goltapeh, 2010; Babaeipoor *et al*., 2011; Kwak & Weller, 2013; Lagzian *et al*., 2013). در مطالعاتی روی چند رقم سیب‌زمینی، ۴۹/۵٪ از جدایه‌های اندوفیت رقم سباگو(Sebago) توانستند از رشد و تکثیر باکتری *Erwinia carotovora* جلوگیری نمایند (Sturz *et al*., 1998). گزارش‌ها نشان داده‌ند اندوفیت *Burkholderia phytofirmans* PsJN باعث ایجاد مقاومت در برابر *Botrytis* در انگور می‌شود و موجب القاء دفاع ژن‌های مرتبط با هر دو مسیر سیگنالینگ SA و JA در انگور می‌شود (Bordiec *et al*., 2011). باکتری‌هایی که توانسته‌اند مقاومت را ارتقاء دهند شامل: *P. putida*، *P. fluorescens*، *Serratia marescens*، *S. plymuthica* هستند (Van Loon *et al*., 1998). امروزه اغلب روش‌های مورد استفاده در زمینه‌ی گیاهپزشکی علیه بیمارگرها و آفات با کاربرد سموم شیمیایی در ارتباط بوده در حالی که سلامت انسان و محیط‌زیست را تهدید می‌کند (Edreva,2004). لذا هدف تحقیق حاضر این است که با در نظر گرفتن پدیده مقاومت القایی که مکانیزم دفاعی طبیعی گیاه را فعال می‌کند، می‌تواند به عنوان یک جایگزین غیر سنتی و دوستدار محیط‌زیست در این عرصه مورد بهره‌برداری قرار گیرد و این مقدمه‌ای است برای سایر فعالیت‌های کشاورزی که قادر است کاربرد کنترل شیمیایی را کاهش دهد و به این ترتیب در گسترش کشاورزی پایدار نقش داشته باشد.

مواد و روش‌ها

منشأ ایزوله‌ها و مواد گیاهی

نمونه‌های گیاه بیمار گندم جهت جداسازی قارچ (*Ggt*) *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در بهار سال ۹۳ از یک مزرعه با علائم خوشه‌سفیدی و سیاه‌شدگی ریشه و طوقه درمنطقه تویسرکان– روستای لامیان استان همدان جمع آوری و داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند. قارچ *Ggt* روی محیط کشت R–dPDA (ریفامپسین–سیب زمینی دکستروز آگار) جداسازی شد. بررسی مورفولوژی ریسه و هیفوپودیوم‌ها با استفاده از روش والکر با کلید CMI Description انجام شد (Walker, 1973). فرم جنسی قارچ عامل در مرحله آزمون اثبات بیماری‌زایی روی گندم(رقم پیشگام) بدست آمد. جمع آوری نمونه‌ها جهت جداسازی استرین‌های باکتریایی اندوفیت در بهار ۹۳ ازمناطقی از استان همدان شامل: کبودرآهنگ، تویسرکان، صالح آباد، همه کسی، قهاوند، توئین و نهاوند از بوته‌های با ظاهر سالم و شاداب انجام شد. استرین‌های باکتریایی اندوفیت مورد بررسی در این مطالعه از قطعات برگ و ساقه شاداب گندم ضدعفونی شده سطحی بدست آمدند، بدین ترتیب که قطعات برگ و ساقه خرد و در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۱٪ ژلاتین به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه شیکر با ۱۲۰دور در دقیقه تکان داده شدند. از سوسپانسیون بدست آمده روی آگار مغذی کشت داده شد و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. پس از گذشت دو روز از هر تشتک تک کلنی یا تک کلنی-هایی که ویژگی‌های مرفولوژیکی متفاوتی داشتند را برگزیده و دوباره تا رسیدن به خلوص کامل کشت شدند. پنج جدایه اندوفیت =MG26 *Pseudomonas fluorescens* =MG28، *Serratia marcescens* =MG29، *Microbacterium phyllosphaerae* =MG34، *Bacillus pumilus* و=MG56 *Streptomyces argenteolus* بر اساس آزمون‌های مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیزلوژیکی نظیر: آزمون فوق حساسیت روی شمعدانی (Klement *et al*., 2001)، آزمون کاتالاز، اکسیداز (Kovacs, 1956)، رشد در نمک طعام (Schaad *et al*., 2001)، آزمون KOH ۳٪، تولید رنگدانه زرد روی YDC، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King B (Merck, Germany)، آزمون آرژنین دی هیدرولاز، رشد هوازی و بی هوازی (Hugh & Leifson, 1953)، هیدرولیز نشاسته، تست لوان (Schaad *et al*., 2001)، کشت روی Rot of potato، EMB (Merck, Germany)، تولید رنگدانه سبز متالیک، استفاده از سیترات، هیدرولیز ژلاتین و تولید اسید از کربوهیدارت‌ها با استفاده از محیط پایه آیر (Schaad *et al*., 2001) و نهایتا توالی ژن

www.SID.ir

Archive of SID

16S rRNA شناسایی و با پایگاه داده بانک ژن مقایسه و جهت انجام مطالعات بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون اثبات بیماریزایی قارچ عامل *Ggt* روی گندم

مخلوطی از خاک، ماسه و کود حیوانی با نسبت وزنی (۲:۱:۱) در کیسه‌های نایلونی ریخته شد. و در دمای ۹۰ درجهٔ سلسیوس به مدت دو ساعت اتوکلاو شدند. سپس از گلدان‌های با قطر ۱۰ سانتی‌متر استفاده گردید و تا پنج سانتی‌متری از لبه‌ی گلدان پر از خاک شدند. سپس پرگنه‌ی پنج روزه‌ی قارچ بیمارگر که روی PDA رشد کرده بود به طور کامل با محیط کشت روی سطح خاک قرار گرفت و با سوزن‌های استریل تعدادی سوراخ روی آن جهت نفوذ آب ایجاد شد. روی سطح پرگنه یک سانتی‌متر خاک استریل ریخته شد و پنج عدد بذر گندم را که قبلاً با وایتکس ضدعفونی شده بود روی سطح خاک قرار داده شد و مجدداً یک سانتی‌متر خاک روی بذرها ریخته شد و به آرامی آبیاری شدند. برای شاهد نیز فقط از محیط کشت PDA درون تشتک پتری با همان ضخامت استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه و در شرایط دمایی ۲۵–۱۸ درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند و مرتب براساس نیاز آبی آبیاری شدند. ارزیابی برای بیماری‌زایی پس از ۳۰ روز و برای تولید پریتسیوم پس از دو ماه انجام شد (Liu *et al*., 2009).

تهیه زادمایه (اینوکولوم) قارچ بیمارگر جهت آلوده‌سازی مصنوعی خاک

به منظور آماده‌سازی یک زادمایه با قدرت بیماری‌زایی بالا از دانه‌های یولاف به صورت زیر استفاده شد: دانه‌های یولاف (۲۰۰گرم) به مدت ۲۴ ساعت در آب (۲۰۰ میلی‌لیتر) در دمای اتاق خیسانده شدند. سپس به فلاسک Erlenmyer (۵۰۰ میلی‌لیتری) منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس در سه روز متوالی اتوکلاو شدند. یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA (با قطر ۹ سانتی‌متر) که قارچ Ggt روی آن رشد داده شده بود به مربع‌های کوچک خورد شده و با ۲۰۰ گرم دانه‌ی یولاف اتوکلاو شده مخلوط شد و در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. جهت اجتناب از به هم چسبیدن دانه‌ها به یکدیگر و نیز برای نفوذ به همه‌ی قسمت‌ها، محتویات فلاسک‌ها هر روز به هم زده شد پس از گذشت سه هفته، دانه‌های یولاف کلونیزه شده از داخل فلاسک‌ها خارج، در معرض هوا خشک گردید و جهت یکدست‌شدن آسیاب شدند و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. تا به منظور آلوده کردن مصنوعی خاک برای آزمایش‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گیرند (Liu *et al*., 2009).

تهیه زادمایه از باکتری‌های اندوفیت

برای هر جدایه تعداد سه تشتک پتری به صورت چمنی کشت داده شد. برای این منظور از کشت ۲۴ تا ۴۸ ساعته روی محیط NA استفاده شد. به تشتک‌های حاوی باکتری به صورت جداگانه چند سی سی آب مقطر اضافه شد و باکتری‌ها به کمک لوپ از سطح محیط کشت جدا و در آب مقطر حل شدند. سپس در ظروف ارلن حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شدند و جذب نوری آن‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با غلظت 10^6 توسط دستگاه اسپکتروفتومتر تنظیم شد.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

آزمایش به منظور تعیین اثر کاربرد باکتری‌های اندوفیت بر کاهش شدت بیماری پاخوره ناشی از القای مقاومت در گیاه گندم (رقم پیشگام) انجام شد. از پارامترهای نشان‌دهنده‌ی القای مقاومت، میزان فعالیت آنزیم‌های کیتیناز، β–۱ و ۴–گلوکاناز درون بافت‌های گیاه و نیز برای ارزیابی شدت بیماری فاکتور شادابی بوته‌ها و تعداد بوته‌های آلوده در هر گلدان با در نظر گرفتن ضایعات آوندی سیاه ناشی از Take–all، بوته‌ها در پنج کلاس مورد بررسی قرار گرفتند (Kavak & Boydak,2006) (جدول ۱). داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 تحلیل شد و میانگین‌ها با روش آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ مقایسه شدند.

جهت انجام آزمایش‌های گلخانه‌ای، مخلوط خاک، ماسه و کودحیوانی پوسیده به نسبت وزنی ۱: ۱: ۲ تهیه و اتوکلاو گردید. گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۲۰ سانتی‌متر با

www.SID.ir

Archive of SID

خاک پر شدند، درون هر گلدان ۱۲ عدد بذر گندم (رقم پیشگام) کاشته شد. گیاهچه‌های دو هفته‌ای گندم سه بار به صورت یک روز در میان با سوسپانسیون‌های باکتریایی تا قبل از جاری شدن آب از سطح برگ‌ها اسپری شدند. در روز دوم علاوه بر اسپری برگی مقدار ۳۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون در هر گلدان روی سطح خاک و نزدیکی بذور کاشته شده ریخته شد. ۴۸ ساعت بعد از آخرین اسپری مایه‌زنی با قارچ مورد نظر (به ازای هر ۱۰۰ گرم خاک یک گرم زادمایه قارچ) روی سطح خاک ریخته به آرامی و به مقدار جزئی با خاک مخلوط گردید. از بافت ساقه و برگ جهت تعیین مقدار آنزیم‌ها در فواصل زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها (یک گرم بافت) با نیتروژن مایع خرد و منجمد شده و داخل میکروتیوپ‌ها منتقل شدند. جهت آزمایش‌های بعدی در فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه‌ی طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 آنالیز و مقایسه‌ی میانگین با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ انجام شد (Navarre *et al.*,2004 & Madhaiyan *et al.*, 2004).

جدول۱- شاخص اندازه‌گیری شدت بیماری با درنظرگرفتن فاکتور شادابی در گیاه گندم

Table1. Disease severity index considering the freshness factor in wheat

Disease severity	Index
Week	10–20%=1
Average	21–40%=2
well	41–60%=3
Very well	61–80%=4
Excellent	81–100%=5

استخراج کیتیناز و گلوکاناز

جهت استخراج کیتیناز و گلوکاناز یک گرم از نمونه-های بافت تهیه شده را با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار مخلوط و سپس عصاره در میکروتیوپ‌های دو میلی‌لیتری به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. بخش رویی به میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و تا انجام آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد (Madhaiyan *et al.*2004).

بررسی فعالیت آنزیم β-۱ و ٤ گلوکاناز

بررسی میزان فعالیت آنزیم بتا-۱و۴گلوکاناز به روش Tondje *et al.*, (2007) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد: عصاره‌ی حاصله‌ی مربوط به استخراج گلوکاناز از فریزر خارج و در یخچال قرار داده شد تا به آرامی ذوب شود. سپس میکروتیوپ‌های مربوطه جهت ادامه‌ی آزمایش‌ها در حمام یخ قرار داده شد. مخلوط واکنش شامل ۱۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی گیاه و ۱۰۰ میکرولیتر محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز (ساخت کمپانی سیگما) بود که در بافراستات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۵) تهیه شده بود. مخلوط واکنش (۲۰۰ میکرولیتر) برای مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس با اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (Dinitrosalicylic acid reagent= DNS) و قرار دادن مخلوط واکنش در آب جوش به مدت پنج دقیقه متوقف شد. سپس حجم مخلوط واکنش با آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد و با استفاده از اسپکتروفتومتر (Varian Cary 100 Conc) جذب نوری آن درطول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. دستگاه اسپکتروفتومتر به وسیلهٔ مخلوط واکنش که عصاره‌ی آن در حمام آب ۱۰۰ درجه سلسیوس فعالیتش متوقف شده بود، صفر شد. فعالیت اختصاصی آنزیم به صورت میلی‌گرم گلوکز آزاد شده در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین تام موجود در عصاره تعیین شد (Yedidia *et al.*, 2000). جهت تعیین فعالیت آنزیمی منحنی استاندارد با غلظت‌های مختلف گلوکز تهیه شد.

تهیه منحنی استاندارد جهت محاسبه فعالیت آنزیم β-۱ و ٤ گلوکاناز

ابتدا برای تهیه‌ی محلول پایه‌ی ۰/۱ مولار گلوکز، ۰/۱۸ گرم گلوکز در ۱۰ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار (pH=۵) حل شد و سپس از محلول پایه‌ی مذکور ۰، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، میلی‌لیتر به لوله‌های ۱۰

www.SID.ir

Archive of SID

میلی‌لیتری منتقل شد و حجم آن‌ها با بافر مذکور به پنج میلی‌لیتر رسانده شد. از هر کدام از لوله‌های مذکور ۱۰۰ میکرولیتر به مخلوط واکنش به جای عصاره‌ی گیاه اضافه شد. مخلوط واکنش ۳۰ دقیقه در حمام آب ۵۰ درجه سلسیوس نگهداری شد و سپس به مخلوط واکنش معرف DNS اضافه و نمونه‌ها بلافاصله در ظرف آب جوش قرار گرفت و برای پنج دقیقه جوشانده شد. سپس حجم مخلوط به وسیله‌ی آب مقطر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. دستگاه اسپکتروفتومتر به وسیله‌ی مخلوط واکنش بدون گلوکز صفر شد. پس از قرائت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۰۰ نانومتر، به وسیله‌ی نرم افزار Excel و رویه‌ی Trendline بین غلظت‌های گلوکز و میزان جذب نوری در طول‌موج ۵۰۰ نانومتر معادله‌ی رگرسیونی خطی برقرار شد و معادله‌ی درجه‌ی یک حاصله جهت محاسبه‌ی میزان فعالیت آنزیم مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز

عصاره‌ی حاصله، مربوط به استخراج کیتیناز از فریزر خارج و در یخچال قرار داده شد تا به آرامی ذوب شود. سپس میکروتیوپ‌های مربوطه جهت ادامه‌ی آزمایش‌ها در حمام یخ قرار داده شد. مخلوط واکنش شامل ۲/۵ میلی‌لیتر محلول کیتین ۱٪ ساخت کمپانی فلوکا و ۲/۵ میلی‌لیتر بافر استات سدیم ۰/۰۵ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر عصارهٔ گیاه بود. مخلوط حاصله برای مدت یک ساعت در حمام آب ۴۰ درجه سلسیوس نگهداری شد، سپس واکنش با اضافه کردن سه میلی‌لیتر معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید متوقف شد و برای مدت پنج دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار گرفت. محلول حاصل به مدت پنج دقیقه در ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و میزان جذب بخش رویی در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. دستگاه اسپکتروفتومتر برای هر نمونه به وسیله‌ی مخلوط واکنش که تنها در ۴۰ درجه تیمار نشده بود صفر شد. میزان فعالیت اختصاصی آنزیم به صورت میلی‌گرم گلوکز آزاد شده در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین تام نمونهٔ گیاهی تعیین شد. جهت تعیین فعالیت آنزیمی منحنی استاندارد با بهره‌گیری از غلظت‌های مختلف گلوکز مشابه قبل تهیه شد (Bansode & Bajekal, 2006).

ارزیابی میزان کل پروتئین و سنجش پروتئین استاندارد

جهت تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین تام موجود در نمونه‌ها به روش Bradford (1976) به شرح ذیل تعیین شد: ابتدا سه میلی‌لیتر معرف بردفورد همراه با ۳۰ میکرولیتر عصاره‌ی آنزیمی به صورت کامل مخلوط شد. پس از اختلاط کامل محتویات هر لوله و انتقال آن به لوله‌های اسپکتوفتومتر (cuvette)، مقدار جذب نور در ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 100 Conc) قرائت شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر از لوله‌های شاهد (blank) که شامل فقط سه میلی‌لیتر معرف بردفورد بود استفاده شد. جهت تهیه منحنی استاندارد مربوطه، از سرم آلبومین گاوی استفاده شد. طبق روش بردفورد مقدار پنج میلی‌گرم از این سرم در پنج میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل و از آن به ترتیب ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵، ۵۰، ۶۰ و ۷۰ میکرولیتر به لوله‌های آزمایش حاوی سه میلی‌لیتر معرف بردفورد اضافه شد. پس از اختلاط کامل محتویات لوله‌ها و تولید رنگ آبی، مقدار جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (Varian Cary 100 Conc) قرائت شد. سپس میزان سرم و اعداد جذب به دست آمده معادلهٔ رگرسیون و منحنی مربوط به آن به دست آمد.

نتایج

تأثیر کاربرد باکتری‌های اندوفیت بر بیماری پاخوره در شرایط گلخانه

نتایج بررسی پنج باکتری اندوفیت در شرایط گلخانه بر شدت بیماری با در نظر گرفتن ضایعات آوندی سیاه ناشی از Take–all و نیز شادابی بوته‌ها نشان داد، که شدت بیماری در تیمارهای باکتریایی اندوفیت با شاهد سالم و شاهد آلوده اختلاف معنی‌داری وجود دارد. درصد فاکتور شادابی در تیمار MG26، ۵۶/۶٪ نسبت به شاهد آلوده افزایش یافت به

www.SID.ir

Archive of SID

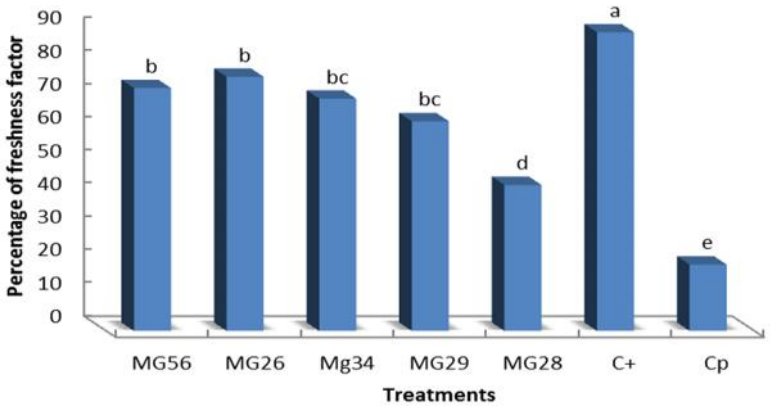
عبارتی دیگر میزان ضایعات آوندی و نکروز ریشه و طوقه‌ها در تیمارهای باکتریایی کاهش یافت (شکل ۱).

بررسی میزان فعالیت آنزیم β–۱ و ٤– گلوکاناز

نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین بررسی فعالیت آنزیم β–۱ و ۴–گلوکاناز در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج کاربرد باکتری‌های اندوفیت جداشده از گندم نشان داد، بین تیمارها و نیز روزهای مختلف نمونه‌برداری و اثر متقابل آن‌ها در میزان فعالیت این آنزیم در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد (شکل ۲). میزان فعالیت آنزیم β–۱ و ۴– گلوکاناز در گیاهان تیمار شده با باکتری‌های اندوفیت به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد آلوده و سالم بود. در بین تیمارهای مختلف باکتریایی نیز برخی استرین‌ها بیشترین تاثیر را در میزان فعالیت این آنزیم از خود نشان دادند. در همه‌ی تیمارها، ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری میزان فعالیت این آنزیم افزایش یافت و پس از هفت روز یک کاهش نسبی نشان دادند.

بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز

نتایج بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در جداول ۴ و ۵ نشان داده شده است. نتایج کاربرد باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گندم نشان داد، بین تیمارها و نیز روزهای مختلف نمونه‌برداری و اثر متقابل آن‌ها در میزان فعالیت این آنزیم در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌دار وجود دارد. طبق نتایج به دست آمده میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در همه‌ی تیمارها، ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری افزایش یافته و به بالاترین میزان فعالیت خود رسیده است (شکل ۳). یک کاهش نسبی هفت روز پس از مایه‌زنی از خود نشان دادند. بالاترین میزان فعالیت آنزیم در ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری مشاهده شد. بین تیمارهای مختلف باکتری‌های اندوفیت، تیمار MG26=*Pseudomonas fluorescens* بالاترین میزان فعالیت آنزیم را نشان داد.



شکل ۱– مقایسه شدت بیماری پاخوره گندم ناشی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* در گیاهان تیمار شده با باکتری‌های اندوفیت گندم؛ Cp: شاهد آلوده ،+C: شاهد سالم، MG: باکتری اندوفیت

Fig 1. Compare of wheat take–all disease severity caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat plants treated with endophytic bacteria; Cp: infected control, C +: healthy control, MG: endophytic bacteria

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲– تجزیه واریانس بررسی فعالیت آنزیم β–۱ و ۴–گلوکاناز در گندم ناشی از کاربرد باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گندم

Table 2. Statistical analysis of β–1, 4–glucanase enzyme activity in wheat due to application of endophytic bacteria isolated from wheat.

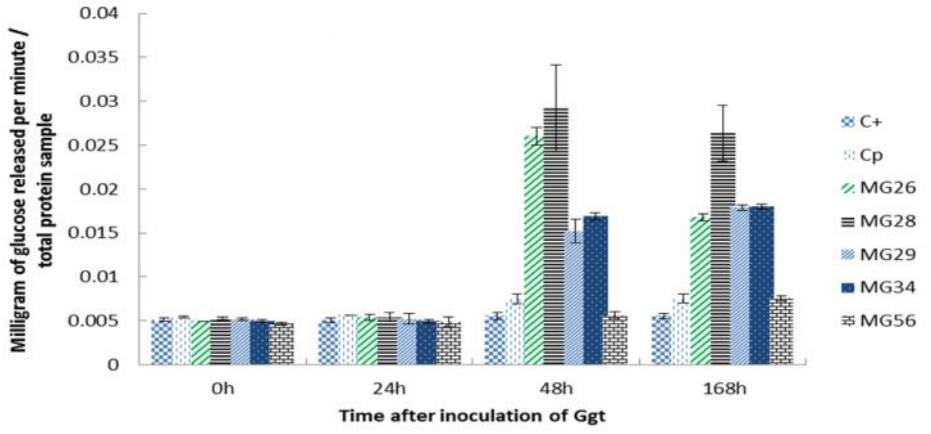
Source	DF	β–1, 4–glucanase
Time	3	0.000638**
Bacteria	6	0.000216**
Time*Bacteria	18	0.000078**
Error	56	0.000004
Coefficient of variation(CV)	–	20.99%

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (Significant difference at 1% level)

جدول۳– مقایسه میانگین بررسی فعالیت آنزیم β–۱ و ۴– گلوکاناز در گندم ناشی از کاربرد باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گندم

Table 3. Analysis of β–1, 4–glucanase enzyme activity in wheat due to application of endophytic bacteria isolated from wheat

Treatment	Sampling time intervals (hour) Time			
	0	24	48	168
C+	0.0051^{c}	0.0051^{c}	0.0055^{c}	0.0055^{c}
Cp	0.0054^{c}	0.0056^{c}	0.0075^{c}	0.0075^{c}
MG26P	0.0049^{c}	0.0053^{c}	0.0260^{a}	0.0168^{b}
MG28P	0.0052^{c}	0.0054^{c}	0.0291^{a}	0.0263^{a}
MG29P	0.0051^{c}	0.0052^{c}	0.0152^{b}	0.0179^{b}
MG34P	0.0049^{c}	0.0049^{c}	0.0168^{b}	0.0179^{b}
MG56P	0.0047^{c}	0.0048^{c}	0.0056^{c}	0.0075^{c}



شکل ۲– بررسی میزان فعالیت آنزیم β–۱ و ۴– گلوکاناز در فواصل زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritic*i به گندم تیمارشده با باکتری‌های اندوفیت. +C: شاهد سالم Cp: شاهد بیمار

Fig 2. activity of β–1, 4–glucanase enzyme at intervals of 0, 24, 48 and 168 hours after inoculation *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* to wheat treated with endophytic bacteria. C +: healthy controls Cp: infected control.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴– تجزیه واریانس بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در گندم ناشی از کاربرد باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گندم

Table4. Statistical analysis Chitinase enzyme in wheat due to application of endophytic bacteria isolated from wheat.

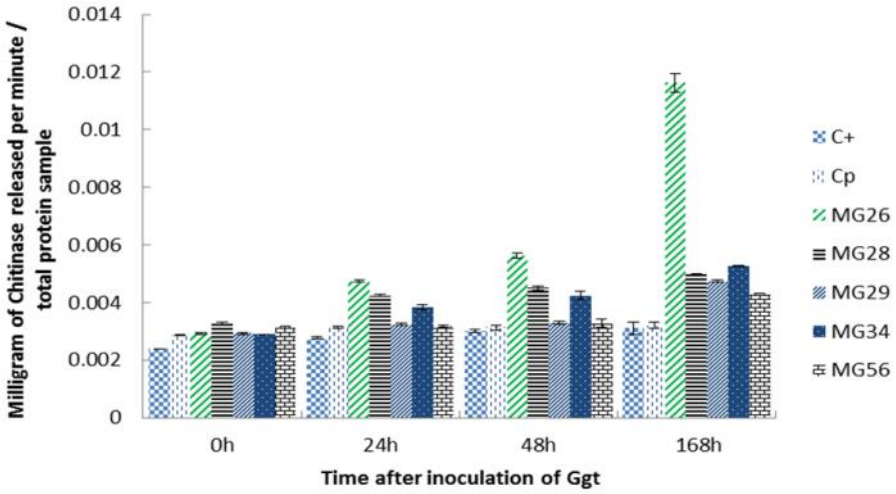
Source	DF	Chitinase
Time	3	0.000021**
Bacteria	6	0.00015**
Time*Bacteria	18	0.00000481**
Error	56	0.00000003
Coefficient of variation(CV)	-	4.15%

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد (Significant difference at 1% level)

جدول۵– مقایسه میانگین بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در گندم ناشی از کاربرد باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گندم

Table5. Analysis of Chitinase enzyme activity in wheat due to application of endophytic bacteria isolated from wheat.

Treatment	Sampling time intervals (hour) Time			
	0	24	48	168
C+	0.0024^{m}	0.0027^{l}	0.0030^{ikh}	0.0031^{ikhj}
Cp	0.0028^{kl}	0.0031^{ikh}	0.0031^{jkh}	0.0032^{ihj}
MG26P	0.0029^{likh}	0.0047^{de}	0.0056^{b}	0.0116^{a}
MG28P	0.0032^{h}	0.0042^{f}	0.0045^{ef}	0.0050^{d}
MG29P	0.0029^{likj}	0.0032^{ih}	0.0033^{h}	0.0047^{de}
MG34P	0.0029^{lkj}	0.0038^{g}	0.0042^{f}	0.0052^{c}
MG56P	0.0031^{ikhj}	0.0031^{ikhj}	0.0032^{h}	0.0043^{f}



شکل ۳– بررسی میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در فواصل زمانی ۰، ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* به گندم تیمارشده با باکتری‌های اندوفیت. +C: شاهد سالم Cp: شاهد بیمار

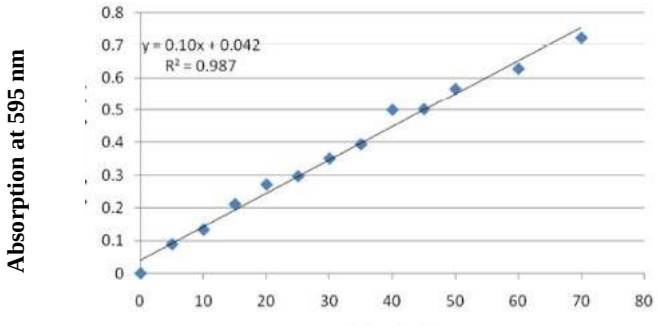
Figure 3. activity of Chitinase enzyme at intervals of 0, 24, 48 and 168 hours after inoculation *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* to wheat treated with endophytic bacteria. C +: healthy controls Cp: infected control.

www.SID.ir

Archive of SID

منحنی استاندارد پروتئین

جهت محاسبه‌ی فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در عصاره، منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف سرم آلبومین گاوی رسم شد (شکل ۴). فعالیت آنزیمی به صورت واحد آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین کل تعیین شد. نتایج بررسی اثر کاربرد پنج باکتری اندوفیت موفق گلخانه‌ای نشان داد، حداکثر فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تیمار شده در زمان ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی گندم با Ggt مشاهده شد. در زمان ۴۸ساعت فعالیت آنزیم β–۱ و ۴– گلوکاناز در گندم در اثر مایه‌زنی با استرین *Serratia marcescens* معادل۰/۰۲۹۱ U/mg protein و فعالیت آنزیم کیتیناز در اثر مایه‌زنی با استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* و *Serratia marcescens* به ترتیب معادل ۰/۰۰۵۶ و ۰/۰۰۴۵ U/mg protein بود.



شکل ۴– منحنی مورد استفاده برای تعیین میزان پروتئین کل

Fig 4. Diagram used to determine the total protein

بحث

برخی از استرین‌های باکتریایی غیر از تولید مواد بازدارنده و سیدروفور، توان رقابتی بالاتری داشته و به علاوه قادرند سیستم ایمنی میزبان را تحریک کنند. تماس یک پاتوژن با گیاه میزبان سبب فعال شدن واکنش‌های دفاعی در گیاه می‌گردد. تحقیقات بسیاری نشان داده است که القای واکنش‌های دفاعی گیاه از طریق مایه زنی مصنوعی با میکروب‌ها یا با تیمار گیاه با مواد شیمیایی امکانپذیر است. این مقاومت القایی در ابتدا ممکن است به صورت موضعی و به دنبال آن به صورت سیستمیک گسترش یابد. در واکنش‌های دفاعی تعداد زیادی آنزیم که به نام پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی (PR) شناخته شده‌اند فعال می‌شوند. برخی از پروتئین‌های PR باعث ساخته شدن اتیلن می‌شوند که به عنوان نوعی هورمون گیاهی می‌تواند بسیاری از واکنش‌های "استرس" را در گیاه برانگیزاند. برخی دیگر از این پروتئین‌ها باعث تولید آنزیم‌های اکسید کننده و پروتئین‌هایی می‌شوند که در تغییر دیواره‌ی سلولی و تقویت آن در مقابل حمله‌ی بیمارگر نقش دارند (Reddy *et al.*, 2002). دست کم ۱۴ تیره از پروتئین‌های PR شناسایی شده‌اند که از شناخته شده‌ترین آن ها میتوان به PR2 (β–۱، ۳– گلوکاناز)، PR3 (کیتینازها) اشاره کرد. اطلاعات بدست آمده در مورد این پروتئین‌ها، بالقوه از اهمیت عملی زیادی برخوردارند زیرا ممکن است به کمک آن‌ها به روش مهندسی ژنتیک، گیاهانی به وجود آورد که وقتی مورد حمله‌ی بیمارگر قرار گیرند، مقادیر کافی از پروتئین‌های PR مناسب برای محافظت از گیاه از بیماری تولید نمایند. در این رابطه بسیاری از PGPRها با استفاده از مکانیسم مقاومت اکتسابی سیستمیک همانند تولید اسید سالیسیلیک و اگزالات مقاومت گیاه را در مقابل عامل بیماریزا افزایش می‌دهند. در آزمایشی که توسط دانشمندان انجام گرفت

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده شد دوگونه از باسیلوس‌ها به وسیله همین مکانیسم بیماری پوسیدگی غلاف برنج، پوسیدگی ریشه در سویا، بیماری سوختگی خیار را به شدت کاهش دادند. نتایج نشان می‌دهد که، افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و گلوکاناز با افزایش مقاومت مشاهده شده در گیاهانی که در آن‌ها تحریک مقاومت صورت گرفته مرتبط است.

تحقیقات بسیاری نشان داده جمعیت‌های اندوفیتی وجود دارند که به نفع گیاهان هستند وموجب تحریک رشد از طریق تثبیت نیتروژن می‌شوند (Hurek *et al*., 1994). همچنین باعث تولید فیتوهورمون‌ها، مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی در ناحیه‌ی ریشه، از طریق تولید عوامل ضدقارچ و ضدباکتری، تولید سیدروفور، رقابت غذایی، القای مقاومت سیستمیک میزبان و ایمنی و یا افزایش در دسترس بودن مواد معدنی می‌شوند (Sturz & Nowak, 2000). به کارگیری شش استرین باکتریایی اندوفیت از جمله Bacillus توانست به طور متوسط Take–all را ۳۹/۴٪ در مقایسه با شاهد آلوده کاهش دهد (لیو و همکاران، ۲۰۱۱). تحقیقات زیادی مبنی بر استفاده از باکتری‌هایی نظیر: *Pseudomonas fluorescens* ، *Bacillus subtilis* و همچنین قارچ *Trichoderma harzianum*، اکتینو باکتری مانند .*Streptomyces* spp به عنوان عوامل موثر در مهار زیستی بیماری پاخوره گندم معرفی شده‌اند که برخی از این عوامل به صورت تجاری نیز تولید شده‌اند.

در این پژوهش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و بتا–۱ و ۴–گلوکاناز در گیاهان گندم تیمار شده با پنج باکتری اندوفیت جدا شده از گندم شامل: *Pseudomonas fluorescens*، *Serratia marcescens*، *Microbacterium phyllosphaerae*، *Bacillus pumilus* و *Streptomyces argenteolus* در زمان‌های ۰، ۲۴، ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه با *Ggt* به عنوان نشانگرهای القای مقاومت مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد فعالیت این دو آنزیم در گیاهان آلوده تیمار شده با استرین‌های اندوفیت به طور معنی‌داری بالا بود. حداکثر فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تیمار شده در زمان ۴۸ و ۱۶۸ ساعت پس از مایه‌زنی گندم با Ggt مشاهده شد. در زمان ۴۸ ساعت فعالیت آنزیم β–۱ و ۴–گلوکاناز در گندم در اثر مایه‌زنی با استرین *Serratia marcescens* معادل ۰/۰۲۹۱ U/mg protein در مقایسه با شاهد سالم بدون باکتری اندوفیت و بیمارگر به میزان ۰/۰۰۵۵ و شاهد بیمار آلوده به بیمارگر و تیمار نشده با باکتری اندوفیت به میزان ۰/۰۰۷۵بود. همچنین فعالیت آنزیم کیتیناز در اثر مایه‌زنی با استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* و *Serratia marcescens* به ترتیب معادل ۰/۰۰۵۶ و ۰/۰۰۴۵ U/mg protein در مقایسه با شاهد سالم بدون باکتری اندوفیت و بیمارگر به میزان ۰/۰۰۳۰ و شاهد بیمار آلوده به بیمارگر و تیمار نشده با باکتری اندوفیت به میزان ۰/۰۰۳۱ بود. نتایج این پژوهش نشان داد، آنزیم‌های کیتیناز و β–۱و ۴ گلوکاناز حداکثر فعالیت را در گیاهان مایه‌زنی شده به وسیله عامل بیماری و تیمارهای باکتریایی نشان دادند. این نتایج با مطالعات قبلی مبنی بر کاربرد لیپوپلی ساکاریدهای *P. fluorescence* در سرکوب پژمردگی فوزاریومی تربچه و القای مقاومت در آن توسط Leeman *et al*., 1996 مطابقت داشت. اما در میان باکتری‌ها همواره گروهی از پتانسیل بالاتری در القای مقاومت از خود نشان داده‌اند که از آن‌ها می‌توان به: *P. putida*، *Serratia marescens*، *Serratia plymuthica* و *P. fluorescens* روی پاتوژن‌های قارچی، باکتریایی و ویروسی اشاره کرد (Van Loon *et al*., 1998)، که در این بررسی نیز برخی از این گونه‌های باکتریایی کارایی قابل قبولی از خود نشان دادند.

References

Asher, M. J.C. & Shipton, P.J. 1981. Biology and Control of Take–all. Academic press London, 538pp.

Babaeipoor, E., Mirzaei, S., Rezaee Danesh, Y., Arjmandian, A. & Chaichi, M. 2011. Evaluation of some antagonistic bacteria in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* causal agent of wheat take–all disease in Iran. African Journal of Microbiology Research, 5: 5165–5173.

www.SID.ir

Archive of SID

Bansode, V.B. & Bajekal, S. 2006. Chatacterization of chitinases from microorganisms isolated from Lona Lake Indian Journal of Biothechnology, 5: 357–363.

Bhattacharyya, P.N. & Jha, D.K. 2012. Plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4): 1327–50.

Bordiec, S., Paquis, S., Lacroix, H., Dhondt, S., Barka, E.A., Kauffmann, S. & Dorey, S. 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth–promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non–host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* in grapevine cell suspensions. Journal of Experimental Botany, 62(2): 595–603.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the estimation of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein–day binding. Analytical Biochemistry, 72: 248–254.

Chen, C., Bauske, E.M., Musson, G., Rodriguezkabana, R. & Kloepper, J.W. 1995. Biological control of Fusarium wilt on cotton by use of endophytic bacteria. Biological Control, 5(1): 83–91.

Clarkson, J.D.S. & Polley, R.W. 1981. Diagnosis, assessment, crop–loss appraisal and forecasting. Biology and Control of take–all. Academic Press, London, England, 251–269.

Cook, R. J. & Rovira, A. D. 1976. The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. Soil Biology and Biochemistry, 8: 269–273.

Edreva, A. 2004. A novel strategy for plant protection: Induced resistance. Journal of Cell and Molecular Biology, 3(2): 61–69.

Ghahfarokhi, R.M. & Goltapeh, M.E. 2010. Potential of the root endophytic fungus *Piriformospora indica; Sebacina vermifera* and *Trichoderma* species in biocontrol of take–all disease of wheat *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici in vitro*, in Iran. Journal of Agriculture Science and Technology, 6: 11–18.

Hallmann, J., Quadt–Hallmann, A., Mahaffee, W.F. & Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43: 895–914.

Hardoim, P.R., van Overbeek, L.S. & van Elsas, J.D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. Trends in Microbiology, 16: 463–471.

Hugh, R. & Leifson, E. (1953). "The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria". Journal of Bacteriology, 66(1): 24.

Hurek, T., Reinhold–Hurek, B., Van Montagu, M. & Kellenberger, E. 1994. Root colonization and systemic spreading of *Azoarcus* sp. strain BH72 in grasses. Journal of Bacteriology, 176: 1913–1923.

Kavak, K. & Boydak, E. 2006. Resistance levels of 26 sesame breeding lines to Fusarium wilt disease. The Plant Pathology Journal, 24: 141–146.

Klement, Z., Rudolph, K. & Sands, D.C. 2001. Methods in Phytobacteriology. Akademiai Kiado, Budapest.

Kwak, Y.S. & Weller, D.M. 2013. Take–all of Wheat and Natural Disease Suppression: A Review. The Plant Pathology Journal, 29: 125–135.

Lagzian, A., Saberi Riseh, R., Khodaygan, P., Sedaghati, E. & Dashti, D. 2013. Introduced *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 as an important biocontrol agent for controlling *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* the causal agent of take–all disease in wheat. Archive of Phytopathology and Plant Protection, 46: 2104–2116.

Leeman, M., Den Ouden, F.M., Van Pelt, J.A., Dirkx, F.P. Steijl, M.H., Bakker, P.A.H.M. & Schippers, B. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to Fusarium wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. Phytopathology, 86(2): 149–155.

Liu, B., Huang, L., Kang, Z. & Buchenauer, H. 2011. "Evaluation of endophytic bacterial strains as antagonists of take–all in wheat caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in greenhouse and field". Journal of Pest Science, 84(3): 257–264.

Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z. & Gong, Y. 2009. Biological control of take–all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R–j and potential mode of action. Biological Control, 49(3): 277–285.

Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Senthilkumar, M., Seshadri, S., Chung, H., Jinchul, Y. A. N. G. & Tongmin, S. A. 2004. Growth promotion and induction of systemic resistance in rice cultivar Co–47 (*Oryzea sativa*) by *Methylobacterium* spp. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 45: 315–324.

Navarre, D.A. & Mayo, D. 2004. Differential characteristics of salicylic acidmediated signaling in potato. Physiological and Molecular Plant Pathology, 64: 179–188.

Quecine, M.C., Araujo, W.L., Marcon, J., Gail, C.S. Azevedo, J.L. & Pizzirani–Kleiner, A.A. 2008. Chitinolytic activity of endophytic *Streptomyces* and potential for biocontrol. Letters in Applied Microbiology, 47: 486–491.

Scheel, D. 1998. Resistance response physiology and signal transduction. Current Opinion in Plant Biology, 1(4): 305–310.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. "Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria". Third ed. APS Press, Minnesota, 373 pp.

www.SID.ir

Archive of SID

Sturz, A.V. & Nowak, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Applied Soil Ecology, 15: 183–190.

Sturz, A.V., Christie, B.R. & Matheson, B.G. 1998. Associations of bacterial endophyte populations from red clover and potato crops with potential for beneficial allelopathy. Canadian Journal of Microbiology, 44(2): 162–167.

Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widmer, T., Samuels, G.J., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb–Tshomb, E., Ndoumbe–Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D. & Hebbar, K.P. 2007. Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. Biological Control, 43: 202–212.

Ton, J., Pelt, J.A., Loon, L.C. & Pieterse, C.M. 2002. The Arabidopsis ISR1 locus is required for rhizobacteria-mediated induced systemic resistance against different pathogens. Plant Biology, 4(2): 224–227.

Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology, 36: 453–483.

Walker, J. 1973. *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. CMI Descriptions of Fungi and Bacteria. No: 381–383 .

Yedidia, I., Benhamou, N., Kapulnik, Y. & Chet, I. 2000. Induction and accumulation of PR proteins activityduring early stages of root colonizationby the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T 203. Plant Physiology and Biochemistry, 38: 863–873.

Yeidia, I., Srivastva, A., Kapulink, Y. & Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentration and increased growth of cucumber plants. Plant Soil, 235: 235–242.

www.SID.ir

Archive of SID

The role of wheat endophytic bacteria in the induction of resistance against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ubder greenhouse conditions

Mahnaz Gajari Mohammad Abadi, Gholam Khodakaramian, Doustmorad Zafari

Deptartment of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Corresponding author: Mahnaz Gajari Mohammad Abadi, email:Mahnazgajari88@yahoo.com

Received: Sept., 06, 2019 7(2) 63-76 Accepted: July, 29, 2020

Abstract

In this study the possibility of inducing resistance was tested using five endophytic bacterial strains against wheat take–all disease caused by the *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) under greenhouse conditions. The results showed that disease severity in treated plants compared to control samples decreased 56.6% and wheat resistance against the pathogen has been substantially increased. Effect of five endophytic bacterial strains including *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Bacillus pumilus* and *Streptomyces argenteolus* were studied on some enzymes related to plant resistance at the 0, 24, 48 and 168 hours after inoculation with *Ggt*. Results showed the highest levels of the β–1, 4–glucanase and chitinase at 48 and 168 hours after inoculating of pathogen. The level of β–1, 4–glucanase in plant samples inoculated with *Serratia marcescens* showed 0.0291 U/mg protein compared to c^+ (healthy control without endophytic bacteria and pathogen) with 0/0055 and cp (pathogen– infected control and untreated with endophytic bacteria) with 0/0075. The level of chitinase for plant samples inoculated with *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia marcescens* strains were 0.0056 and 0.0045 U/mg protein compared to c^+ (healthy control without endophytic bacteria and pathogen) with 0/0030 and cp (pathogen– infected control and untreated with endophytic bacteria) with 0/0031, respectively.

Keywords: biocontrol, chitinase, endophytic bacteria, take–all, β–1, 4–glucanase

www.SID.ir