مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره سوم (پیاپی ۴۰) پاییز ۱۳۹۸
صفحات ۲۹۳-۲۷۹

Original Article

تاثیر باکتری های اندوفیت برنج در کنترل *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* و الگوی بیان ژن *فنیل آلانین آمونیالیاز* در شرایط همزیستی با *باسیلوس سوبتیلیس*

حدیث یوسفی[۱]، نادر حسن زاده*[۲]، کیوان بهبودی[۳]، فرید بیکی فیروزجاهی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲]دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۳]دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. [۴]استادیار، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری بلایت باکتریایی برنج یکی از عوامل جدی محدود کننده تولید جهانی برنج است. موثرترین روش کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم هست. اما به دلیل تغییر پذیری زیاد و تکامل سریع نژادهای بیماریزا، این ارقام در شرایط مزرعه پایدار نیستند. این مطالعه با هدف ارزیابی توانایی باکتری های اندوفیت برنج در بهبود رشد گیاه و کنترل زیستی باکتری *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* انجام گردید.

مواد و روش‌ها: ابتدا غربالگری جدایه های اندوفیت برای فعالیت آنتاگونیستی روی باکتری *زانتوموناس* در محیط کشت تریپتیک سویا آگار انجام شد. سپس تحریک رشد گیاه توسط اندوفیت های باکتریایی تحت شرایط اتاقک رشد و گلخانه تعیین گردید. همچنین اثر جدایه ها بر شاخص شدت بیماری و برخی عوامل رشد برنج در شرایط گلخانه مشخص گردید. در نهایت میزان بیان ژن *فنیل آلانین آمونیالیاز* توسط جدایه اندوفیت *باسیلوس سوبتیلیس* با روش real-time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: از نظر شاخص قدرت گیاهچه بذرهای برنج، جدایه های OS40، OS23، OS43 و OS31 اثرات آماری معنی داری نسبت به شاهد داشتند. همچنین کاربرد اندوفیت های OS3، OS23، OS31 و OS40 موجب افزایش شاخص های رشد گردید. تلقیح جدایه های باکتریایی OS40 و OS23 در کاهش شدت بیماری و تحریک رشد گیاه موفق تر عمل کردند. سطح بیان ژن *PAL* در دوره آزمون در گیاهان تیمار OS40 به طور معنی داری بیشتر و سریع تر از گیاهان تیمار *زانتوموناس* به تنهایی بود.

نتیجه گیری: باکتری های اندوفیت برنج توانستند رشد گیاهان را افزایش و بیماری بلایت را کاهش دهند پس می توانند به عنوان راهکاری امید بخش و سازگار با محیط زیست در توسعه کشاورزی پایدار در نظر گرفته شوند.

واژگان کلیدی: باکتری های اندوفیت برنج، *باسیلوس سوبتیلیس*، بهبود رشد گیاه، مقاومت القایی.

دریافت مقاله: تیر ماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: مرداد ماه ۹۸

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه گیاهپزشکی
تلفن: ۰۹۱۲۱۴۸۳۷۱۴ پست الکترونیک: hasanzadehr@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهمترین و قدیمی‌ترین محصولات زراعی در دنیا به ویژه در آسیا است که سطح وسیعی از زمین های قابل کشت در جهان را به خود اختصاص داده است و غذای بیش از نیمی از مردم دنیا را تشکیل می دهد (۱). بیماری بلایت باکتریایی برنج با عامل *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) یکی از عوامل جدی محدود کننده تولید جهانی برنج است که در شرایط طبیعی ۱۰ تا ۲۰ درصد و در حالت اپیدمی ۵۰ تا ۷۰ درصد خسارت به محصول وارد می سازد. *زانتوموناس اریزا پاتووار اریزی* به طور معمول از طریق هیداتودها در نوک برگ ها و حاشیه آنها وارد برگ برنج می شود (۲).

باد و باران، باکتری ها را از گیاهان برنج آلوده و میزبان های دیگر به خوبی سبوس برنج آلوده محصول فصل های قبلی، که مهم ترین منابع اولیه هستند، پخش می کنند. اپیدمی شدید اغلب پس از طوفان، بادهای تند و باران های شدیدی که سبب زخم شدن گیاهان برنج و به دنبال آن پخش باکتری ها می شوند، رخ می دهد. باکتری ها ممکن است در آب آبیاری همچنین توسط انسان ها، حشرات و پرندگان انتشار یابند (۲).

اقتصادی ترین و موثرترین روش کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم هست (۳). با این حال، این ارقام در شرایط مزرعه به دلیل تغییر پذیری بالای پاتوژن و تکامل سریع سویه های بیماریزای آن، پایدار نیستند. در زمینه تولید ارقام برنج با سطح بالایی از مقاومت دائمی نیز پیشرفت های کمی صورت گرفته است.

باکتری ها در روی ریشه ها و در ریزوسفر از ترشحات ریشه گیاهان سود می برند، اما برخی از باکتری ها و قارچ ها قادر به وارد شدن به گیاه به عنوان اندوفیت هایی هستند که سبب آسیب نمی شوند و می توانند یک ارتباط متقابل ایجاد کنند (۴-۷). این تسخیرکنندگان موضعی و سیستمیک بافت های داخلی درون ریشه ها، ساقه ها، برگ ها، بذور، میوه ها، غده ها، تخمک ها و همچنین درون گره های لگوم ها یافت شده اند (۴ و ۸).

اندوفیت ها را می توان از سطح استریل یا بخش های درونی گیاهان جداسازی کرد (۴). در بیشتر گیاهان، ریشه ها در مقایسه با بقیه قسمت های گیاه تعداد بیشتری اندوفیت دارند (۹) و بیشترین مکان های معمول برای آنها فضاهای بین سلولی و وسل های زایلم هستند (۱۰).

گزارش های متعدد نشان داده اند که میکروارگانیسم های اندوفیت می توانند ظرفیت کنترل عوامل بیماریزای گیاهی (۱۳-۱۱)، حشرات (۱۴) و نماتدها (۴ و ۱۵) را داشته باشند. در بعضی موارد آنها همچنین می توانند سبب تسریع ظهور گیاهچه، بهبود استقرار گیاه در شرایط نامساعد و افزایش رشد گیاهان شوند (۱۶). به طور مثال تیمار بذر یا گیاهچه با *باسیلوس پومیلوس* سویه INR7 (*B. pumilus*) که از ضدعفونی سطحی ساقه خیار جدا شده بود، موجب کاهش شایان توجهی شدت لکه زاویه ای برگ، پژمردگی خیار و آلودگی سوسک های خیار در گیاهان خیار شد. مایه زنی با INR7 همچنین در برابر بیماری های ناشی از *ویروس موزاییک خیار* (*CMV*)، *اسکلروتیوم رولفسئی* (*Sclrotium rolfsii*)، *رالستونیا سولانیشیروم* (*Ralstonia solanacearum*)، *ریزوکتونیا سولانی* (*Rhizoctonia solani*) در فلفل و گوجه فرنگی موثر است (۱۹-۱۷).

در واقع اندوفیت ها بعد از ورود به درون گیاه و بدنبال آن برقراری تعامل نزدیکتر با میزبان از طریق افزایش دسترسی به مواد غذایی مانند ازت، فسفر و آهن یا با القای مکانیسم های دفاعی گیاه، تولید مواد ضد پاتوژن و یا رقابت برای کلونیزه کردن مکان ها و مواد غذایی سبب سرکوب پاتوژن ها می شوند و بدین ترتیب به طور بالقوه بر سلامت و حفاظت گیاه تاثیر می گذارند (۲۰). به همین دلیل هدف این بررسی نیز ارزیابی اثر بیوکنترلی احتمالی باکتری های اندوفیت جداسازی شده از برنج در شمال ایران در برابر *زانتوموناس اریزا پاتووار اریزا* عامل بیماری بلایت باکتریایی برنج می باشد. همچنین نقش باکتری اندوفیت *باسیلوس سوبتیلیس* در القای مقاومت علیه بیماری با ارزیابی میزان بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز توسط تکنیک RT-PCR real time مشخص گردید.

مواد و روش ها

الف) جداسازی باکتری های اندوفیت از گیاهان برنج: نمونه های گیاهان کامل برنج از ارقام رایج در مناطق عمده کشت برنج در شمال ایران جمع آوری شدند. سپس بعد از شستشوی نمونه ها با آب به منظور جدا کردن ذرات خاک متصل به سطح ریشه ها، در مرحله بعد نمونه ها با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و الکل ۷۰٪ به مدت یک دقیقه به طور سطحی ضدعفونی شدند و سپس ٤ مرتبه با بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۲ مولار (pH ۷) آبکشی شدند. برای اطمینان از موثر بودن روش ضدعفونی استفاده شده، ۰/۱ میلی لیتر از بافر شستشوی نهایی هر نمونه به ۹/۹ میلی لیتر تریپتیک سویا آگار(TSA) به عنوان شاهد منتقل شد، بگونه ای که اگر در نمونه های شاهد ظرف ٤۸ ساعت رشد تشخیص داده می شد، آن نمونه ها دور ریخته می شدند. سپس نمونه های ریشه، ساقه و برگ با کمک یک تیغ استریل به قطعات کوچکتر ۲ تا ۳ سانتیمتری تقسیم شدند و یک گرم از بافت نمونه انتخاب شده در ۹/۹ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم در هاون استریل ساییده شد. محلول به دست آمده پس از اینکه به طور سریالی در بافر پتاسیم رقیق شد، بر روی محیط TSA در پتری کشت شدند. در مرحله آخر کلنی های منحصر بفرد و غالب به پلیت های TSA تازه به عنوان کشت خالص منتقل شدند (۲۱).

ب) بررسی ویژگی های آنتاگونیستی جدایه های اندوفیتی علیه زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی در شرایط آزمایشگاه: برای این منظور از باکتری *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* سویه (MT) استفاده شد. از کشت ۲٤ تا ٤۸ ساعته این سویه روی محیط کشت TSA (مرک آلمان)، سوسپانسیونی در آب مقطر استریل تهیه و جذب نوری آن در طول موج۶۰۰ nm، برابر ۱ واحد تعیین گردید. جدایه های با کلنی های غیر زرد رنگ به همراه باکتری های فلورسنت مثبت، واکنش حساسیت شدید(HR) منفی نیز به صورت نقطه ای روی محیط کشت TSA (مرک آلمان)، کشت و سه روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انکوبه شدند، سپس سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبا $۱۰^{۹}$cfu/ml باکتری *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* به طور یکنواخت بر روی سطح پتری ها پاشیده شد. پتری ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ تا ۵ روز، نگهداری شدند و اثرات متقابل باکتری ها بر روی هم به صورت اندازه گیری میانگین قطر هاله بازدارندگی در آنها و در قالب یک طرح کامل تصادفی با سه تکرار بررسی شد.

ج) فعالیت تحریک رشد گیاه: این آزمون طبق روش استاندارد رول تاول (roll towel) انجام شد (۲۲). بدین ترتیب که ابتدا ۲۰ عدد بذر ضد عفونی شده با غلظت ۳×۱۰^{۸}cfu/ml جدایه ها مایه زنی شدند. سپس بین دو لایه دستمال کاغذی مرطوب قرار داده شده و بذرها کمی فشرده شدند سپس دستمال های کاغذی حاوی بذرها، درون کیسه های پلاستیکی جداگانه ای قرار گرفتند. کیسه های پلاستیکی لوله شدند و در اتاقک رشد به مدت ١٤ روز نگهداری شدند. سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. درصد جوانه زنی بذر، میانگین طول ریشه و اندام هوایی هر گیاهچه به تنهایی و قدرت گیاهچه ها شاخص های ارزیابی فعالیت تحریک کنندگی رشد جدایه ها بودند. برای محاسبه قدرت جوانه زنی گیاهچه از روش زیر استفاده گردید (۲۳).

شاخص قدرت گیاهچه = درصد جوانه زنی بذر × طول گیاهچه

طول گیاهچه= (طول ساقه + طول ریشه)

د) ارزیابی اثر بهبود رشد برنج توسط جدایه های اندوفیت در شرایط گلخانه: برای ارزیابی فعالیت بهبود دهندگی رشد، بذرهای تیمار شده با سوسپانسیون تازه از جدایه های آنتاگونیست (۳×۱۰^{۸} cfu/ml) همراه با بذرهای شاهد بدون تیمار به طور جداگانه در گلدان های پر شده، با خاک و ماسه استریل در حجم مساوی کاشته شدند. گلدان ها هر روز آبیاری می شدند و هر گلدان یک بار در هفته نیز ۲۵ میلی لیتر از محلول هوگلند (V / V) ۳/۱ دریافت کرد. در ۳۰ روز پس از کاشت، فعالیت های ترویجی رشد گیاه مانند ارتفاع گیاه، وزن تازه ریشه و اندام های هوایی گیاه اندازه گیری شد. هر تیمار شامل چهار تکرار بود (۲٤).

ه) بررسی اثر باکتری های اندوفیت آنتاگونیست در مقابل زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی در شرایط گلخانه: بذرهای

برنج بعد از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۳۰ ثانیه، ٤٨ ساعت در آب مقطر استریل نگهداری شدند. پس از این مدت آب اضافی بذرها گرفته شده و در سایه به مدت نیم ساعت خشک شدند. سپس ٦ بذر در هر گلدان حاوی خاک استریل کاشته شد. سوسپانسیون سلولی باکتری های آنتاگونیست انتخاب شده، در زمان کاشت در گلخانه استفاده شد (۲۵). گیاهان یک ماهه با سوسپانسیون 10^8cfu/ml باکتری *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* به روش بریدن برگ مایه زنی شدند (۲٦). این آزمون در قالب یک طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام گردید و گیاهان شاهد نیز با آب مقطر استریل مایه زنی شدند. طول زخم روی برگ های هر گیاه بطور جداگانه تا ٤٥ روز بعد از مایه زنی با پاتوژن بر اساس یک مقیاس ۵ درجه ای، اندازه گیری شد که مقیاس ۰; عدم وجود بیماری طول زخم کمتر از ۰/۲cm، ۱; ۰/۱–۲/۵ cm، ۳; ۳cm– ۱/۵، ۵ cm; ۳–۵، ۷; ۵–۱۰cm، ۹; بالای ۱۰cm می باشد. شاخص بیماری بر حسب درصد نیز از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۷).

$$\text{Disease index (\%)} = \{(1\times N_1 + 3\times N_3 + 5\times N_5 + 7\times N_7 + 9\times N_9) / 9Nt\} \times 100$$

که در این فرمول، $N_{1\sim9}$ تعداد درجه شاخص برگ ها و N_t، تعداد کل برگ های مورد بررسی می باشد. در این آزمون عوامل رشدی مانند وزن تازه ریشه و اندام های هوایی گیاه نیز اندازه گیری شدند.

و) استخراج DNA: به منظور استخراج DNA جدایه از روش جوشاندن (Boiling) استفاده شد. بدین منظور یک کلنی خالص باکتری در ۵ml محیط نوترینت براث (NB)، کشت و پس از ۲۰ ساعت نگهداری در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس، ۱ml از سوسپانسیون باکتری در لوله های اپندورف ریخته شد و در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس مایع روماند تخلیه و رسوب با ۳۰۰µl، ۰/۱N NaOH و ۱۰µl، ۰/۵٪ SDS به خوبی مخلوط گردید (۲۸). محلول حاصل به مدت ۱۰ –۱۳ دقیقه در بن ماری جوش قرار گرفت. در مرحله بعد بلافاصله به مدت ۱ دقیقه روی یخ و در مرحله آخر نیز ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول روماند به منظورانجام PCR به لوله های جدید منتقل شد.

ز) روش PCR : به منظور تکثیر DNA استخراج شده، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵µl به ترتیب زیر انجام شد: ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۲/۵ mM) (Bio-Rad)، یک میکرولیتر آغازگر P1 با غلظت ۱۰ پیکومول (5’-CGGGATCCAGAGTTTGATCC -3’ TGGTCAGAACGAACGCT)، یک میکرولیتر آغازگر P6 با غلظت ۱۰ پیکومول (5'-CGGGATCCTACGGCTAC -3' CTTGTTACGACTTCACCCC)، (۲۹) ، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA پلی مراز، ۲ میکرولیتر DNA نمونه و ۷/۱٦ میکرولیتر آب مقطر دوبار استریل. PCR در دستگاه ترموسایکلر و در ۳۰ سیکل طبق برنامه زیر انجام شد:

چرخه حرارتی با واسرشته سازی اولیه DNA در°C ۹٤ به مدت ۱ دقیقه، اتصال پرایمرها در°C ۵۲ به مدت ۱ دقیقه، مرحله طویل شدن رشته هدف در °C ۷۲ به مدت ۳ دقیقه و در نهایت یک چرخه طویل شدن نهایی در °C ۷۲ به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد.

ح) تأثیر باکتری اندوفیت در القای سیستمیک ژن های دفاعی در برگ های برنج بر علیه زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی: در این تحقیق پس از جداسازی اندوفیت ها از برنج و انجام آزمون غربالگری اولیه آنتاگونیست ها و بررسی اثر آنها در بهبود رشد گیاه و کنترل بیماری، نهایتا جدایه OS40 به عنوان جدایه انتخابی برای بررسی های مولکولی استفاده شد.

ط) کنترل بلایت باکتریایی در برنج با جدایه OS40: جدایه OS40 مقاوم به کلرامفنیکل با غلظت نهایی 10^7 cfu /ml در زمان کاشت در خاک استریل در گلخانه بکار رفت. دو تیمار شامل تیمار شاهد و OS40 با ٤ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. گیاهان بعد از مایه زنی با *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* به روش بریدن برگ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و یک دوره نوری ۱۲ ساعت نگهداری می شدند و دو بار در هفته با آب استریل آبیاری شدند. برای ارزیابی بیماری، توسعه زخم روی برگ ها تا یک ماه پس از مایه زنی ثبت شد (۲۷).

ی) تعیین جمعیت باکتری OS40: تراکم جمعیت جدایه مفید معرفی شده، درون گیاهان بررسی شد. سوسپانسیون سلولی اندوفیت (۵۰ میلی لیتر) به خاک (۵۰۰ گرم) گلدان های حاوی گیاهچه های برنج به روش خیساندن خاک اضافه شد. قطعات ریشه و ساقه (چند سانتی متر بالاتر از پایه ساقه) در زمان های ۰ و ۱٤ روز بعد از مایه زنی برای اندازه گیری جمعیت جمع آوری شد. نمونه ها به مدت ۳۰ ثانیه توسط ۷۰٪ اتانول به طور سطحی ضدعفونی شدند و سپس چند بار با آب مقطر شسته شدند. نمونه های استریل شده در محلول بافر (۱۰ میلی مولار MgSO4) خرد شدند و محلول به دست آمده به طور مناسب قبل از پخش بر روی کینگ بی آگار (KB) حاوی ٤۰ میلی گرم در لیتر کلرامفنیکل رقیق شدند. پتری ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گرماگذاری، تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلنی به عنوان cfu/g وزن تازه گیاه مشخص شدند.

ک) کشت برنج و تیمار اندوفیت: بذرهای برنج رقم هاشمی از معاونت تحقیقات برنج کشور آمل تهیه شدند. بذرها بعد از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلرید سدیم ۲٪، روی کاغذ صافی مرطوبی در پتری استریل قرار داده شدند در این شرایط رطوبت نسبی نزدیک ۹۵٪ فراهم گردید و به مدت ٤ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند تا بذرها جوانه بزنند. تعداد ۸ تا ۱۰ بذر جوانه زده در گلدان های پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتی متر با خاک و ماسه استریل در حجم مساوی قرار داده شدند. گیاهچه ها در شرایط گلخانه با محدوده دمایی ۲۵–۲۰ درجه سلسیوس و دوره تناوبی ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در شرایط غرقابی نگهداری شدند. آبیاری با محلول هوگلند (حاوی KH_2PO_4 به میزان ۵ میلی لیتر در یک لیتر محلول) هر دو روز یکبار صورت گرفت. تیمارهای آزمایش شامل شاهد (Co^-) بدون مایه زنی با پاتوژن، گیاهان مایه زنی شده با *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* (Xoo) و برنج های تیمار شده با *باسیلوس سوبتیلیس* (BOS40) بودند. برای مایه زنی از گیاهچه های همسن در مرحله ۵ برگی استفاده شد.

ل) آماده کردن پیش کشت میکروبی: پیش کشت جدایه باکتریایی OS40 (*باسیلوس سوبتیلیس*) از کشت ۲٤ ساعته باکتری در محیط NA و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به دست آمد. سلول های باکتریایی تراشیده شده از سطح محیط کشت در سولفات منیزیم ۱۰ میلی مولار، به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند و دوباره در سولفات منیزیم ۱۰ میلی مولار سوسپانسیون شدند. برای آزمون غلظت سوسپانسیون 10^7cfu /ml به کار رفت. برای تهیه پیش کشت جدایه *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* نیز از کشت ٤۸ ساعته باکتری روی محیط کشت NA در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سوسپانسیونی در آب مقطر استریل با غلظت 10^9cfu /ml به دست آمد.

م) مایه زنی گیاهان: گیاهان برنج هشت هفته پس از کاشت، با *باسیلوس سوبتیلیس* (10^7cfu /ml) به مدت سه روز قبل از چالش با پاتوژن، به روش خیساندن خاک مایه زنی شدند. برای مایه زنی با *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* (10^9 cfu /ml) نیز از روش بریدن برگ استفاده شد (۳۰).

ن) بررسی بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز در برنج: برای ارزیابی بیان ژن PAL، در ۰، ۲٤، ٤۸، ۷۲ و ۹٦ ساعت پس از مایه زنی، نمونه های برگ برنج در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان لازم در دمای ۸۰– درجه سلسیوس نگهداری شدند. RNA به صورت جداگانه از نمونه های سه تکرار هر تیمار استخراج شد. نمونه ها با نیتروژن مایع در هاون خرد شده و RNA کل با استفاده از واکنشگر ترایزول (Invitrogen) استخراج گردید. برای استخراج RNA ابتدا به ۱۰۰ میلی گرم بافت گیاهی خرد شده یک میلی لیتر ترایزول اضافه و بعد از ۱۰ ثانیه مخلوط شدن در دمای اتاق به مدت ده دقیقه قرار داده شد. به مخلوط حاصل ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه و ۵ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. سپس با ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. لایه روماند به لوله های جدید منتقل و با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر ایزو پروپانول سرد به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰– درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از سانتریفیوژ با ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در

دمای ٤ درجه سلسیوس، رسوب حاصل با یک میلی لیتر اتانل ۷۵٪ شسته شد. پس از سانتریفیوژ با rpm ۱۲۰۰۰به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس، پلاک RNA در آب مقطر استریل فاقد RNase حل شد. کیفیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد مشخص و غلظت RNA استخراج شده نیز با روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. برای حذف آلودگی های DNA از RNA استخراج شده، به ۳ میکروگرم ازRNA استخراج شده، ۳ میکرولیتر بافر ×۱۰ (Ambion turbo DNase free buffer) و ۷۵/۰ میکرولیتر آنزیم DNase (Ambion) اضافه شد و حجم نهایی با اضافه کردن آب مقطر میلی کیو به ۳۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس این ترکیب به مدت ٤۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از این مرحله مجددا ۰/۷۵ میکرولیتر آنزیم به ترکیب اضافه و ٤۵ دقیقه دیگر در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از آن، ٦ میکرولیتر محلول متوقف کننده (Ambion) به ترکیب اضافه و پس از ۲ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۵/۱ دقیقه سانتریفیوژ شد. RNA بدون DNA به لوله های جدید منتقل گردید. برای ساخت cDNA، یک میکروگرم RNA بدون DNA را با یک میکرولیتر پرایمرهای oligo-dT(Invitrogen, Breda, the Netherlands) و random hexamer مخلوط و در دمای ٦۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. نمونه ها بلافاصله در یخ گذاشته شدند. سپس به هر نمونه٤ میکرولیتر بافر ×5 (Fermentas, 5X RT buffer)، دو میکرولیتر dNTPs 10 mM و یک میکرولیتر آنزیم (Fermentas, SuperScript Reverse Transcriptase) اضافه و به آرامی مخلوط شدند. نمونه ها در بن ماری ٤۲ درجه سلسیوس به مدت ۷۵ دقیقه قرار داده شدند تا سنتز cDNA انجام شود. پس از این مدت جهت متوقف کردن سنتز cDNA، نمونه ها به مدت ۱۰ دقیقه به بن ماری ۷۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. در پایان برای تعیین کیفیت cDNA سنتز شده با پرایمرهای اختصاصی ژن اکتین یک واکنش PCR انجام شد (۳۱).

س) Quantitative real time PCR (qPCR): در این بررسی بیان ژن کد کننده آنزیم *فنیل آلانین آمونیالیاز* (*PAL*) برای هر تیمار مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). آغازگرهای اختصاصی ژن *PAL* (۳۲) توسط شرکت ماکروژن، کره جنوبی ساخته شدند.

جدول ۱: نام ژن و توالی آغازگر های واکنش Real - time PCR.

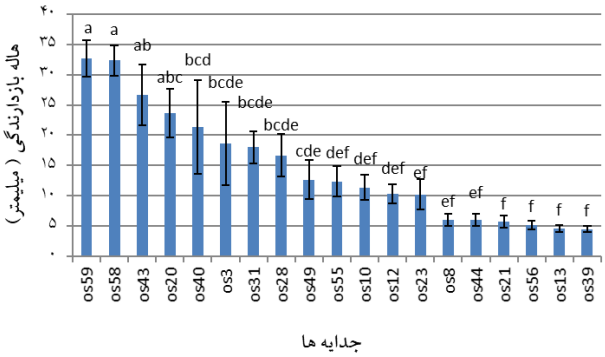
نام ژن	توالی آغازگر	شماره دسترسی	طول قطعه
PAL	F: 5′ -TTCCCGCTCTACCGCTTCGT -3′ R: 5′ -GCTCGCCGTTCCACTCCTTG -3′	EF576408	۱٦۳
Actin	F: 5′ -ACCCAAAGGCTAACAGAGAG-3′ R: 5′ -ACACCATCACCAGAATCAAG-3′	AB047313	۱۷۳

واکنش PCR در پلیت های ۹٦ چاهکی (۲۰µl در هر چاهک) و در سه تکرار انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر cDNA رقیق شده، ۱۰میکرولیتر SYBR®Green mix (AB Applied Biosystems, Foster, CA) و ۸ میکرولیتر مخلوط پرایمرها (Biolegio 1 pmol) بود. بررسی سطح بیان ژن مورد مطالعه در زمان های مختلف در تیمارها با استفاده از تکنیک Quantitative real time PCR و دستگاه iCycler Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories INC., USA)، طبق برنامه مرحله Hot-Start activation در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱٤ ثانیه و سپس با ٤۰ سیکل در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. داده های حاصل با نرم افزار SAS 92.1 آنالیز شدند. نرمال کردن داده ها با استفاده از بیان ژن متداول برنج، اکتین(*ACTIN*) انجام گرفت و در نهایت برای محاسبه میزان بیان نسبی ژن های دفاعی از ژن *ACTIN* به عنوان ژن مرجع و از فرمول $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ استفاده گردید (۳۳).

ع) آنالیز آماری داده ها: داده ها به صورت جداگانه با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تفاوت آماری میانگین ها با آزمون چند دامنه ای دانکن و با استفاده از SAS (version 92.1) مشخص گردید.

یافته‌ها

الف) جداسازی باکتری های اندوفیت: تعداد ۳۱ باکتری



شکل ۱: پتانسیل آنتاگونیستی ۱۹ باکتری اندوفیت در مقابل *زانتوموناس اریـزا پاتووار اریزا*. ستون ها با حروف آماری متفاوت نشان دهنده وجود اخـتـلاف معنی دار بین تیمارها (با ۳ تکرار) با آزمون دانکن در سطح ۵٪ است.

اندوفیت فلورسنت HR منفی و با کلنی سفید رنگ از بافت های داخلی گیاهان برنج جمع آوری شده از مناطق مختلف شمال ایران جداسازی و برای انجام آزمون بعدی انتخاب شدند.

ب) غربالگری برای فعالیت آنتاگونیستی در مقابل زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی در شرایط آزمایشگاه: در غربالگری اولیه فعالیت آنتاگونیستی ۳۱ جدایه باکتریایی، ۱۹ جدایه بیشترین فعالیت آنتاگونیستی را در برابر پاتوژن نشان دادند. حداکثر فعالیت بازدارندگی برای OS59 با یک هاله بازدارندگی ۳۲/۶۷ میلیمتر ثبت شد، در حالیکه جدایه های OS58، OS43، OS20 و OS40 به ترتیب هاله های بازدارندگی۳۲/۳۳ میلی متر، ۲۶/۶۵ میلی متر، ۱۸ میلی متر و ۱۶/۷ میلی متر را ایجاد کردند (شکل ۱).

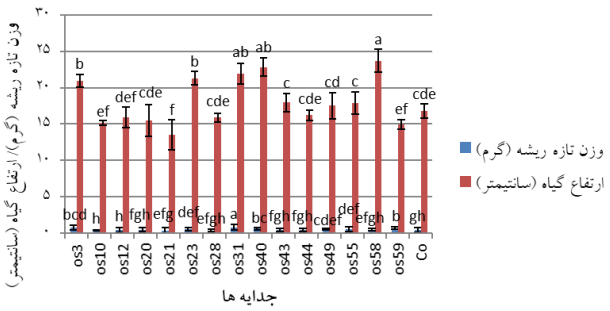
ج) جوانه زنی و شاخص قدرت گیاهچه بذرهای برنج مایه زنی شده با باکتری های اندوفیت: در مجموع ۱۵ جدایه، شامل OS3، OS10، OS12، OS20، OS21، OS23، OS28، OS31، OS40، OS43، OS44، OS49، OS55، OS58 و OS59 مورد بررسی قرار گرفتند. تیمار بذر با برخی از این جدایه ها بطور معنی داری باعث افزایش جوانه زنی بذر و قدرت گیاهچه نسبت به شاهد بدون تیمار شد. از این تعداد، ٤ جدایه OS40، OS23، OS43 و OS31 اثرات آماری معنی داری نسبت به شاهد داشتند (جدول ۲). آزمون های بیشتری برای ارزیابی پتانسیل آنها در بهبود رشد گیاه انجام شد.

د) تاثیر باکتری های اندوفیت بر تحریک رشد برنج در شرایط گلخانه: تحت شرایط گلخانه از ۱۵ جدایه مورد آزمون، ٦/۲٦

جدول ۲: فعالیت بهبود رشد گیاهی جدایه های باکتریایی اندوفیت بر روی برنج.

سویه ها	MRL (cm)		MSL (cm)		Germination (%)	VI*	
OS۳	۲/۷۲۵	±۰/۵۹۹^{bcd}	۵/۵۷۵	±۰/۵۱^{ef}	۱۰۰	۸/۱۶۳۳	±۰/٤٤۲۷۹^{fg}
OS۱۰	۲/۵۸۸۳	±۰/۱۳۲^{cde}	٤/٦۹۳۳	±۰/٤٤۷۸^{g}	۹٦	۷/۱۲۱٦	±۰/۹۹٦٦^{h}
OS۱۲	۲/۳۹۸۳	±۰/۲٦۳^{de}	۵/۷۸۱۷	±۰/٦۲۲^{cdef}	۹۸	۸/۰۱٤	±۰/۷۷٤۲^{fgh}
OS۲۰	۳/۱۲۳۳	±۰/۲۱۱^{b}	۵/٤۱۱۷	±۰/۲٤۸^{f}	۱۰۰	۷/۵۵۱۷	±۰/۲۲٤۹^{gh}
OS۲۱	۲/۱٦٦۷	±۰/٤۰٤^{de}	۳/۹۹۸۳	±۰/۲٦٦٤^{gh}	۱۰۰	٤/۹	±۰/۳٦^{i}
OS۲۳	٤/۱۸۸۳	±۰/۳۲٤^{a}	٦/٤۵	±۰/٤۷^{abcd}	۱۰۰	۱۱/۰۱۱۷	±۰/۷۷۳۲^{ab}
OS۲۸	۲/٤۰٦۷	±۰/۱^{de}	۳/۳٦٦۷	±۰/۲۱۳۸^{h}	۹٤	۵/٤۲٦۹	±۰/۲۰۷۹^{i}
OS۳۱	۲/۵۱۸۳	±۰/۱۱۷^{de}	٦/۱۷٦۷	±۰/۱۳۵۳^{abcde}	۱۰۰	۹/٦٤۱۷	±۰/۳۲۵۲^{bcd}
OS٤۰	٤/۳۱	±۰/۲۵۳^{a}	٦/۵۱۳۳	±۰/۵۸^{abc}	۱۰۰	۱۱/۲۸۳۳	±۰/۵۵۷^{a}
OS٤۳	٤/۰۰۸۳	±۰/۱۰۱^{a}	٦/۷۲٦۷	±۰/۳۹^{a}	۱۰۰	۱۰/۵۱	±۰/۳۷۸^{ab}
OS٤٤	۲/۰۲٦۷	±۰/۱۷۲^{e}	۳/٦۳۵	±۰/۲٦٦^{h}	۹٦	۵/٤۳۵۲	±۰/٤٤۵۸^{i}
OS٤۹	۲/۵٦۱۷	±۰/۱٦۲^{cde}	٦/۱۳۳۳	±۰/۲۵^{abcdef}	۱۰۰	۸/٦۵٦۷	±۰/۱۰٦۹^{def}
OS۵۵	۳/۰۷۳۳	±۰/۲٦۱^{bc}	٦/۵٦٦۷	±۰/۵۳^{ab}	۱۰۰	۹/۲۰۱۷	±۰/۲٦۷۵^{cde}
OS۵۸	۳/۸۲۳۳	±۰/۲٦۵^{a}	۵/۷۰۳۳	±۰/٤^{def}	۱۰۰	۷/۷۸۳۳	±۰/٤۲۵۲^{fgh}
OS۵۹	۲/۵٤٦۷	±۰/٤۰٤^{cde}	۵/۳۹۸۳	±۰/۳٤۹^{f}	۱۰۰	۸/۳٦۳۳	±۰/۹٤۱^{efg}
Co	۲/۰۲۳۳	±۰/۳۳۲^{e}	٤/۰۰۳۳	±۰/۲۱۰^{gh}	۱۰۰	۵/٦٤۷۸	±۰/٦٤۰۳^{i}

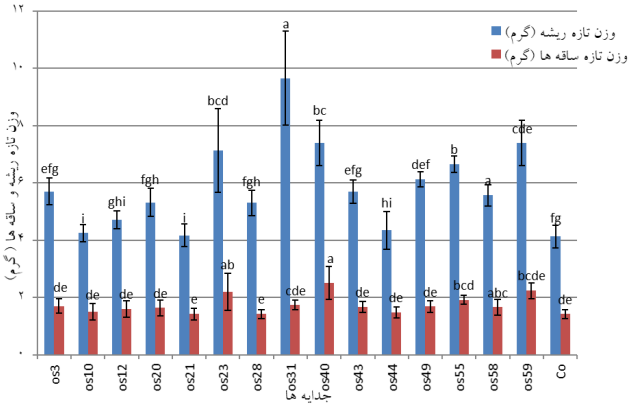
MRL=میانگین طول ریشه، MSL=میانگین طول ساقه، VI=شاخص قدرت گیاهچه. داده ها میانگین ۳ تکرار هستند. در هر ستون، میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح ۵٪ آزمون دانکن اختلاف معنی داری با هم ندارند



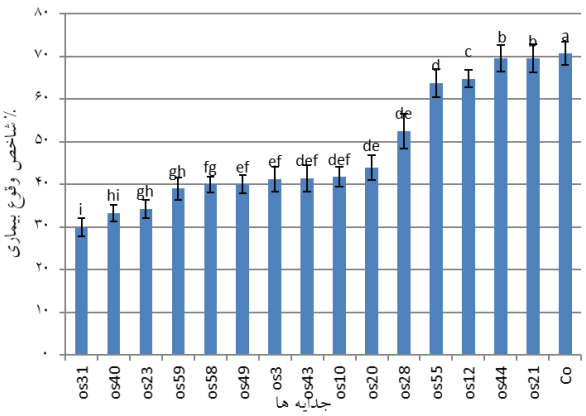
شکل ۲: اثر باکتری های اندوفیت بر بهبود رشد گیاهچه های برنج ۳۰ روز بعد از تیمار تحت شرایط گلخانه. داده ها میانگین چهار تکرار می باشند. در یک ستون، حروف آماری متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها با آزمون دانکن در سطح ۵٪ می باشد.

درصد از آنها باعث اختلاف معنی داری در عوامل رشد نسبت به گیاهان شاهد شدند. تیمار بذر با جدایه های OS3، OS23، OS31، OS40، OS58 و OS59 ارتفاع گیاهچه و وزن تازه را در مقایسه با شاهد افزایش داد. بالاترین ارتفاع ۲۳/۷، ۲۲/۸۱ و ۲۱۹ سانتی متر از بذرهای تیمار شده با جدایه های OS58، OS40 و OS31 بدست آمد. همچنین کاربرد جدایه های OS31 و OS59 سبب بالاترین وزن گیاهچه ها به ترتیب ۰/۸۰۶ و ۰/٦٦٦٢ گرم گردید (شکل ۲).

ه) بررسی اثر باکتری های اندوفیت آنتاگونیست علیه زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی در شرایط گلخانه: تعداد ۱۵ باکتری آنتاگونیست اندوفیت با فعالیت های بالقوه ارتقاء رشد



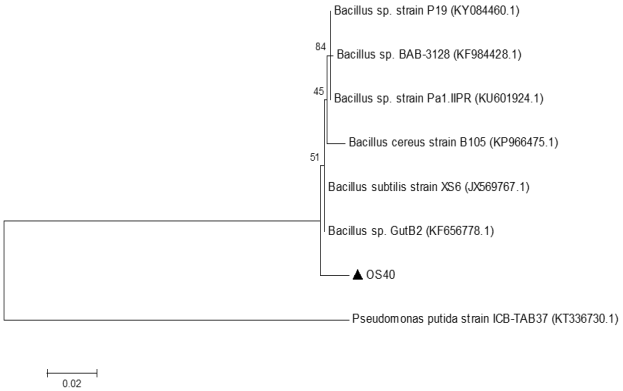
شکل ٤: فعالیت های مختلف تحریک کنندگی رشد گیاه توسط باکتری های اندوفیت تحت شرایط گلخانه و در حضور پاتوژن *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی*. داده ها میانگین ٤ تکرار می باشند. در یک ستون، حروف آماری متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها با آزمون دانکن در سطح ۵٪ می باشد.



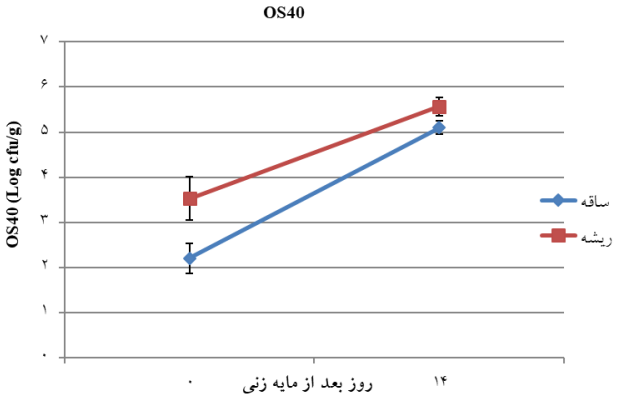
شکل ۳: کنترل بلایت باکتریایی برنج توسط باکتری های اندوفیت تحت شرایط گلخانه ٦٠ روز بعد از تیمار. داده ها میانگین ٤ تکرار می باشند. ستون ها با حروف آماری متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها با آزمون دانکن در سطح ۵٪ می باشد.

گیاه برای کنترل بیماری باکتریایی ٦٠ روز پس از تیمار بذرهای برنج با جدایه های اندوفیت مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است. میزان بروز بیماری در گیاهان با اینوکولنت باکتریایی OS40، ۳۳/۲۵٪ کاهش یافت (شکل۳). همچنین در حضور پاتوژن *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی*، وزن تازه ریشه و اندام های هوایی گیاهان مایه زنی شده با جدایه یادشده، افزایش شایان توجهی نسبت به تیمار شاهد نشان داد (شکل ٤) و این عملکرد این باکتری را به عنوان عامل بیوکنترل *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی*، عامل بلایت باکتریایی برنج مشخص می کند.

و) آزمون PCR برای شناسایی باکتری: برای شناسایی اندوفیت



شکل ۵: درخت فیلوژنی که موقعیت سویه جدا شده را بر اساس توالی 16S rRNA نشان می دهد. برای رسم درخت از روش neighbor-joining استفاده شده است. شماره های دسترسی در پرانتز آمده است.



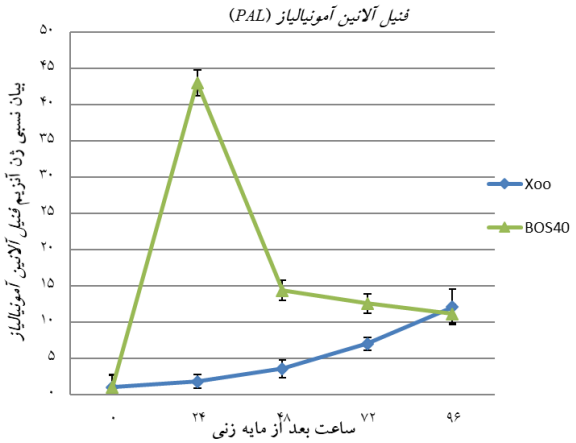
شکل ٦: استقرار اندوفیتی و تراکم جمعیت BOS40. غلظت باکتری (cfu /g) در ریشه و ساقه (چند سانتی متر از پایه) با استفاده از نمونه های جمع آوری شده در ۰ و ١٤ روز بعد از مایه زنی (DAI) با باکتری اندازه گیری شد.

آنتاگونیست کارآمد (OS40)، DNA استخراج شده از این جدایه با استفاده از پرایمرهای عمومی *16SrDNA* (P1 و P6) تکثیر شد و محصول با اندازه ۱۵۰۰ bp بدست آمد. نمونه های توالی به شرکت Macrogene Inc (سئول، کره جنوبی) ارسال شد. نتایج توالی ها با آنهایی که در بانک ژن NCBI موجود بودند مقایسه شد و مشخص گردید که جدایه OS40 با ٪۹۷ شباهت متعلق به *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*) می باشد (شکل ۵).

ز) القای مقاومت در برگ های برنج در مقابل زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی توسط باسیلوس سوبتیلیس: از بین باکتری های اندوفیت، جدایه (*باسیلوس سوبتیلیس*) OS40 بر اساس عملکرد خود در بهبود رشد گیاه و نیز کنترل *زانتوموناس اریزا پاتووار اریزا* در شرایط گلخانه، برای ارزیابی القای مقاومت سیستمیک در برنج استفاده شد.

ح) استقرار اندوفیتی باکتری OS40: استقرار (colonizationn) اندوفیتی برنج توسط *باسیلوس سوبتیلیس* (OS40) در صفر و ١٤ روز پس از مایه زنی باکتری در ریزوسفر مورد بررسی قرار گرفت. سویه *باسیلوس سوبتیلیس* (OS40) به تراکم جمعیت ۵/۵٦٦۳ و ۵/۱۰۰۳log cfu در هر گرم به ترتیب ریشه و ساقه در دو هفته بعد از مایه زنی باکتری رسید (شکل ٦).

ط) بیان ژن فنیل آلانین آمونیالیاز در برنج قبل و پس از مایه زنی با زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی: برای بررسی اثرات



شکل ۷: بیان نسبی ژن *PAL* در برگ های برنج رشد یافته در خاک تیمار شده با *باسیلوس سوبتیلیس* سویه OS40 (BOS40) در زمان های صفر، ٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦ ساعت بعد از مایه زنی برگ ها با *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* (*Xoo*). .

باسیلوس سوبتیلیس (OS40) بر بیان ژن های مربوط به دفاع در برنج، بیان ژن اصلی کد کننده *فنیل آلانین آمونیالیاز* (*PAL*) مورد بررسی قرار گرفت. سطوح بیان این ژن در یک بازه زمانی صفر تا ٩٦ ساعت پس از چالش مایه زنی با *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* تعیین شد.

سطح بیان ژن *PAL* در طول دوره آزمون به جز ٩٦ ساعت در گیاهان تیمار شده با *باسیلوس سوبتیلیس* (BOS40) به طور معنی داری بیشتر از گیاهان تیمار *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* به تنهایی (*Xoo*) بود، علاوه بر این، میزان بیان در گیاهان این تیمار سریع تر از گیاهان تیمار *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* بود. به طوری که در ٢٤ ساعت پس از مایه زنی (hpi) میزان بیان در گیاهان مایه زنی شده با BOS40 به ترتیب ۵٤٧/۲۳ برابر نسبت به گیاهان تیمار *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* بود. همچنین بیان نخست و اولیه *PAL* در BOS40 مشاهده شد، به طوری که تیمار باکتری اندوفیت سبب افزایش تنظیم *PAL* یا بیان بالای آن گردید (شکل ۷).

بحث

گیاهان برنج استان های مازندران و گیلان در سال های ١٣٩٤ و ١٣٩٥ در سه فصل برای باکتری های اندوفیت مفید مورد

بررسی قرار گرفتند. از مجموع جدایه های بدست آمده از قسمت های مختلف گیاهان، غربالگری ۳۱ جدایه برای فعالیت آنتاگونیستی در مقابل *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* در شرایط آزمایشگاه (*in vitro*)، تاثیر بر میزان جوانه زنی بذر، بهبود رشد گیاهچه و کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه انجام شد. در نهایت جدایه OS40 که توسط آنالیز توالی نوکلئوتیدی به عنوان *باسیلوس سوبتیلیس* (*B. subtilis*) شناسایی شد، توانست رشد گیاهان را افزایش و آلودگی *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* را تحت شرایط گلخانه کاهش دهد. با توجه به اطلاعات ما، این تحقیق اولین گزارش جداسازی اندوفیت ها از برنج در ایران می باشد.

تیمار بذر برنج با این آنتاگونیست سبب توقف بالای ۶۰٪ بیماری در گیاهان شد. چندین باکتری اندوفیت مانند *انتروباکتر* (*Enterobacter* sp. CNPSo 2480)، *باسیلوس* (*Bacillus* sp. CNPSo 2481)، *پنتوا آناناتیس*(*Pantoea ananatisa*)، *سودوموناس*(*Pseudomonas* sp. strain PsJN PsJN)، *آزوسپوریلیوم آمازوننس* (*A.amazonense*) و *برخولدریا* (*Burkholderia* sp.) موجب تحریک رشد و افزایش محصول در گیاهانی مانند ذرت، فلفل، انگور و نیشکر می شوند (۳۶-۳۴). علاوه بر این، گزارش شده است که باکتری های اندوفیت با مکانیزم های دیگر مانند رقابت برای جا و غذا، آنتی بیوزیس و القای مقاومت سیستمیک در گیاه، سبب کنترل بیولوژیکی پاتوژن های میزبان شان می شوند (۳۹-۳۷). به ویژه در برنج، جی (Ji) وهمکاران دریافتند که تیمار بذرهای برنج با اندوفیت های دی آزوتروف پنی *باسیلوس* (*Paenibacillus*) ، *میکروباکتریوم* (*Microbacterium*)، *باسیلوس* (*Bacillus*) و *کلبسیلا* (*Klebsiella*)، علاوه بر افزایش رشد گیاه سبب ایجاد مقاومت سیستمیک در برابر *فوزاریوم اگزیسپوروم* (*Fusarium oxysporum*) و *ریزوکتونیا سولانی* (*Rhizoctonia solani*) می شود (۳۹).

در مطالعه حاضر، به نظر می رسد *باسیلوس سوبتیلیس* به خوبی دیگر گونه های *باسیلوس* (*Bacillus* spp.) در برابر *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* عمل می کند، که نیاز هست بیشتر بررسی شود. استفاده از سویه های اندوفیتی *باسیلوس* به دست آمده از گوجه فرنگی و سیب زمینی با سورفکتنت پلیسیلیکون Silwet موجب کلونیزاسیون برگ های کاکائو (برای بیش از ۶۸ روز) و کاهش بیماری پوسیدگی سیاه غلاف کاکائو از راه القای مقاومت سیستمیک می شود (۴۰).

همه گیاهان مکانیسم های دفاعی فعال در برابر حملات پاتوژن ها دارند. اگر این مکانیسم های دفاعی توسط یک محرک قبل از آلودگی با یک پاتوژن گیاهی مهاجم فعال شوند، می تواند کاهش علایم بیماری را به دنبال داشته باشد. چنانچه یک پاتوژن گیاهی می تواند موجب تحریک مقاومت سیستمیک اکتسابی (SAR) شود، ریزوباکتری های غیر پاتوژن نیز می توانند یک پاسخ مقاومت سیستمیک القا شده (ISR) مشابه از نظر فنوتیپی را در گیاه میزبان تحریک کنند. در این زمینه، برای بررسی اثرات مفید باکتری های اندوفیت در مقاومت به بیماری گیاهانی که با *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* مایه زنی می شوند، ما بیان ژن دفاعی برنج (*PAL*) را در پاسخ به تیمارهای *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* و جدایه اندوفیت باReal time PCR مورد بررسی قرار دادیم.

لیگنین و برخی از فیتوالکسین ها از طریق مسیر فنیل پروپانوئید تولید می شوند. اولین مرحله از این مسیر توسط *PAL* کاتالیز می شود که فنیل آلانین را به ترنس سینامیک اسید تبدیل می کند که پیش ماده لیگنین، سالیسیلیک اسید، برخی از رنگدانه ها مانند آنتوسیانیدین، تانن های تند و فیتوالکسین ها می باشد (۴۰). تحریک این آنزیم به عنوان بخشی از ISR به طور کلی بعد از آلودگی پاتوژن موثر است (۴۲).

پس از چالش مایه زنی با *زانتوموناس اریز D پاتووار اریزی*، بیان اولیه *PAL* در برگ های گیاهان برنج تیمار شده با *باسیلوس سوبتیلیس* مشاهده شد. مطالعه گاند (Gond) و همکاران نیز بیان ژن های مرتبط با بیماریزایی، به ویژه PR-1 و PR-4 را در ریشه های ذرت تیمار شده با باکتری اندوفیت *باسیلوس سوبتیلیس* سویه SG JW.03 ۲۴ ساعت پس از تیمار با *فوزاریوم مونیلیفورم* (*Fusarium moniliforme*) نشان داد. همچنین *باسیلوس اوریزیکولا* سویه YC7007

(*Bacillus oryzicola*)، یک باکتری اندوفیت جدید جدا شده از ریشه های برنج، علاوه بر افزایش رشد گیاه با تولید آنتی بیوتیک و القای مقاومت سیستمیک، می تواند سبب کنترل بیماری بلایت باکتریایی، بلایت خوشه و باکانه در برنج شود (۳۱ و ٤۳).

در واقع تیمار برنج با *باسیلوس سوبتیلیس* اندوفیت، یک فعال سازی سیستمیک واکنش های دفاعی وابسته به پاتوژن را پیشنهاد می کند. نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان می دهد که درک پاتوژن برای افزایش فعالیت و تنظیم ژن های دفاعی از جمله *PAL* در برنج ضروری است، اما بطور مشخصی این عمل بروی پیش تیمار گیاهان در سطح ریشه با باکتری اندوفیت افزایش می یابد.

نتیجه گیری

از آنجایی که سطح بیان *PAL* در گیاهان همزیست شده با باکتری اندوفیت نسبت به تیمار پاتوژن به تنهایی، سریع تر و به مقدار قابل توجهی بیشتر بود پس می تواند نشان دهنده نقش ژن *PAL* در تعامل برنج با باکتری *زانتوموناس اریزی پاتووار اریزی* و توانایی باکتری اندوفیت برای القای مقاومت در میزبان باشد. از سوی دیگر اندوفیت ها به دلیل تعامل سازنده با میزبان خود می توانند به عنوان مکمل استفاده از کودهای شیمیایی در تولید محصول و عوامل بیوکنترل سازگار با محیط زیست برای توسعه کشاورزی پایدار در نظر گرفته شوند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس زاهد به دلیل همکاری در اجرای این پژوهش کمال تشکر و سپاسگزاری را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Mousavi SH, Babaee Zad V, Sharifnabi B, Tajic Ghanbari MA, Massah A, Alavi SM. Induction of blast disease resistance in rice plants by endophyte fungus *Piriformospora indica*. Iran J Plant Path. 2014; 50(3): 127-129.
2. Ou SH. Rice Diseases. 2nd ed. Kew- Surrey- England. Common Wealth Mycological Institute; 1985.
3. Peng H, Chen ZH, Fang ZH, Zhou J, Xi ZH, Gao L, Chen L, Li L, Li T, Zhai W, Zhang W. Rice Xa21 primed genes and pathways that are critical for combating bacterial blight infection. Sci Rep. 2015; 5: 12165.
4. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kleopper W. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol. 1997; 43: 895-914.
5. Schulz B, Boyle C. What are endophytes? In: Schulz BJE, Boyle CJC, Sieber TN. (eds). Microbial Root Endophytes. Berlin Germany. Springer; 2006.
6. Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M, Wright L, Beckwith F, Kim YO, Redman RS. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. ISME J. 2008; 2(4): 404-416.

7. Rodriguez RJ, White JFJr, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. New Phytol. 2009; 182(2): 314-330.

8. Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Nowak J. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. Biol Fertil Soils. 1997; 25: 13-19.

9. Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. MPMI. 2006; 19(8): 827-837.

10. Reinhold-Hurek B, Hurek T. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: Identification, localization, and perspectives to study their function. Crit Rev Plant Sci. 1998; 17: 29-54.

11. Sturz AV, Matheson BG. Populations of endophytic bacteria which influence host-resistance to *Erwinia*-induced bacterial soft rot in potato tubers. Plant Soil. 1996; 184: 265-271.

12. Duijff B J, Gianinazzi-Pearson V, Lemanceau P. Involvement formed pea roots after challenge with *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* and *Pythium ultimum*. Phytopathol. 1997; 86: 114-178.

13. Krishnamurthy K, Gnanamanickam SS. Biological control of sheath blight of rice: induction of systemic resistance in rice by plant-associated *Pseudomonas* spp. Curr Sci.1997; 72: 331-334.

14. Azevedo JL, Maccheroni J Jr, Pereira O, Ara WL. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. Electr J Biotech. 2000; 3: 40-65.

15. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Rodr´ıguez-K´abana R, Kloepper JW. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. Soil Biol Biochem. 1998; 30: 925-937.

16. Chanway C.P. Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. Forest Sci. 1997; 43: 99-112.

17. Wei G, Kloepper JW, Tuzun S. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. Phytopathol. 1996; 86: 221-224.

18. Zehnder GW, Murphy JF, Sikora EJ, Kloepper JW. Application of rhizobacteria for induced resistance. Eur J Plant Pathol. 2001; 107: 39-50.

19. Murphy JF, Reddy M, Ryu CM, Kloepper JW, Li R. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against Cucumber mosaic virus. Phytopathol. 2003; 93: 1301-1307.

20. Firdous J, Bhore Subhash J. Screening of cultivable endophytic bacterial isolates for their plant growth promoting activity in rice. Indian J Agric Res. 2017; 51(5): 413-418.

21. McInroy JA, Kloepper JW. Population dynamics of endophytic bacteria in field- grown sweet corn and cotton. Can J Microbiol. 1995; 41: 895-901.

22. ISTA. Proceedings of the international Seed Testing Association, International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology. 1993; 21: 25-30.

23. Baki AAA, Anderson JD. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria. Crop Sci.

1973; 31: 630–633.

24. Chithrashree-Udayashankar AC, Chandra-Nayaka S, Reddy MS, Srinivas C. Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae pv. oryzae*. Biol Control. 2011; 59: 114-122.

25. Chung EJ, Hossain MT, Khan A, Kim KH, Jeon CO, Chung YR. *Bacillus oryzicola* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from the root of rice with anti-microbial, plant-growth promoting and systemic resistance-inducing activities in rice. Plant Pathol J. 2015; 31: 152-164.

26. Kauffman HE, Reddy APK, Hsieh SPY, Merca SD. An improved technique for evaluating resistance of rice varieties to *Xanthomonas oryzae*. Plant Dis Reporter. 1973; 57: 537-541.

27. Fang ZD, Xu ZG, Guo CJ, Yin SZ, Wu SZ, Xu XM, Zhang Q. Studies on pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in China. Acta Phytopathol Sin. 1990; 20: 81-88.

28. Elboutahiri N, Thami-Alami I, Zaïd E, M.Udupa S. Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sullae* by rep-PCR, RAPD and ARDRA analyses. Afr J Biotechnol. 2009; 8(6): 979-985.

29. Palacio-Bielsa A, Cambra MA, López MM. PCR detection and identification of plant pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). J Plant Pathol. 2009; 91(2): 249-297.

30. Hossain MT, Khan A, Chung EJ, Harun-Or Rashid Md, Chung YR. Biological control of rice bakanae by an endophytic *Bacillus oryzicola* YC7007. Plant Pathol J. 2016; 32(3): 228-241.

31. Alizadeh H, Salari KH. Induced resistance by β-amino butyric acid (BABA) against *Fusarium* stem and root of Cucumber. IJPPS. 2014; 45(2): 299-307.

32. SongA, Xue G, Cui P, Fan F, Liu H, YinCH, Sun W, Liang Y. The role of silicon in enhancing resistance to bacterial blight of hydroponic- and soil-cultured rice. Sci Rep. 2016; 6: 24640.

33. Yuan J, Reed A, Chen F, Stewart Jr CN. Statistical analysis of real time PCR data. MBC Bioanformatic. 2006; 7: 85.

34. Barka EA, Gognies S, Nowak J, Audran JC, Belarbi A. Inhibitory effect of endophytic bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grape vine growth. Biol Control. 2002; 24: 135-142.

35. Oliveira ALM, Canuto EL, Reis VM, Baldani JI. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. Braz J Microbiol. 2003; 34: 59-61.

36. Kang SH, Cho HS, Cheong H, Ryu CM, Kim JF, Park SH. Two bacterial endophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on Pepper (*Capsicum annuum* L.). J Microbiol Biotechnol. 2007; 17(1): 96-103.

37. Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* sub sp. *atroseptica*. Appl Environ

Microbiol. 2002; 68: 2261-2268.

38. Compant S, Duf yB, Nowak J, Cle´ment CH, Ait Bark E. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(9): 4951-4959.

39. Ji SH, Gururani MA, Chun SCh. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic diazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. Microbiol Res. 2014; 169: 83-98.

40. Melnick RL, Zidack NK, Bailey BA, Maximova SN, Guiltinan M, Backman PA. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. Biol Control. 2008; 46: 46-56.

41. Dixon RA, Achnine L, Kota P, Liu CJ, Reddy MSS, Wang LJ. The phenylpropanoid pathway and plant defence- A genomics perspective. Mol. Plant Pathol. 2002; 3: 371-390.

42. Van Loon LC, Bakker PAH M, Pieterse CMJ. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Ann Rev Phytopathol. 1998; 36: 453-483.

43. Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White Jr JF. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. Microbiol Res. 2015; 172: 79-87.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 3, September 2019

Original Article

The effect of rice endophyte bacteria on controlling *Xanthomonas oryzae* pv. Oryzae and expression of *phenylalanine ammonia-liase* gene in coexistence with *Bacillus subtilis*

Hadis Yousefi[1], Nader Hasanzadeh[2], Keivan Behboudi[3], Farid Beiki Firouzjahi[4]

[1]Ph.D. student, Department of Plant Pathology,Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [2]Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. [3]Associate Professor, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Iran.
[4]Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Rice bacterial blight is one of the major factors limiting global rice production. Though the most effective method for controlling this disease is using resistant varieties, they are not stable in farm conditions due to high variability and rapid evolution of pathogenic races. This study was aimed to evaluate rice endophyte bacteria's ability to improving plant growth and biologically controlling *Xanthomonas oryzae* pv. oryzae.

Materials & Methods: At the first screening of endophyte isolates was performed to evaluate antagonistic activity against *Xanthomonas* in tryptic soy agar medium. The stimulation of plant growth by bacterial endophytes was assessed under the growth chamber and greenhouse conditions. The effect of bacterial isolates on disease severity and some rice growth factors under greenhouse conditions were determined, as well. In the final stage, the expression of the Phenylalanine ammonia-lyase gene by endophytic isolate *Bacillus subtilis* was evaluated using real-time PCR.

Results: In terms of rice seed seedling vigor index, OS40, OS23, OS43, and OS31 isolates had a significant statistical effect as compared to control. Moreover, the use of OS3, OS23, OS31, and OS40 endophytes increased plant growth parameters. OS40 and OS23 bacterial inoculants were more successful in reducing the severity of the disease and the promotion of plant growth. PAL expression level during the experiment period was significantly higher and faster in plants treated with OS40than those treated only with *Xanthomonas*- isolates.

Conclusion: Rice bacterial endophytes could increase plant growth and reduce disease severity, thus they can be considered as a promising and environmentally- a friendly strategy for sustainable agriculture development.

Keywords: Endophytic bacteria, *Bacillus subtilis*, Plant growth promotion, Induced resistance.

Correspondence to: Nader Hasanzadeh

Tel: +98 9121483714

E-mail: hasanzadehr@yahoo.com

Journal of Microbial World 2019, 12(3): 279-293.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.