مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره اول (پیاپی ۳۰) بهار ۱۳۹۶
صفحات ۶۸-۵۹

Original Article

بازدارندگی باکتری های اپی فیت یونجه بر باکتری *کلاوی باکتر* عامل پژمردگی یونجه

میترا امیدی نسب*[1]، غلام خداکرمیان[2]

[1] کارشناس ارشد، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی، [2] استاد، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی.

چکیده

سابقه و هدف: به دلیل استفاده بی رویه از سموم شیمیایی و تاثیرات منفی آنها بر محیط زیست، امروزه روش های دیگری مانند استفاده از باکتری های اپی فیت و اندوفیت برای کنترل عوامل بیماری‌زا بسیار مورد توجه قرار گرفته است. از آنجایی که گیاه یونجه مهم ترین گیاه علوفه ای در ایران و بسیاری از نقاط جهان می باشد، این مطالعه با هدف ارزیابی میزان بازدارندگی برخی از باکتری های اپی فیت یونجه بر عامل پژمردگی یونجه در شرایط برون تن انجام شد.

مواد و روش‌ها: نمونه های برگ سالم یونجه پیش از گلدهی از مناطق مختلف استان همدان جمع آوری گردیدند. پس از جداسازی باکتری های اپی فیت از مزارع یونجه، تاثیر آنتاگونیستی جدایه‌ها با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد علیه باکتری عامل پژمردگی یونجه بررسی شد. برای پی بردن به الگوی باندهای پروتئینی و تنوع سویه ها، استخراج پروتئین از نمونه‌ها صورت گرفت. به منظور شناسایی جدایه ها از آزمون های بیوشیمیایی و روش PCR استفاده گردید.

یافته‌ها: در مجموع ۳۰ جدایه باکتریایی اپی فیت از اندام های هوایی گیاه یونجه جداسازی گردید. بر اساس آزمون های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مشخص گردید که این باکتری ها متعلق به جنس های *باسیلوس*، *سودوموناس* و *زانتوموناس* هستند. بیش ترین درصد بازدارندگی در مقابل پاتوژن مربوط به جدایه شماره ۱۶ و کمترین میزان مربوط به جدایه های ۱۳ و ٦ بود. به کمک روش مولکولی و دندروگرام حاصل، جدایه شماره ۱٦ بیش ترین نزدیکی را به *سودوموناس مونتی لئی* داشت.

نتیجه گیری: باکتری های اپی فیت جداسازی شده در این مطالعه قدرت بازدارندگی مناسبی علیه عامل پژمردگی یونجه در شرایط آزمایشگاهی داشتند. این یافته می تواند نوید بخش کنترل زیستی این بیماری باشد. با این وجود مطالعات بیشتر برای اثبات کارایی این جدایه‌ها با هدف کاربرد آن‌ها در شرایط مزرعه مورد نیاز می باشد.

واژگان کلیدی: فعالیت آنتاگونیستی، الکتروفورز پروتئین، پژمردگی باکتریایی.

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: مهرماه ۹۵

مقدمه

یونجه با نام علمی *Medicago sativa* مهم ترین گیاه علوفه ای در ایران و بسیاری از نقاط جهان است. این گیاه به دلیل بالا بودن ارزش غذایی و امکان کاشت در اقلیم های مختلف به ملکه نباتات علوفه ای مشهور است (۱). متوسط سطح زیر کشت یونجه در ۱۰ سال گذشته در ایران ٦۰۰ هزار هکتار بوده است. از این نظر ایران دارای رتبه هشتم جهان است. یونجه اولین گیاه زراعی است که به عنوان علوفه کشت شده است. خاستگاه یونجه منطقه شمال غرب ایران، منطقه آناتولی شمال ترکیه و منطقه قفقاز می باشد. سهم استان همدان از کل سطح زیر کشت یونجه کشور ۷/۷ درصد و از کل تولید حدود ۱۰ درصد می باشد. به گونه ای که رتبه سوم کشور را به خود اختصاص داده است. غالب کشت یونجه در

*) آدرس برای مکاتبه: همدان، دانشگاه بوعلی سینا، گروه گیاه پزشکی.
تلفن: ۰۹۱٦۹۵۵۹۲۲٤ پست الکترونیک: momidi68@yahoo.com

استان همدان از نوع رقم همدانی است. این رقم دارای شهرت ملی و جهانی می باشد و در برابر سرما مقاوم و ارتفاع آن بیش از سایر ارقام است (۲).

یکی از بیماری های مهم یونجه که باعث کاهش عملکرد و خسارت زیادی می شود، پژمردگی باکتریایی یونجه است. عامل این بیماری باکتری *کلاوی باکتر میچیگانسیس* (*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*) است. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۲۵ در ایالت های شمالی آمریکا، ایلینوی شمالی و ویسکانتین توسط کالوچ (Culloch) گزارش شد (۳). این باکتری دامنه میزبانی وسیعی در بین انواع گیاهان علوفه ای و گیاهان خانواده فاباسه دارد. بوته های آلوده به باکتری، دارای رنگ سبز مایل به زرد بوده و به راحتی از بوته های سالم قابل تشخیص هستند. این باکتری مانند اکثر باکتری های بیماری زای خاکزی، درون گیاه نوعی اگزوپلی ساکارید تولید می کند (٤).

این اگزوپلی ساکارید یک محیط اشباع از آب در اطراف باکتری ایجاد می نماید. به طوری که به عنوان یک حفاظ در برابر دهیدراتاسیون عمل می کند (۵). در برهم کنش عامل بیماری با سلول های گیاهی، اگزوپلی ساکاریدها با جلوگیری از فعالیت لکتین ها و آگلوتینین ها، از تشخیص عامل بیماری زا توسط سیستم دفاعی گیاه جلوگیری می کنند (٦). همچنین این اگزوپلی ساکارید ها در چسبیدن باکتری به سطوح زنده و غیر زنده کمک کرده و موجب پیشرفت آلودگی و تشکیل کلنی در گیاه میزبان می شوند. این امر برای پیشرفت و گسترش بیماری لازم است (۷ و ۸).

یکی از اجزای مهم و متنوع فلور میکروبی، باکتری های اپی فیت هستند که به وسیله گیاهان مختلف در مناطق مختلف مانند نواحی گرم و معتدل، گرمسیری و نیمه گرمسیری پناه داده می شوند. این باکتری ها قادر به زندگی در سطوح گیاهی هستند (۹). در مقایسه با آن هایی که به عنوان باکتری اندوفیت در نظر گرفته می شوند، باکتری های اپی فیت را می توان با شست شوی سطحی حذف نمود.

فهرستی از انواع مختلفی از باکتری های اپی فیت که همراه با برگ و ریشه و سطوح گیاهان هستند توسط کادو (Kado) ارایه شده است. بسیاری از اپی فیت های برگ، میله ای شکل، گرم منفی، رنگدانه دار و تخمیری هستند (۱ و ۹).

باکتری های اپی فیت حاضر در سطح برگ و یا اضافه شده به صورت محلول پاشی نقش مهمی در سرکوب باکتری های بیماری زای گیاهی و قارچی ایفا می کنند. برای مثال *اروینیا هربیکولا* (*Erwinia herbicola*) باکتری اپی فیت موجود در سطح برگ برنج بوده و موجب کاهش pH برگ برنج می شود. در نتیجه این باکتری موجب مهار رشد باکتری بیماری زا *زانتوموناس اوریزیه* (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) می گردد (۱۰).

تجربیات محققان در تحقیقات بیوکنترلی محدود به استفاده از اعمال تلقیح باکتریایی برای سرکوب می شود. از پاتوژن های مخرب شاخه و برگ برنج می توان به باکتری های *مگناپورت گریسه* (*Magnaporthe grisea*) (عامل بلاست برنج)، *ریزوکتونیا سولانی* (*Rhizoctonia solani*) (عامل سوختگی غلاف برنج) و *زانتوموناس اوریزه* (عامل بلایت باکتریایی) اشاره نمود (۱۱).

تولید انواع مختلف متابولیت ها توسط باکتری های اپی فیت، موجب سرکوب پاتوژن های برنج و یا افزایش رشد گیاه می شود. اثر متقابل گیاه و میکروب در راستای ارتقای توسعه و سلامت گیاه موضوعی مورد توجه بوده است. به نظر می رسد اپی فیت ها برای افزایش عملکرد محصولات، حذف آلاینده ها، مهار پاتوژن، تثبیت نیتروژن و یا مواد فرار امیدوار کننده باشند. چالش و هدف این است که ما قادر به مدیریت جوامع میکروبی به نفع استقرار گیاهی توسط باکتری های مفید باشیم. این امر می تواند زمانی که یک دانش و آگاهی بهتر در مورد اکولوژی آن ها و اثر متقابل مولکولی آن ها به دست آمده باشد، عملی گردد. از آن جایی که بیماری پژمردگی یونجه در همدان شیوع داشته و تاکنون بررسی جامعی در این مورد انجام نشده است، این مطالعه با هدف ارزیابی بازدارندگی باکتری های اپی فیت یونجه علیه باکتری *کلاوی باکتر*، عامل پژمردگی در شرایط *برون تن* انجام شد.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: نمونه برداری به صورت تصادفی با حرکت در قطر مزرعه و یا زیکزاکی صورت گرفت. در مجموع تعداد ٦٠ تا ٧٠ نمونه برگ تازه و سالم یونجه پیش از گلدهی از مناطق مختلف استان همدان (فامنین، بهار، امزاجرد، کبودرآهنگ، ملایر و نهاوند) جمع آوری گردید.

ب) جداسازی باکتری های اپی فیت: برای این کار حدود یک گرم برگ بدون ضدعفونی به ٥٠ میلی لیتر آب مقطر استریل حاوی یک درصد ژلاتین اضافه شد و به مدت ٣٠-٢٠ دقیقه مخلوط گردید. سوسپانسیون به دست آمده بر روی محیط نوترینت آگار (مرک، آلمان) حاوی یک گرم در لیتر عصاره مخمر استریک کشت داده شد. پس از رشد باکتری ها، از هر تیپ کلنی یک نمونه خالص سازی و نگهداری گردید.

ج) نمونه برداری باکتری عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه: درحین نمونه برداری برای جداسازی باکتری های اپی فیت، از نمونه های گیاهی مشکوک به آلودگی پژمردگی باکتریایی با علائم رنگ سبز مایل به زرد، کوتاهی قد و داشتن ساقه های جانبی فراوان، نیز به صورت تصادفی نمونه برداری شد.

د) جداسازی عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه: بوته های آلوده ابتدا با آب مقطر شسته شدند. پس از خشک شدن، بافت آلوده در آب مقطر استریل خرد شد و پس از ١٥-١٠ دقیقه سوسپانسیون حاصل بر روی محیط کشت نوترینت آگار حاوی یک گرم در لیتر عصاره مخمر کشت داده شد. نمونه ها برای رشد به انکوباتور انتقال داده شدند. پس از چند روز کلنی های باکتری بیماری زا به رنگ زرد مایل به نارنجی جداسازی شدند.

ه) تلقیح باکتری به میزبان گیاهی (آزمون بیماری زایی): بذر یونجه رقم حساس کاشته شد. گیاهچه یونجه هفت روزه، نیمه پایین از سیستم ریشه با یک اسکالپل استریل برداشته شد. ریشه های باقی مانده در سوسپانسیون باکتری مشکوک، به مدت یک ساعت خیسانده شد. گیاهان در شرایط کنترل شده از ١٢ ساعت روز/شب به مدت ٣٥ روز رشد کردند. برگ از هر بوته پس از ٧، ١٠، ١٤، ٢١، ٢٨، ٣٥ روز حذف گردید. برگ ها ضدعفونی سطحی و در مقدار بسیار کمی از بافر فسفات (PBS) خیسانده شدند. یک لوپ از این سوسپانسیون بر روی سطح TBY آگار با آنتی بیوتیک، پخش گردید و در دمای ٢٢ درجه سلیسیوس انکوبه شد. پس از ٤ تا ٦ روز انکوباسیون کلنی های مشابه پاتوژن رشد نمودند (١٢).

از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از باکتری *کلاوی باکتر میچیگاننسیس* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

و) بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری های اپی فیت روی باکتری بیمارگر: برای بررسی اثر متقابل، از کشت ٤٨-٢٤ ساعته باکتری ها استفاده شد. به طوری که باکتری های اپی فیت و اندوفیت به صورت لکه ای بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. نمونه ها به مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. پس از رشد باکتری ها، آن ها با استفاده از پنبه آغشته به الکل ٩٦ درصد پاک گردیدند. سپس پتری به صورت وارونه قرار داده شد و یک قطره کلروفرم روی در پتری ریخته شد. پس از ٢٠ دقیقه در پتری برداشته شد و به مدت ٣٠-٢٠ دقیقه در زیر هود هوادهی انجام پذیرفت. سوسپانسیون باکتری بیمارگر با OD= 0.1 در طول موج ٦٠٠ نانومتر تهیه شد. میزان یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر بر روی محیط ریخته و سپس به صورت یکنواخت پخش گردید. پتری ها به مدت ٤٨ تا ٧٢ ساعت درون انکوباتور نگهداری شدند. سپس اثر جدایه های اپی فیت با اندازه گیری قطر هاله بازدارنده مورد ارزیابی قرار گرفت (١٣). در نمونه شاهد می توان به جای باکتری آنتاگونیست و یا سوسپانسیون باکتری بیمارگر از آب مقطر استریل استفاده نمود.

ز) آزمون های افتراقی به منظور شناسایی جدایه های آنتاگونیست: ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه های جداسازی شده با استفاده از آزمون فوق حساسیت بر روی شمعدانی(١٤)، آزمون کاتالاز، اکسیداز (١٥)، رشد در نمک طعام (١٦)، آزمون KOH ٣ درصد، تولید رنگدانه زرد روی YDC (Yeast extract dextrose-CaCO3)، تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط King B، آزمون آرژنین دی هیدرولاز، رشد هوازی و بی هوازی (١٧)،

هیدرولیز نشاسته، تست لوان، Rot of potato، کشت بر روی محیط ائوزین متیلن بلو(EMB)و تولید رنگدانه سبز متالیک، استفاده از سیترات، هیدرولیز ژلاتین و تولید اسید از کربوهیدرات ها با استفاده از محیط پایه آیر (۱۸) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

ح) بررسی الگوهای پروتئینی جدایه ها: برای پی بردن به الگوی باندهای پروتئینی و تنوع سویه‌ها، استخراج پروتئین از نمونه‌ها صورت گرفت. الکتروفورز پروتئین‌ها به روش ناپیوسته اصلاح شده لاملی (Laemmli) (۱۹) بر روی ژل پلی‌آکریل آمید انجام شد. در ابتدا جدایه‌های مورد نظر بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شدند. سوسپانسیون سلول های باکتریایی در بافر استخراج نمونه، شامل اتیلن دی آمین تترااستات ۰/۰۵ مولار و اضافه کردن به ازای هر میلی لیتر سوسپانسیون، ۱۰ میکرولیتر محلول لیزوزیم (۱ میلی گرم لیزوزیم/ ۰/۱ میلی لیتر بافر Tris.HCL ، ۰/۰۵ مولار با pH ۷) تهیه شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه (یا بیشتر در صورت لزوم) در ۳۷ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. در ادامه SDS اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس حرارت داده شد. سپس سانتریفیوژ نمونه ها در ۱۱۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها بر روی ژل پلی اکریل آمید بارگذاری شدند.

ط) واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR): برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای اختصاصی ساخته شده توسط شرکت سیناژن استفاده گردید. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلی مراز (۲/۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs (۰/۲ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر آنزیم (1X)، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۲/۵ میلی مولار)، ۳ میکرلیتر DNA الگوی باکتریایی و ۱۶/۹۵ میلی لیتر آب مقطر استریل انجام گرفت. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad (آلمان) با شرایط دمایی ٤ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال PCA2 در دمای ٥٦/٤ درجه و اتصال Bacillsp 16S در دمای ٥۲ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور (انگلستان) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس به منظور تعیین توالی، قطعات DNA تکثیر شده به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شدند.

ی) تجزیه و تحلیل داده ها: در این مطالعه از نرم افزارهای Mega 4 و روش Neighbour-Joining برای تجزیه و تحلیل نتایج استفاده گردید. پس از هم ردیف کردن توالی های به دست آمده، برای رسم درخت از نسخه ۱/۲ نرم‌افزار Mega4 استفاده شد. درخت‌ها با روش NJ و با هزار bootstrap رسم شدند.

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده شده برای تکثیر ژن *16S rRNA* در جدایه های باکتریایی جدا شده از یونجه.

منبع	سایز قطعات (جفت باز)	توالی آغازگر	نام آغازگر
١٦	١٠٠٠	'5TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC3' '5CCGCGTTGTTCCTCGTTCAT3'	**PCA2a** **PCA2b**
٢٠	١٥٠٠	'5AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' '5AAGGAGGTGATCCAGCC 3'	**Bacillsp 16Sf** **Bacillsp 16Sr**

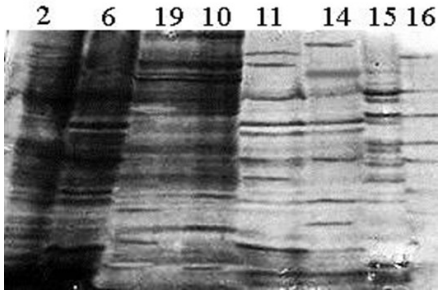
یافته ها

الف) جدایه های شناسایی شده: از مجموع جدایه‌های جداسازی شده از اندام های هوایی گیاه یونجه، ۳۰ جدایه باکتری های اپی فیت بودند. نماینده هایی از بین جدایه های اپی فیت که کلنی های متفاوت بر روی محیط نوترینت آگار داشتند انتخاب و برای آزمون های بیوشیمیایی، فنوتیپی، مولکولی استفاده شدند. بر اساس آزمون های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی جنس های اپی فیت به عنوان *باسیلوس*، *سودوموناس* و *زانتوموناس* شناسایی شدند. در بررسی الگوهای الکتروفورزی پروتئینی جدایه ها از یونجه، با وجود این که برخی از جدایه ها الگوی الکتروفورزی مشابه

داشتند، نتایج نشان دهنده تنوع در بین جدایه های گیاه یونجه بود (شکل ۱).

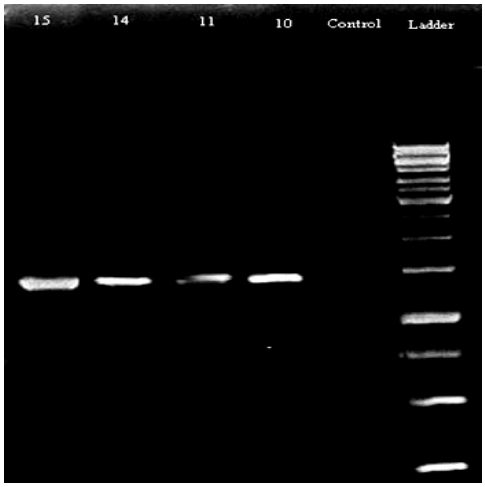
ب) بررسی قابلیت بیوکنترلی کلاوی باکتر توسط باکتری های اندوفیت و اپی فیت برگ و ساقه یونجه: در مجموع ۱۶ جدایه از باکتری های اپی فیت برای بررسی اثر بازدارندگی علیه باکتری بیمارگر *کلاوی باکتر*، با روش کشت سه نقطه ای بر روی محیط نوترینت آگار مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که بین جدایه های آنتاگونیست در میزان بازدارندگی از رشد باکتری بیمارگر، اختلاف معنی داری وجود دارد. این جدایه ها بر اساس میزان بازدارندگی در هشت دسته قرار گرفتند.

بیش ترین میزان بازدارندگی مربوط به جدایه شماره ۱۶ و کمترین میزان مربوط به جدایه های ۱۳ و ٦ بود (نمودار ۱). تجزیه واریانس اثر بازدارندگی جدایه های آنتاگونیست از رشد باکتری بیمارگر در جدول ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱: الگوی الکتروفورزی پروتئینی در میان جدایه های باکتریایی جداسازی شده از یونجه. ستون های ۲، ٦ و ۱۹) باکتری *سودوموناس*، ستون های ۱۰، ۱۱، ۱٤، ۱۵، ۱٦) باکتری *باسیلوس*.

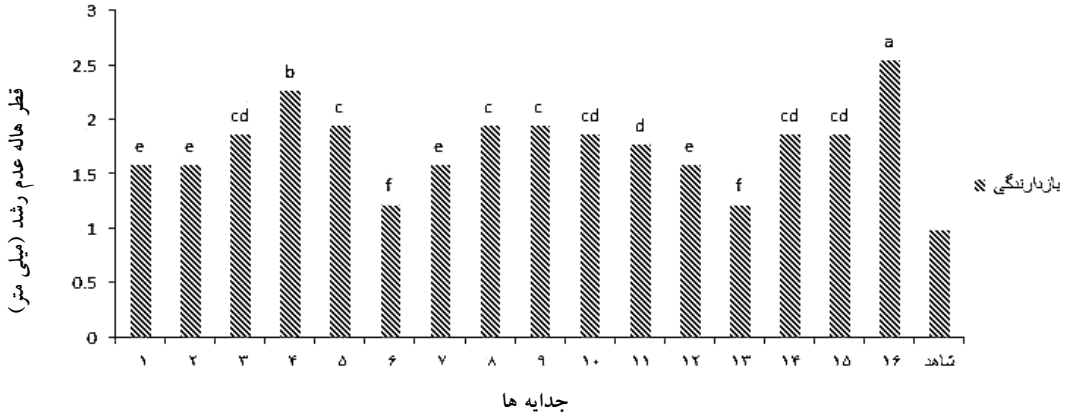
ج) شناسایی مولکولی جدایه های باکتریایی: واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آغازگر اختصاصی Bacillsp16Sf/Bacillsp16sr موجب تشکیل باند تقریبی ۱۵۰۰ جفت بازی در جدایه های ۱۰، ۱۱، ۱٤ و ۱۵ گردید (شکل ۲).



شکل ۲: نتایج الکتروفورز حاصل از واکنش PCR با جفت آغازگر Bacillsp. (Ladder مارکر ۳۰۰۰ جفت بازی، control) کنترل منفی (باکتری *سودوموناس*)، ستون های ۱۰، ۱۱، ۱٤ و ۱۵) تشکیل باند تقریبی ۱۵۰۰ جفت بازی در باکتری *باسیلوس*.

جدول ۲: تجزیه واریانس اثر بازدارندگی باکتری های اپی فیت جدا شده از یونجه علیه باکتری عامل پژمردگی یونجه.

منبع تغییرات	درجه آزادی (df)	مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	Pr>F
تیمار	۱۵	۵/۱۸	۰/۳٤۵	<۰/۰۰۰۱
خطا	۳۲	۰/۲۱	۰/۰۰٦	
کل	٤۷	۵/۳۹		
ضریب تغییرات (CV)	٤/۵٦			



نمودار ۱: تاثیر باکتری های اپی فیت جدا شده از یونجه بر بازدارندگی از رشد باکتری عامل پژمردگی *کلاوی باکتر*.

همچنین به کمک آغازگر اختصاصی PCA2a/PCA2b باند تقریبی ۱۰۰۰ جفت بازی در جدایه های ۲، ۹ و ۱۶ مشاهده گردید.

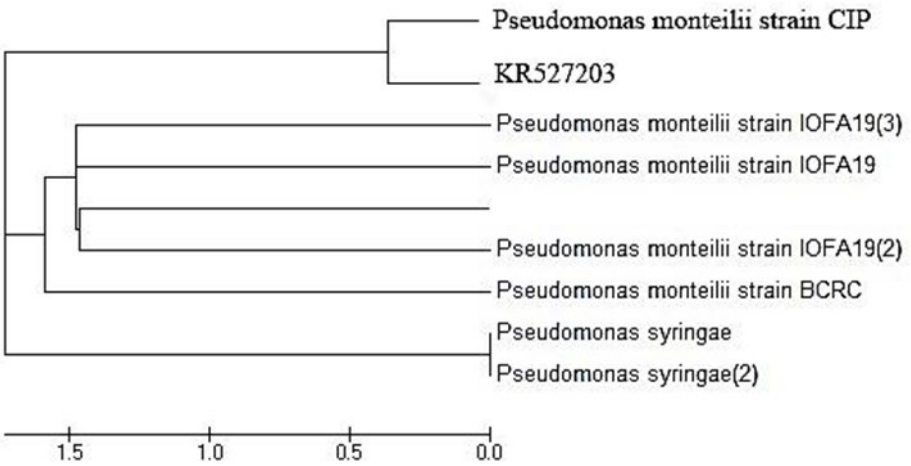
د) *توالی یابی محصولات واکنش زنجیره ای پلی مراز:* توالی ژن *16S rRNA* حاصل از جدایه ۱۶ با سایر توالی ها در بانک اطلاعات NCBI به وسیله نرم افزار بلاست نوکلئوتید هم تراز شد. درخت فیلوژنی جدایه با روش اتصال همسایه ای (Neighbour-joining) و با استفاده از نرم افزار Mega4 رسم گردید. با توجه به دندروگرام حاصل جدایه مورد نظر با شباهت ۹۸ درصد بیش ترین نزدیکی را به *سودوموناس مونتی لئی* (*Pseudomonas monteilii*) داشته و در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۳).

بحث

در این بررسی، باکتری‌های اپی فیت جدا شده از گیاه یونجه، برای بررسی اثر بیوکنترلی و بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه، به روش کشت سه نقطه ای و بخار کلروفرم و تشکیل هاله بازدارنده علیه باکتری *کلاوی باکتر میچیگانسیس* به کار برده شدند. بررسی های آزمایشگاهی به عنوان روشی اولیه برای شناسایی میکروب های آنتاگونیست مؤثر بر روی عوامل بیماری زا محسوب می شوند. اما نتایج آزمایشگاهی به صورت قطعی تعیین کننده مفید و بازدارنده بودن یک میکروارگانیسم نخواهد بود. زیرا در این بررسی ها در شرایط کنترل شده و مصنوعی، آنتاگونیست ها با بیمارگر تقابل داده می شوند. در حالی که اثر این میکروارگانیسم ها باید در محیط طبیعی ثابت شود. در محیط نیز تحت تأثیر عوامل متعدد مانند دما، اسیدیته، بافت خاک، رقابت با سایر میکروارگانیسم ها، رطوبت و سایر تنش های زیست محیطی است.

باکتری های گیاهی مرتبط می توانند رشد گیاه را به طور مستقیم از طریق تثبیت زیستی نیتروژن، انحلال فسفات و مهار ارتقای بیوسنتز اتیلن در پاسخ به تنش های زنده یا غیر زنده، و یا به طور غیر مستقیم با ایجاد مقاومت به پاتوژن افزایش دهند (۳). بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، مورفولوژیک و مولکولی، اغلب جنس های باکتریایی اپی فیت جدا شده در تحقیق حاضر که بیش ترین اثر را بر روی ویژگی های رشدی گیاه داشته و بازدارنده عامل بیماری بودند، مربوط به جنس های *باسیلوس*، *سودوموناس* و *زانتوموناس* بودند. از بین جدایه‌هایی که اثر بازدارندگی در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان دادند، در قالب آزمایش گلخانه ای با طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار به کار برده شدند.

باکتری اپی فیت باسیلوس دارای عملکرد مناسب علیه باکتری بیمارگر بود. به گونه ای که در اکثر ویژگی های رشدی گیاه از جمله وزن تر، وزن خشک و ارتفاع بوته بیش ترین تأثیر را داشت. این امر می تواند ناشی از تولید طیف وسیعی از



شکل ۳: درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ژن *16S rRNA* از جدایه ۱۶، جدا شده از گیاه یونجه با سایر باکتری های موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار MEGA4.

آنتی بیوتیک ها و القای مقاومت سیستمیک باشد.

این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه نامانیکام (Gnanamanickam) و همکاران مطابقت داشت (۱۱). در این بررسی باکتری اپی فیت *باسیلوس* عملکرد مناسبی بر روی بیمارگرهای مخرب شاخه و برگ برنج شامل بلاست برنج ناشی از *مگناپورته گریزیه* (*Magnaportthe grisea*)، سوختگی غلاف برنج در اثر *ریزوکتونیا سولانی* و بلایت باکتریایی در اثر *زانتوموناس اوریزیه* داشت. در رابطه با باکتری های مرتبط با برنج تاکید بر سرکوب بیماری، بهبود رشد گیاه و افزایش محصول برنج است. تولید انواع مختلف متابولیت توسط این باکتری های اپی فیت، باعث سرکوب پاتوژن های برنج و یا باعث افزایش رشد گیاه می شود. این امر نشان می دهد که چگونه باکتری های اپی فیت برای انجام این عملکرد حیاتی تکامل یافته اند.

در تحقیقی مشابه روبرتو (Roberto) و همکاران کنترل زیستی باکتری‌های اپی‌فیت *پانی باسیلوس ماسرانس* (*Paenibacillus macerans*) و *باسیلوس پومیلوس* (*Bacillus pumilus*) را بر روی لکه باکتریایی و لکه موجی گوجه‌فرنگی بررسی کردند. نتایج آنها نشان دهنده کنترل ۷۰ درصدی بیمارگرها توسط باکتری‌های اپی فیت بود (۲۱).

منتخبی (Montakhabi) و همکاران پتانسیل باکتری‌های اپی‌فیت سطح برگ مرکبات را به عنوان عوامل کنترل زیستی علیه شانکر باکتریایی مرکبات مورد بررسی قرار دادند (۲۲). یافته های آنها نشان داد که ۲۶ جدایه قادر به مهار رشد باکتری بیماری‌زا بودند. بر اساس نتایج مشخص گردید که بیشتر این جدایه‌ها از جنس‌های *سودوموناس* و *باسیلوس* بودند. این یافته با نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر مشابهت دارد. این امر می تواند در اثر تولید مواد فلورسنت و سیدروفور در جدایه‌های باکتریایی باشد. میرزایی (Mirzaei) و همکاران کنترل زیستی بیماری آتشک گلابی را با استفاده از برخی باکتری های آنتاگونیست مورد ارزیابی قرار دادند (۲۳). ن

تایج نشان داد که از میان جدایه‌های باکتری اپی‌فیتی که از فلور شاخ و برگ درختان سیب و گلابی به دست آمده بودند، ۵ جدایه بیشترین قطر هاله بازدارنده را در اطراف باکتری عامل بیماری ایجاد کردند. به طوری که این جدایه ها میزان بیماری را از ۵۵/۳ تا ۸۶/٤ کاهش دادند. این جدایه‌ها مربوط به جنس‌های *سودوموناس* بودند.

در یک بررسی مشابه متا (Meta) و همکاران در سال ۲۰۱۳ کنترل زیستی *اگزیرهیلم ترسیکوم* (*Exserohilum turcicum*) را توسط باکتری‌های اپی‌فیت مورد بررسی قرار دادند (۲٤). نتایج نشان دهنده کنترل موفقیت آمیز باکتری *کلاوی باکتر میچیگاننسیس* در شرایط برون تن بود. این یافته تایدی بر نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر خواهد بود.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده نشان دهنده اثر مثبت و بازدارنده جدایه های آنتاگونیست جدا شده از یونجه به عنوان یک عامل کنترل زیستی در شرایط آزمایشگاهی است. با این وجود مطالعات بیشتر برای اثبات کارایی این جدایه‌ها با هدف کاربرد آن‌ها در شرایط مزرعه مورد نیاز می باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا به دلیل حمایت های علمی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Dublin, March 11, 2015 (globe newswire)-Research and Markets (http://www.researchandmarkets.com/research/746glt/global_alfalfa) has announced the addition of the"Global Alfalfa Hay Industry Report 2015" report to their offering.
2. Mazaherilaghab H, Abdolahi M, Mousavi SS, Yazdi R. Effect of row spacing and stage of the

first cutting of forage on seed production in alfalfa. Seed Plant Product J. 2011; 1: 2-27.

3. EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2014. Scientific Opinion on the pest categorisation of Clavibacter michiganensis subsp. insidiosus (McCulloch) Davis et al. EFSA J. 2014; 12(12): 3910.

4. Kiraly Z, El-Zahaby HM, and Klement Z. Role of extracellular polysaccharides (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. J Phytopathol. 1997; 145: 59-68.

5. Leigh JA, Coplin DL. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Ann Rev Microb. 1992; 46: 307-346.

6. Gnanamanickam SS, Immanuel JE. Epiphytic bacteria, their ecology and functions. In: Gnanamanickam SS. (eds) plant-associated bacteria. Springer, Dordrecht; 2007: 131-153

7. Beattie GA, Lindow SE. Bacterial colonization of leaves: a spectrum of strategies. phytopathology. 1999; 89: 353-359.

8. Heidari A, Khodakaramian G. Comparison of pathogenicity of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* and *Pseudomonas viridiflava* strains on alfalfa. Arch Phytopathol Plant Protect. 2012; 45(8): 1.

9. Nongkhlaw FMW, Joshi SR. Distribution pattern analysis of epiphytic bacteria on ethnomedicinal plant surfaces: A micrographical and molecular approach. J Microscopy Ultrastructure. 2014. 2(1): 34-40.

10. Henis Y, Bashan Y. Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens. In: Fokkema NJ van den Heuvel J. (eds), Microbiology of the phyllosphere, New York: Cambridge University Press; 1986: 252-268.

11. Gnanamanickam SS, Mew TW. Biological control of blast disease of rice (Oryza sativa, L) with antagonistic bacteria and its mediation by a *Pseudomonas* antibiotic. Ann Phytopathol Soc Japan. 1992; 58: 380-385.

12. Vichova J, Kozova Z. The virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* strains and tests of alfalfa varieties for resistance to the wilt pathogen. J Plant Protec Res. 2004. 44(2): 147-154.

13. Ryan AD, Kinkel LL, Schottel JL. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. Biochem Sci Techno. 2004; 14: 301-311.

14. Klement Z, Rudolph K, Sands DC. 2001. Methods in phytobacteriology. Akademia Kiado, Budapest. pp: 586.

15. Kovacs N. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction. Nature. 1956; 178: 703.

16. Schaad NW, jones JB, Chun W. Laberatory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. American phytopathological society. Paul, MN; 2001: 398.

17. Hugh R, Leifson E. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J Bacteriol. 1953; 66: 24-26.

18. Vidaver AK, Davis MJ. Coryne form pathogens. In: Schaad NW. (Ed). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Aps Press. St. Paul, MN; 1988: 60-80.

19. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature Publishing Group. 1970; 227: 680-685.

20. Hengstmann U, Chin K, Janssen PH, Liesack W. Comparative phylogenetic assignment of environmental sequences of genes encoding *16S rRNA* and numerically abundant culturable bacteria from anoxic rice paddy soil. Appl Environ Microbiol. 1999. 5(11): 5050-5058.

21. Roberto LF, Reginaldo SR, Eduardo A. Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. Pesq Agropec Bras. 2010; 45: 12: 1381-1387.

22. Montakhabi MK, Rahimian H, Rastegar FM, Jafarpour B. In vitro investigation on biocontrol of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* cause of citrus bacterial canker by citrus antagonistic bacteria . J Plant Protect. 2011. 24(4): 368-376.

23. Mikiciński A, Sobiczewski P, Puławska J, Maciorowski R. Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) by a novel strain 49M of *Pseudomonas* graminis from the phyllosphere of apple (Malus spp.). Eur J Plant Pathol. 2016; 145: 265.

24. Mata L, Chavez C, Rodriguez-Herrera R, Hernandez-Castillo D, Aguilar C. Growth inhibition of some phytopathogenic bacteria by cell-free extracts from *Enterococcus* sp. British Biotech J. 2013; 3(3): 359-366.

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 1, April 2017

Original Article

The inhibitory effect of alfalfa epiphytic bacteria on *Clavibacter michiganensis* subsp. insidious as the causal agent of wilt disease

Mitra Omidi Nasab[1], **Gholam Khodakaramian**[2]

[1]M.Sc., Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
[2]Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Due to indiscriminate use of chemical pesticides and its impact on the environment, other methods including the use of epiphytic and endophytic bacteria to control pathogens is highly regarded. Since *Medicago sativa* is the most important forage crop in Iran and many parts of the world, this study was aimed to evaluate the inhibitory effect of alfalfa epiphytic bacteria on the causal agent of wilt disease in in-vitro.

Materials & Methods: Undiseased alfalfa leaf samples were collected from different parts of Hamedan province, before its flowering. After isolating epiphyte bacteria from alfalfa fields, the antagonistic effect of isolates was investigated by measuring the diameter of the inhibition zone against alfalfa bacterial wilt. Protein extraction was performed to assess the pattern of protein bands and the variety of the strains. Biochemical tests and PCR were used to identify the isolates.

Results: A total of 30 epiphyte bacteria were isolated from alfalfa shoots. Bacterial isolates were identified as *Bacillus*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*, based on biochemical, physiological and morphological tests. The highest bactericidal effect was related to isolating No. 16 and the lowest to isolates No. 13, and No. 6, respectively. Using molecular and dendrogram methods, isolate No. 16 was most closely related to *Pseudomonas monteilii*.

Conclusion: Epiphytic bacteria isolated in this study showed a good inhibitory effect against alfalfa wilt in vitro. This can be promising for the biocontrol of this disease. However, further studies are needed to prove the efficacy of the isolates in field conditions.

Keywords: Antagonistic activity, Protein electrophoresis, Bacterial wilt.

Correspondence to: Mitra Omidi Nasab

Tel: +98 9169559224

E-mail: momidi68@yahoo.com

Journal of Microbial World 2017, 10(1): 59-68.