بررسی بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت یونجه علیه باکتری بیمارگر *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* عامل پژمردگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

میترا امیدی نسب، غلام خداکرمیان

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

مسئول مکاتبات: میترا امیدی نسب، پست الکترونیک: momidi68@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۴/۰۶ ۱۳-۱ (۱) ۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۱۱

چکیده

باکتری‌های اندوفیت گروه مهمی از باکتری‌ها هستند که از طریق تولید فیتوهورمون‌ها، تولید عوامل ضد قارچ و ضد باکتری، تولید سیدروفور، رقابت غذایی و القای مقاومت سیستمیک میزبان، باعث مهارزیستی عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شوند. هدف از این پژوهش دستیابی به جدایه‌های اندوفیت با اثر آنتاگونیستی علیه عامل پژمردگی یونجه *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه بود. به‌منظور انجام این پژوهش طی نمونه‌برداری‌های انجام شده، جدایه‌های باکتریایی از مزارع یونجه در استان همدان جداسازی شدند. سپس در شرایط آزمایشگاه، تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌ها علیه باکتری عامل پژمردگی یونجه بررسی شد. در شرایط آزمایشگاهی به روش کشت سه نقطه‌ای در محیط کشت Nutrient Agar و تشکیل هالهٔ بازدارنده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسهٔ میانگین با آزمون چند دامنه‌ای دانکن آنالیز شد. بر اساس بررسی‌های آزمایشگاهی، هشت جدایه که دارای میانگین قطر هالهٔ بازدارنده شش میلی‌متر بودند، برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. در شرایط گلخانه ارزیابی اثر جدایه‌های باکتریایی در کنترل توسعه بیماری از طریق اندازه‌گیری فاکتورهای رشدی یونجه بررسی شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های ۸ و ۵۶ توان کنترل بالایی داشتند؛ به‌گونه‌ای که این جدایه‌ها در سطح احتمال ۱٪ موجب افزایش فاکتورهای رشدی گیاه شدند. ژن کدکننده 16s rRNA جدایه‌های نماینده تکثیر و تعیین توالی شدند. نتایج نشان داد که جدایه‌هایی که بیش‌ترین درصد بازدارندگی را در شرایط آزمایشگاه و گلخانه داشتند، مربوط به جنس‌های *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas* sp.، *Escherichia coli*، *Sphingomonas paucimobilis* و *Paenibacillus glycanilyticus* بودند. باکتری‌های اندوفیت *Bacillus subtilis* و *Sphingomonas paucimobilis* دارای عملکرد مناسب علیه باکتری بیمارگر بودند. به‌گونه‌ای که در اکثر ویژگی‌های رشدی گیاه از جمله وزن تر، وزن خشک و ارتفاع بوته بیش‌ترین تأثیر را داشتند. این تأثیر می‌تواند ناشی از تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و القای مقاومت سیستمیک جدایه‌ها در مهار زیستی بیماری پژمردگی باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه باشد؛ نتایج حاصل می‌تواند نویدی در مدیریت و مهار زیستی بیماری‌های خاکزاد باشد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، آغازگر، بازدارندگی، پژمردگی باکتریایی یونجه

مقدمه

امروزه به‌دلیل استفادهٔ بی‌رویه از سموم شیمیایی و تأثیرات منفی آن‌ها بر محیط زیست، روش‌های دیگری از جمله استفاده از موادی که بتوانند بدون این‌که محیط زیست را تحت تأثیر قرار دهند ضروری به نظر می‌رسد (Prabhat *et al*., 2013). از این رو، استفاده از باکتری‌های اندوفیت می‌تواند توان قابل توجهی برای کنترل عوامل بیماری‌زا داشته باشد. پژوهش‌های متعدد نشان داده که بسیاری از جمعیت‌های اندوفیتی به نفع گیاهان هستند و موجب تحریک رشد از طریق تثبیت نیتروژن می‌شوند (Hurek *et al*., 1994). همچنین باعث تولید فیتوهورمون‌ها، مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی در ناحیهٔ ریشه، از طریق تولید عوامل ضدقارچ و ضدباکتری، تولید سیدروفور، رقابت غذایی، القای مقاومت سیستمیک میزبان و ایمنی و یا

افـزایش در دسـترس بـودن مـواد معـدنی مـی‌شـوند (Sturz & Nowak, 2000). بـه‌طـور کلـی ایـن بـاکتری‌هـا ممکـن اسـت باعـث افـزایش رشـد گیـاه، افـزایش نـرخ جوانـه‌زنـی، زیسـت تـوده، سـطح بـرگ، میـزان کلروفیـل، نیتروژن، پروتئین، طول ریشه و سـاقه، عملکـرد و تحمـل بـه تنش غیرزنـده ماننـد خشـکی، سـیل، شـوری و غیـره شـوند. باکتری‌های گیاهی مـرتبط مـی‌تواننـد رشـد گیـاه را بـه‌طـور مستقیم از طریق تثبیت بیولوژیکی نیتـروژن، تولیـد و انحـلال فسفات، مهار ارتقـای بیوسـنتز اتـیلن را در پاسـخ بـه اسـترس زنده یا غیرزنده و یا به‌طور غیرمستقیم بـا ایجـاد مقاومـت بـه عامل بیمارگر افزایش دهند (Bhattacharyya & Jha, 2012). یونجه مهم‌ترین گیـاه علوفـه‌ای در ایـران و بسـیاری از نقـاط جهان است. این گیاه به‌دلیل بالا بودن ارزش غذایی و امکان کاشت در اقلیم‌های مختلف به ملکه نباتات علوفه‌ای مشـهور است (Mueller, 2007). یونجه دارای آفات و بیمـاری‌هـای متعددی است؛ یکی از بیمـاری‌هـای مهـم یونجـه کـه باعـث کاهش عملکرد و خسارت زیاد می‌شود پژمردگی باکتریایی یونجه است. این بیماری برای اولین بار در سال ۱۹۲۵ توسط مک کالوچ گزارش شد (McCulloc, 1925). ایـن بیمـاری تاکنون از کشورهای مختلفی مانند: شـیلی، اسـترالیا، امریکـا، نیوزلند، جمهوری چک، یونـان، برزیـل، عربسـتان، کانـادا و تـونس گـزارش شـده اسـت. عامـل ایـن بیمـاری بـاکتری*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* است. بوته‌های آلوده به باکتری رنگ سبز مایل به زرد دارند و به راحتی از بوته‌های سالم قابل تشخیص هسـتند. بـارزترین ویژگی‌های گیاهان آلوده شامل کوتاهی قد، ساقه‌های جانبی فراوان کـه حالـت جاروجـادوگر بـه‌گیـاه مـی‌دهـد، کـاهش ارتفاع گیاه، پیچش برگچـه‌هـا رو بـه بـالا اسـت. زمـانی کـه بیماری روی گیاه توسعه پیدا می‌کند ریشهٔ اصـلی بـه زرد یـا قهوه‌ای کم‌رنگ، تغیر رنگ می‌دهد که با برش عرضی قابل مشاهده است. باکتری فوق مانند اکثـر بـاکتری‌هـای بیمـاری زای خـاکزاد، درون گیـاه نـوعی اگـزو پلـی‌سـاکارید تولیـد می‌کند که اعمـال بیولـوژیکی چندگانـه‌ای انجـام مـی‌دهنـد (Jahr *et al.*,1999). این اگزو پلی‌ساکارید یک زمینه اشباع از آب دور باکتری ایجاد می‌کند که به‌عنوان یک حفـاظ در برابـر دهیدراتاسـیون عمـل مـی‌کنـد (Leigh & Coplin, 1992). در برهمکنش عامل بیمـاری بـا سـلول‌هـای گیـاهی، اگـزو پلـی‌سـاکاریدها بـا جلـوگیری از فعالیـت لکتـین‌هـا و آگلـوتینین‌هـا، از تشـخیص عامـل بیمـاری‌زا توسـط سیسـتم دفـاعی گیـاه جلـوگیری مـی‌کننـد (Kiraly *et al*., 1997). همچنین این اگـزو پلـی‌سـاکاریدها در چسـبیدن بـاکتری بـه سطوح زنده و غیرزنـده کمـک مـی‌کننـد و باعـث پیشـرفت آلـودگی و تشـکیل کلنـی در گیـاه میزبـان شـده کـه بـرای پیشـرفت و گسـترش بیمـاری لازم اسـت (Bermpohl *et al*., 1996). اگزو پلی‌ساکاریدها احتمـالاً بـا نیروی چسبندگی و وزن مولکولی بالا باعث ایجاد تنش آبی شدید در گیاه می‌شود. به‌همین دلیل وجود آن‌ها در پیشرفت بیمـاری پیشـنهاد شـده اسـت (Fulkerson, 1960). بـاکتری عامل بیماری معمولاً از طریق زخم‌های ریشه و طوقه کـه در اثر سرما یا خسارت حیوانات، یا از طریق انتهای بریـده شـده سـاقه‌هـا در اثـر درو کـردن یـا چـرا وارد گیـاه مـی‌شـوند (Samac *et al*., 1998).

اثر اندوفیت‌ها به‌عنوان عوامـل مهـار زیسـتی وابسـته بـه عوامـل زیـادی اسـت کـه برخـی از ایـن عوامـل عبارتنـد از: ویژگی میزبان، پویایی جمعیت، الگوی کلونیزاسیون میزبـان، توانایی حرکـت بـه درون میزبـان و توانـایی القـای مقاومـت سیسـتمیک (Backman & Sikora, 2008). در گذشـته چندین باکتری اندوفیت برای تحریک رشد و بهبود سلامت گیاهـان گـزارش شـده اسـت (Hallmann *et al*., 1997)، و به‌همین دلیل ممکن است منبع عوامل بیوکنترلی مهمی باشند. برای مثال *Erwinia caratovora*، توسط باکتری‌های انـدوفیت متعدد از جمله استرین‌هـای مختلـف از *Pseudomonas* sp.، *Curtobacterium luteum*، *Pantoea agglomerans*، کنتـرل مـی‌شـود (Sturz & Nowak, 2000). در بلـوط نیـز باکتری‌های انـدوفیت فعـال بیولـوژیکی علیـه عامـل بیمـاری پژمردگـی بلـوط، *Ceratocystis fagacearum* جـدا شـده است (Brooks *et al*., 1994). علاوه بر این استرین‌های جدا شـده‌ی بـاکتری *Bacillus subtilis* از شـیرهٔ آونـد چـوبی درختـان شـاه بلـوط سـالم اثـرات ضـدقارچی علیـه *Cryphonecteria parasitica* عامـل سـوختگی شـاه بلـوط

دارند (Wilhelm *et al*., 1998). جالب توجه است، توانایی مهار رشد بیمارگر به‌وسیلهٔ باکتری‌های اندوفیت جدا شده از غده‌های سیب زمینی، باکتری‌های کلونیزه کنندهٔ داخلی گیاهان میزبان را کاهش می‌دهد. کلونیزاسیون از میزبان‌های متعدد با گونه‌های مختلف از اندوفیت‌ها گزارش شده است. برای مثال *Pseudomonas putida* 89B-27 و *Serratia marcescens* 90-166 با القاء مقاومت سیستمیک موجب کنترل ویروس موزائیک کدوئیان در گوجه فرنگی و خیار شدند (Raupach *et al*., 1996). استورز و نوواک دریافتند که ۶۱ جدایه از ۱۹۲ جدایه باکتریایی اندوفیت به‌دست آمده از بافت‌های ساقه سیب‌زمینی، عوامل بیوکنترلی مؤثر علیه *Clavibacter michiganensis* subsp. *spedonicus* بودند (Sturz & Nowak, 2000). در یک بررسی دیگر، استاچکویچ و همکاران، تعداد ۱۵ اندوفیت غیر ریزوبیال از گره‌های ریشه‌های ضدعفونی سطحی شده یونجه جداسازی و زمینه‌های نفوذ آن‌ها را به درون یونجه و هم‌زیستی آن‌ها با *Sinorhizobium meliloti* مورد بررسی قرار دادند که استرین‌های شناسایی شده از باکتری‌های *Bacillus megaterium*، *Brevibacillus chosiensi* و *Microbacterium trichothenolyticum* معرفی شدند (Stajkovich *et al*., 2009). اثر متقابل گیاه و میکروب در راستای ارتقاء توسعه و سلامت گیاه موضوعی مورد توجه بوده است. چالش و هدف اصلی این است که ما بتوانیم جوامع میکروبی را به نفع کلونیزاسیون گیاهی توسط باکتری‌های مفید مدیریت کنیم. این امر می‌تواند زمانی که یک دانش و آگاهی بهتر در مورد اکولوژی و اثر متقابل مولکولی آن‌ها به دست آمده باشد، عملی شود. از آن‌جا که بیماری پژمردگی یونجه در همدان و برخی استان‌های دیگر شیوع داشته و تاکنون بررسی جامعی در این مورد انجام نشده است، هدف از این تحقیق تعیین میزان بازدارندگی و اثر کنترلی باکتری‌های اندوفیت یونجه بر باکتری عامل پژمردگی *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت

نمونه‌برداری از شهرهای مختلف استان همدان شامل فامنین، بهار، امزاجرد، ملایر، کبودرآهنگ و رزن در بهار و تابستان ۱۳۹۲ صورت گرفت. نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی با حرکت در قطر مزارع یونجه انجام شد. در مجموع تعداد ۷۰-۶۰ نمونه از برگ‌های تازه و سالم پیش از گل‌دهی برداشت شد. برای جداسازی باکتری ابتدا برای ضدعفونی سطحی یک گرم برگ یونجه به‌مدت یک دقیقه در آب ژاول ۱٪ (ماده تجاری وایتکس) قرار داده و سپس نمونه‌ها چند بار آب‌شویی شدند تا بقایای آن کاملاً خارج شود. پس از آن نمونه برگ را خرد کرده و در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی ۱٪ ژلاتین به‌مدت ۳۰-۲۰ دقیقه مخلوط نموده و روی محیط NA (Merck- Germany) حاوی یک گرم در لیتر عصاره مخمر (Merck- Germany) به‌صورت خطی کشت داده شد. پس از رشد کلنی‌ها از هر پتری یک کلنی برداشته و به‌صورت چمنی در پتری جدید کشت داده و پس از رشد باکتری‌ها، از هر تیپ کلنی یک نمونه خالص و نگه‌داری شد. برای نگه‌داری باکتری‌ها از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی در آب مقطر تهیه کرده و یک میلی‌لیتر در ظروف شیشه‌ای دردار ریخته و در نهایت لوله‌های حاوی باکتری در یخچال قرار داده شدند. همچنین جدایه‌ها برای نگه‌داری طولانی مدت در گلیسرول ۱۰٪ درون فریزر نگه‌داری شدند. ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها با روش‌های زیر انجام شد: 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)،

Rot of potato، کشت روی EMB (Merck, Germany) و تولید رنگ‌دانه سبز متالیک، استفاده از سیترات، هیدرولیز ژلاتین و تولید اسید از کربوهیدرات‌ها با استفاده از محیط پایه آیر انجام شد (Schaad *et al*., 2001).

نمونه برداری و جداسازی عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه

از نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی پژمردگی باکتریایی، به‌صورت تصادفی نمونه برداری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده برای جداسازی باکتری عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شدند. بوته‌های آلوده ابتدا با آب مقطر شسته شدند و پس از خشک شدن، بافت آلوده در آب مقطر استریل خرد شد و پس از ۱۵-۱۰ دقیقه سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت NA حاوی یک گرم در لیتر عصارهٔ مخمر کشت داده شد. نمونه‌ها برای رشد به انکوباتور منتقل و پس از چند روز کلنی‌های باکتری بیماری‌زا به رنگ زرد مایل به نارنجی جداسازی شدند.

تلقیح باکتری به میزبان گیاهی (آزمون بیماری‌زایی)

برای این منظور نیمهٔ پایینی سیستم ریشهٔ گیاهچهٔ یونجهٔ هفت روزه رقم همدانی با اسکالپل استریل برداشته شد. ریشه‌های باقیمانده در سوسپانسیون باکتری مشکوک به مدت یک ساعت خیسانده شده و آب مقطر به‌عنوان شاهد منفی و *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* عامل بیمارگر شناخته شده به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. گیاهان در شرایط کنترل شده با دورهٔ نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۳۵ روز رشد کردند. نمونه‌های برگ پس از ۷، ۱۰، ۱۴، ۲۱، ۲۸ و ۳۵ روز از بوته جدا و پس از ضدعفونی سطحی در مقدار بسیار کمی بافر فسفات (PBS) خیسانده شدند. یک لوپ از این سوسپانسیون روی سطح TBY آگار با آنتی بیوتیک، پخش و در ۲۲ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. پس از ۶-۴ روز انکوباسیون کلنی‌های مشابه پاتوژن رشد نمودند (Vichova & Kozova, 2004).

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های اندوفیت روی باکتری بیمارگر *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* (روش بخار کلروفرم)

آزمایش‌های توانایی آنتاگونیستی جدایه‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک و مواد بازدارنده بین باکتری‌های اندوفیت و باکتری عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی روی محیط کشت NA به‌روش کشت سه نقطه‌ای و بخار کلروفرم انجام شد (Ryan *et al*., 2004). برای بررسی اثر متقابل، از کشت ۴۸-۲۴ ساعته باکتری‌ها استفاده شد؛ به‌طوری که باکتری‌های اندوفیت به‌صورت لکه‌ای روی محیط کشت NA کشت داده شدند. نمونه‌ها به‌مدت ۷۲-۴۸ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شدند، پس از رشد باکتری‌ها، آن‌ها را با استفاده از پنبهٔ آغشته به الکل ۹۶٪ پاک کرده و سپس پتری را به‌صورت وارونه قرار داده و یک قطره کلروفرم روی در پتری ریخته شد و پس از ۲۰ دقیقه در پتری را برداشته و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در زیر هود هوادهی انجام شد. سپس سوسپانسیون باکتری بیمارگر با OD: ۰/۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شده و به میزان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر روی محیط ریخته و سپس به‌صورت یکنواخت پخش و درون انکوباتور نگه‌داری شد. پس از ۷۲-۴۸ ساعت اثر جدایه‌های اندوفیت توسط اندازه‌گیری قطر هاله بازدارنده بررسی شد. در نمونه شاهد به‌جای باکتری آنتاگونیست یا سوسپانسیون باکتری بیمارگر از آب مقطر استریل استفاده شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. برای انتخاب جدایه‌های مناسب برای انجام بررسی‌های گلخانه‌ای، میانگین داده‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن مورد مقایسه قرار گرفت و نماینده‌ها انتخاب شدند.

آزمایش‌های گلخانه‌ای

تهیهٔ بستر کشت گیاه

برای آماده‌سازی خاک، از مخلوط ماسه، کود حیوانی پوسیده و خاک مزرعه به نسبت ۲:۱:۲ استفاده شد. ابتدا خاک و کود حیوانی سرند شده به همرا ماسه به‌صورت کاملاً یکنواخت با هم مخلوط شدند. ترکیب مرطوب شده خاک، ماسه و کود حیوانی در دمای ۷۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت دو ساعت اتوکلاو شد. گلدان‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰٪ ضدعفونی، و پس از خشک شدن با مخلوط خاک به میزان کافی پر شدند.

تهیهٔ مایهٔ تلقیح باکتری‌های آنتاگونیست و باکتری بیمارگر

سوسپانسیونی از کشت ۴۸-۲۴ ساعته جدایه‌های آنتاگونیست با غلظت OD:۰/۱، به‌وسیلهٔ آب مقطر استریل در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. غلظت باکتری بیمارگر نیز مشابه جدایه‌های آنتاگونیست تهیه شد. تلقیح سوسپانسیون باکتری به‌صورت آغشته سازی بذر و اضافه کردن به خاک انجام شد. ابتدا بذور با هیپوکلریت سدیم ۲٪ به‌مدت پنج دقیقه ضدعفونی شد و سپس با آب مقطر شستشو شدند تا هیپوکلریت سدیم زدوده شود. تعدادی از بذور تنها با سوسپانسیون جدایه‌های آنتاگونیست اندوفیت آغشته شدند. تعدادی نیز علاوه بر جدایه‌های اندوفیت، با باکتری بیمارگر نیز آغشته سازی شدند. در شاهد منفی، بذر و خاک تنها با باکتری بیمارگر و در شاهد مثبت بذر و خاک تنها با آب مقطر استریل آغشته شد. بذور به‌مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری روی شیکر قرار داده، و سپس به مدت یک ساعت در هوای آزاد قرار داده شد.

کاشت گیاه

در هر گلدان ۵-۳ بذر یونجه همدانی کاشته شد. پس از کشت بذر، سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست و بیمارگر به هر کدام از گلدان‌های مورد نظر به‌میزان ۲۰ میلی‌لیتر به خاک اضافه شد. پس از آن گلدان‌ها به اندازهٔ ظرفیت زراعی به‌صورت منظم آبیاری شدند.پس از گذشت حدود ۴۵ روز چین اول بوته‌های رشد یافته برداشت شد و چهار هفته پس از رشد مجدد، بوته‌ها را از خاک بیرون آورده و فاکتورهای طول ریشه، طول ساقه، وزن تر ساقه و ریشه، وزن خشک ساقه و ریشه اندازه‌گیری شد. به‌عنوان شاخص بیماری و رشد نیز فاکتور شادابی مورد بررسی و با سیستم نمره دهی مورد ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام و نتایج حاصل با استفاده از نسخه ۹/۴ نرم افزار SAS در قالب آزمون فاکتوریل تجزیه شد. میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شد.

استخراج DNA از جدایه‌های اندوفیت جدا شده از یونجه و انجام واکنش PCR

برای استخراج DNA از باکتری، جدایه مورد نظر در محیط کشت NA کشت داده شد. پس از ۷۲-۴۸ ساعت که باکتری‌ها رشد کردند، یک لوپ از باکتری را در یک میلی‌لیترآب مقطر استریل درون میکروتیوب ریخته و میزان ۱۰۰ میکرولیتر، KOH ۵٪ به آن افزوده شد، سپس نمونه‌ها برای پنج دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. پس از آن به‌مدت پنج دقیقه نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند، بعد از اتمام سانتریفیوژ، فاز رویی به میکروتیوب استریل دیگری منتقل و برای استفاده به‌عنوان DNA الگو در واکنش PCR در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. برای انجام واکنش PCR از آغازگرهای اختصاصی ساخته شده توسط شرکت سیناژن استفاده شد. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول (۱) ارایه شده است.

جدول۱- آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر ژن 16S rRNA و شناسایی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از یونجه.

Table 1. The 16s rRNA primers used for the identification of alfalfa bacterial strains.

Primer name	Primer sequence
PCA2a [s]	5'TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC3'
PCA2b	5' CCGCGTTGTTCCTCGTTCAT3'
Bacill sub 16sf [s]	5'GGAGCTTGCTCCCTGATGTT3'
Bacill sub 16sr	5' CACCCAATCATCTGTCCCA 3'
MO f (10f)[u]	5'AGTTTGATCATGGCTCAGATTG3'
MO r (1507r)	5'TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG3'

U: آغازگر عمومی، S: آغازگر اختصاصی

U: universal primer, S: specific primer

الکتروفورز و تعیین توالی فرآورده‌های تکثیر شده

برای این کار در ابتدا از یک ژل با ظرفیت ۲۲ چاهک برای بارگذاری نمونه‌ها استفاده شد. چهار میکرولیتر محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و پس از تهیهٔ ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE، نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگذاری شدند. دستگاه الکتروفورز به منبع تأمین نیروی برق با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت متصل شد. پس از ۷۵ دقیقه و هنگامی که رنگ بروموفنول بلو به دو سانتی‌متری انتهای ژل

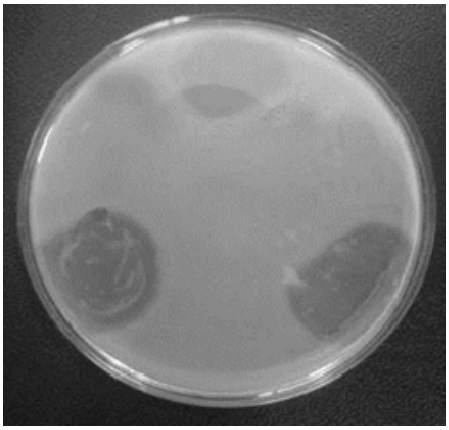
رسید، جریان برق قطع و ژل، برای رنگ‌آمیزی به‌مدت ۲۰ الی ۳۰ دقیقه در داخل محلول اتیدیوم بروماید با غلظت یک میلی‌گرم در لیتر قرار گرفت (Sigmon & Larcom, 1996). پس از رنگ‌آمیزی، ژل به‌مدت یک دقیقه با آب مقطر سترون شستشو و پس از قرار گرفتن در دستگاه Gel document (Uvitec/DM 500) از آن عکس برداری شد. به‌منظور تعیین توالی DNA نمونه‌ها، قطعات DNA تکثیر شده به شرکت Bioneer فرستاده شد.

نتایج

به‌منظور یافتن جدایه‌های اندوفیت برای کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه، از اندام‌های هوایی گیاه، در مجموع ۵۷ جدایه به‌دست آمد. نماینده‌هایی از بین جدایه‌های اندوفیت که کلنی‌های متفاوت روی NA داشتند انتخاب و برای آزمون‌های بیوشیمیایی، فنوتیپی و مولکولی استفاده شدند. براساس آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی اغلب جنس‌های اندوفیت *Bacillus* sp.، *Pseudomonas* sp.، *Xanthomonas* sp. و *Paenibacillus* sp. تشخیص داده شد.

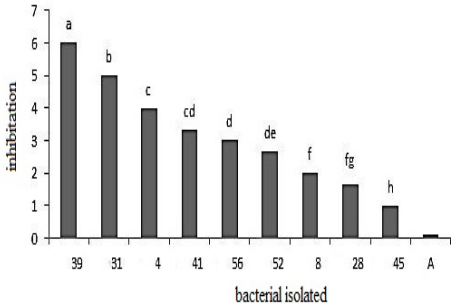
نتایج بررسی آزمایشگاهی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌های اندوفیت

تعداد ۵۷ جدایه از باکتری‌های اندوفیت برای بررسی اثر بازدارندگی علیه باکتری بیمارگر *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*، عامل پژمردگی یونجه، با روش کشت سه نقطه‌ای روی محیط کشت NA مورد آزمایش قرارگرفت (شکل ۱). نتایج نشان داد که بین جدایه‌های آنتاگونیست در میزان بازدارندگی از رشد باکتری بیمارگر، اختلاف معنی‌داری وجود دارد (df: 56, Pr>F: 0.0001)، که براساس میزان بازدارندگی، در هشت دسته قرار گرفتند. بیش‌ترین میزان بازدارندگی مربوط به جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* بود (شکل ۲). شانزده جدایه نیز هیچ‌گونه تأثیری در بازدارندگی رشد باکتری بیمارگر نداشتند.



شکل ۱- اثر باکتری‌های اندوفیت جدا شده از ریشهٔ یونجه در بازدارندگی از رشد باکتری عامل پژمردگی.

Fig. 1. Effect of endophytic bacteria isolated from alfalfa on the growth of wilt bacterial agent



شکل ۲- گروه بندی آماری اثرات بازدارندگی استرین‌های باکتریایی اندوفیت جدا شده از یونجه علیه *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*.

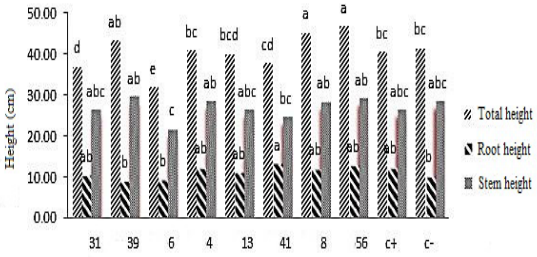
Fig. 2. Statistical grouping of the inhibitory effects of endophytic bacterial strains isolated from alfalfa against *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*.

نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای اثر باکتری‌های اندوفیت روی فاکتورهای رشد یونجه و شدت بیماری‌زایی *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*

با تجزیهٔ داده‌های به‌دست آمده از آزمون گلخانه‌ای مشخص شد که بین گیاهان تیمار شده با باکتری‌های اندوفیت و باکتری‌های اندوفیت به‌همراه باکتری بیمارگر در مقایسه با شاهد منفی (تیمار فقط با باکتری بیمارگر) و مثبت

(شاهد سالم) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. هم‌چنین مشخص شد باکتری‌های اندوفیت توانایی مهارزیستی عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه را دارند. در این بررسی کاهش معنی‌دار شدت بیماری نسبت به شاهد آلوده مشاهده شد (df: 17, Pr>F: < 0/0001). به گونه‌ای که جدایه‌های *Pseudomonas* sp. و *Sphingomonas paucimobilis* کم‌ترین شدت بیماری را داشتند.

طبق جدول (۲) نتایج تجزیهٔ واریانس اثر بلوک بر ارتفاع گیاه یونجه معنی‌دار نبود. اثر به‌کارگیری جدایه‌های باکتریایی اندوفیت به تنهایی و اثر متقابل این جدایه‌ها با باکتری بیمارگر در سطح ۱٪ معنی‌دار شد. گیاهان کنترل مثبت (بدون حضور باکتری بیمارگر و جدایه‌های اندوفیت) و کنترل منفی (فقط حضور باکتری بیمارگر) تفاوت معنی‌داری در صفت ارتفاع بوته نشان ندادند. با توجه به مقایسهٔ میانگین دانکن جدایه‌های باکتریایی اندوفیت *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* به‌ترتیب بیشترین و کمترین ارتفاع بوته را سبب شدند (شکل ۳).

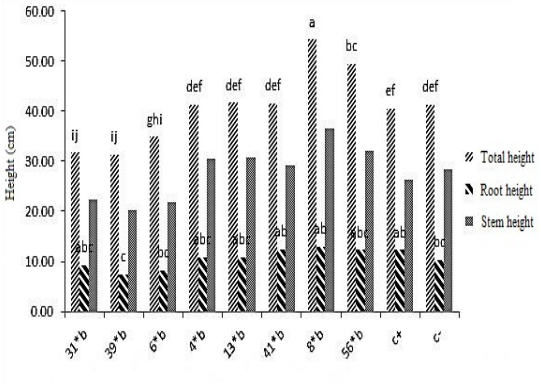


شکل ۳- تأثیر باکتری‌های اندوفیت جدا شده از یونجه بر ارتفاع ساقه، طول ریشه و ارتفاع بوتهٔ یونجه.

Fig. 3. Effect of endophytic bacteria isolated from alfalfa on the stem length, root length and plant height.

بررسی اثرات متقابل جدایه‌های اندوفیت و باکتری بیمارگر نشان داد که بیشترین ارتفاع بوته تحت تأثیر باکتری *Pseudomonas* sp. در حضور باکتری بیمارگر حاصل می‌شود (شکل۴). در مورد صفت طول ریشه نیز اثر بلوک معنی‌دار نبود. بررسی اثر باکتری‌های اندوفیت بر صفت طول ریشه بوته‌های یونجه نشان داد که کاربرد جدایه‌های باکتریایی در مقایسه با کنترل مثبت و منفی معنی‌دار نبود.

هم‌چنین بررسی تأثیر بر طول ریشه نشان داد که کاربرد به همراه باکتری بیمارگر در مقایسه با کنترل منفی اختلاف معنی‌داری ندارد. نتایج حاصل از تجزیهٔ واریانس تأثیر باکتری‌های اندوفیت بر طول ساقه یونجه نشان دادند که کاربرد آن‌ها به تنهایی روی این صفت مؤثر نبوده و جدایه‌ها از این نظر اختلاف معنی‌داری در مقایسه با شاهد نداشتند (جدول ۲). در بررسی اثر متقابل کاربرد جدایه‌های باکتریایی به همراه باکتری بیمارگر در مقایسه با کنترل منفی و مثبت اختلاف معنی‌دار مشاهده شد؛ به‌طوری که جدایه‌های *Pseudomonas* sp. و *Sphingomonas paucimobilis* بیشترین و *Pseudomonas fluorescents* کم‌ترین میزان تأثیر را در افزایش طول ساقه بوته‌های یونجه تلقیح شده با جدایه‌های باکتریایی داشتند (شکل ۴).

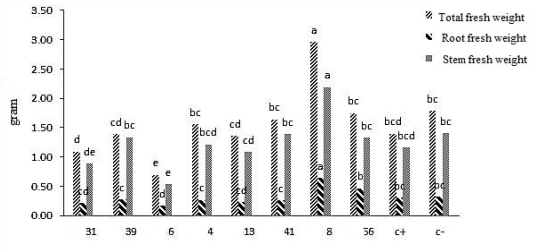


شکل ۴- بررسی اثرات متقابل استرین‌های اندوفیت جدا شده از یونجه به‌همراه باکتری بیمارگر در صفات ارتفاع ساقه، ریشه و ارتفاع کل.

Fig. 4. Interactions among the strains of endophytic bacteria isolated from alfalfa and pathogen on stem, root and total plant height.

طبق نتایج تجزیهٔ واریانس، به‌کارگیری باکتری‌های اندوفیت به تنهایی روی وزن تر کل بوته‌های یونجه اختلاف معنی‌داری باهم داشتند. اختلاف در سطح ۱٪ معنی دار بود (جدول۳)، به‌طوری که جدایه *Pseudomonas* sp. بیشترین تأثیر را روی وزن ترکل داشت و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری از این نظر داشت. هم‌چنین جدایه ۶ کم‌ترین میزان را در بین اندوفیت‌ها، روی وزن تر بوته‌های یونجه داشت (شکل ۵). بررسی اثر متقابل اندوفیت‌ها به‌همراه

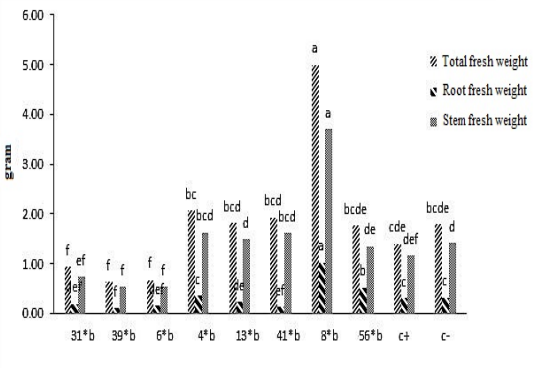
باکتری بیمارگر نشان داد که کاربرد جدایه‌ها نسبت به کنترل منفی اختلاف معنی‌داری داشت؛ و جدایه *Pseudomonas* sp. در حضور پاتوژن بیش‌ترین و *Pseudomonas fluorescents* کم‌ترین وزن تر کل را داشت (شکل ۵).



شکل ۵- تأثیر اندوفیت‌های جدا شده از یونجه به‌تنهایی در مقایسه با شاهد مثبت و منفی بر وزن تر کل، وزن ترساقه و ریشه.

Fig. 5. The effect of endophytes isolated from alfalfa compared to positive and negative control, on total fresh weight, fresh weight of alfalfa roots and shoots.

با بررسی نتایج تأثیر جدایه‌های اندوفیت بر وزن تر ریشه یونجه مشخص شد که به کارگیری اندوفیت به تنهایی روی بوته‌های یونجه در مقایسه با کنترل مثبت و منفی اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ داشت. بررسی اثر متقابل کاربرد جدایه‌های اندوفیت به همراه باکتری بیمارگر نسبت به شاهد آلوده نیز در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. اثر جدایه‌های اندوفیت به تنهایی، بر وزن تر ساقه در سطح ۱٪ معنی‌دار شد و جدایه‌های به‌کار برده شده نسبت به شاهد سالم و آلوده اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۳). اثر متقابل کاربرد اندوفیت به همراه باکتری بیمارگر نسبت به شاهد آلوده اختلاف معنی‌داری داشت و جدایه *Pseudomonas* sp. بیشترین و *Pseudomonas fluorescents* کم‌ترین اثر را روی وزن تر ساقه یونجه در حضور پاتوژن داشتند (شکل ۶).



شکل ۶- اثرات متقابل اندوفیت‌های جدا شده از یونجه به‌همراه باکتری بیمارگر بر وزن تر کل، وزن تر ساقه و ریشه یونجه.

Fig. 6. Interactions of the endophytes isolated from alfalfa with pathogenic bacteria on total fresh weight, fresh weight of alfalfa roots and shoots.

جدول ۲- تجزیهٔ واریانس اثر کاربرد باکتری‌های اندوفیت جداشده از یونجه بر ارتفاع ساقه، طول ریشه و ارتفاع بوته یونجه.

Table 2. Analysis of variance for the effectd of endophytic bacteria isolated from alfalfa on the stem length, root length and plant height.

Treatment	df	Mean Squares			Pr>F		
		Plant height	Root length	Stem length	Plant height	Root length	Stem length
Block	2	5.74	8.15	57.81	0.66	0.40	0.21
a	8	150.28	11.98	55.76	0.0001<	0.27	0.19
b	1	9.59	51.68	52.43	0.41	0.02	0.23
a × b	8	215.42	6.25	162.39	0.0001<	0.67	0.003
Error	18	13.57	8.69	35.03			
CV					8.97	25.9	21.5

a: باکتری آنتاگونیست، b: باکتری بیمارگر، a×b: اثر متقابل باکتری آنتاگونیست و بیمارگر

a: anthagonistic bacteria, b: pathogenic bacteria, a×b: Interaction between antagonistic bacteria and pathogens

جدول ۳- تجزیهٔ واریانس اثر کاربرد باکتری‌های اندوفیت بر وزن تر ساقه، ریشه و وزن تر کل یونجه.

Table 3. Analysis of variance for the effects of the endophytic bacteria, on the stem and root fresh weight of alfalfa.

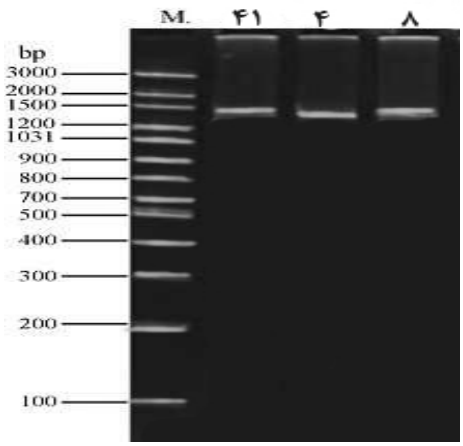
Treatment	df	Mean Square			Pr>F		
		Total fresh weight	Stem fresh weight	Root fresh weight	Total fresh weight	Stem fresh weight	Root fresh weight
Block	2	0.2	0.1	0.005	0.35	0.49	0.13
a	8	2.35	1.27	0.13	0.0001<	0.0001<	0.0001<
b	1	2.03	0.85	0.003	0.004	0.02	0.23
a × b	8	3.95	2.56	0.16	0.0001<	0.0001<	0.0001<
Error	18	0.19	0.14	0.002			
CV					27.48	29.22	15.53

a: باکتری آنتاگونیست، b: باکتری بیمارگر، a×b: اثر متقابل باکتری آنتاگونیست و بیمارگر.

a: anthagonistic bacteria, b: pathogenic bacteria, a×b: Interactionbetween antagonistic bacteria and pathogens.

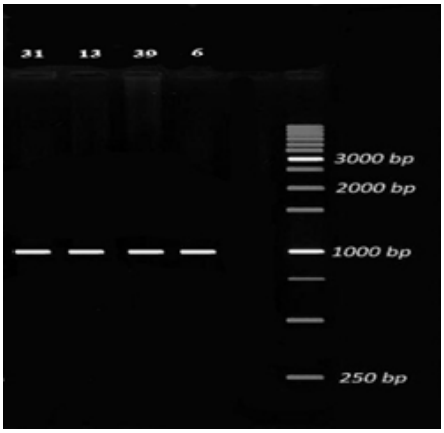
نتیجه PCR

انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگر MOf (10f) / MOR(1507r) موجب تشکیل تک باند تقریباً به‌اندازهٔ ۱۵۰۰ جفت باز از جدایه‌های ۴۱، ۸ و ۴ روی ژل آگارز شد (شکل ۷). انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگر اختصاصی Bacill sub 16sf/ Bacillsub 16sr موجب تشکیل تک باند تقریباً به اندازهٔ ۱۵۰۰ جفت باز از جدایه ۳۶ روی ژل آگارز شد. انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگر اختصاصی PCA2a/ PCA2b موجب تشکیل تک باند به اندازهٔ ۱۰۰۰ جفت باز از جدایه‌های ۳۱، ۳۹، ۱۳، ۶ روی ژل آگارز شد (شکل ۸).



شکل ۷- نتیجهٔ PCR با آغازگرعمومی MOR(1507r) /.MOf(10f).

Fig. 7. The PCR result with universal primer MOR (1507r)/ MOF(10f).



شکل ۸- نتیجهٔ PCR با آغازگر اختصاصی PCA2a/ PCA2b.

Fig. 8. The PCR result with specific primer PCA2a /PCA2b.

توالی‌یابی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

توالی ژن 16s rRNA جدایه‌ها به‌وسیلهٔ آغازگر عمومی MOR(1507r)/MOf(10f) تکثیر و محصول واکنش به شرکت Bioneer ارسال شد. توالی ژن 16s rRNA به‌دست آمده با سایر توالی‌ها در بانک اطلاعات NCBI به‌وسیلهٔ نرم افزار بلاست نوکلئوتید هم‌تراز شد. جدایهٔ ۸ با عنوان *Pseudomonas* sp. (GenBank No. KP271980)، جدایهٔ ۴۱، *Escherichia coli* (GenBank No. KR527205)، جدایهٔ ۴، *Paenibacillus glycanilyticus* (GenBank No. KR527204) و جدایهٔ ۵۶ *Sphingomonas paucimobilis* (GenBank No. KP106458) شناسایی شدند.

بحث

جدایه‌های اندوفیت آنتاگونیست که در این تحقیق برای ارزیابی توانایی بیوکنترل علیه عامل پژمردگی باکتریایی یونجه در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند، از نظر میزان فعالیت آنتاگونیستی متفاوت بودند. در بین این جدایه‌ها، هشت جدایه توان آنتاگونیستی بالایی نشان دادند. سازوکار آنتاگونیستی این باکتری‌ها می‌تواند شامل تولید هورمون، آنزیم و سیدروفور باشد (Sturz, 2000). ارتقاء رشد گیاهی بر اساس مکانیسم‌های پایه که از طریق آن‌ها رشد گیاه تحریک شده است به‌عنوان باکتری‌های PGPB طبقه‌بندی شده‌است؛ که باعث افزایش رشد گیاه به‌طور مستقیم و بیوکنترلی می‌شوند و با مهار رشد بیمارگرها از گیاهان محافظت می‌کند (Sikora & Backman,2008). در مطالعه انجام شده توسط (Stajkovich *et al*., 2009)، اثرات اندوفیت‌های غیرریزوبیال از گره‌های ریشه ضدعفونی سطحی شده یونجه، بر رشد یونجه بررسی شده است. تلقیح مشترک تمام استرین‌های غیرریزوبیال با *S. meliloti* به‌طور مثبت تعداد گره‌های یونجه را تحت تأثیر قرار داد؛ اما به نسبت تلقیح *S. meliloti* به تنهایی فاقد تأثیر معنی‌دار بر پارامترهای رشد بود. با این حال تلقیح به‌تنهایی با استرین‌های غیرریزوبیال باعث افزایش قابل توجه در پارامترهای رشدی ساقه و ریشه در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده نشان می‌دهد که استرین‌های غیرریزوبیال دارای برخی از پتانسیل‌های ارتقاء رشد گیاه هستند.

جدایه‌هایی که در گلخانه بیش‌ترین اثر را روی ویژگی‌های رشدی گیاه داشته و بازدارنده عامل بیماری بودند تحت جنس‌های *Bacillus subtilis*، *Sphingomonas paucimobilis* شناسایی شدند. باکتری *Sphingomonas* تاکنون از ۷۸ نمونه گیاهی و ۲۷ گونه شناسایی شده است. اگرچه تعداد و نسبت جمعیت در نوسان است، اما در بین اکثر گیاهان عالی وجود دارد. این گونه از خانواده‌های گیاهی Fabaceae، Caryophylaceae، Polygonaceae، Primolaceae، Brassicaceae، Convolvolaceae، Lamniaceae، Asteraceae و Poaceae گزارش شده است. در بررسی‌هایی مشابه، اثر بازدارندگی این باکتری علیه چهار گونه قارچ فوزاریوم بیماری‌زا آزمایش شده است؛ که نتایج نشان دهنده اثر قوی آنتاگونیستی جدایه فوق است. طبق گزارش (Innerebner *et al*., 2011)، جدایه‌های *Sphingomonas* می‌توانند از گیاه *Arabidopsis* در برابر عوامل بیماری‌زای *Pseudomonas syringae* محافظت کند. اثر رقابتی و آنتاگونیستی جدایه فوق در برابر عوامل بیماری‌زای کلونیزه کنندهٔ سطح برگ تأیید شده است. این باکتری در شرایط گلخانه باعث تحریک پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شود. در این بررسی نیز اثر بازدارندگی این باکتری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، مشابه است. در یک بررسی مشابه دیگر، یک رقم مقاوم گندم به عوامل بیماری‌زا، با اندوفیت *Sphingomonas* و با قارچ *F. culmorum* آلوده شد. آنتاگونیست به برگ و پاتوژن به ساقه تلقیح شد. نتایج نشان دهندهٔ بازدارنده بودن باکتری آنتاگونیست علیه بیمارگر بود؛ که از این می‌توان نتیجه گرفت که آنتاگونیست، مقاومت سیستمیک القایی را در گیاه تحریک می‌کند. باکتری اندوفیت *Bacillus subtilis* نیز دارای عملکرد مناسب علیه باکتری بیمارگر بود. به گونه‌ای که در اکثر ویژگی‌های رشدی گیاه از جمله وزن تر، وزن خشک و ارتفاع بوته بیش‌ترین تأثیر را داشت. که این امر می‌تواند ناشی از تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و القای مقاومت سیستمیک باشد. نتایج تحقیق مشابه نتایج (Gnanamanickam & Ebenzar, 2007) بود. در بررسی ذکر شده باکتری اندوفیت باسیلوس دارای عملکرد مناسب روی بیمارگرهای برگی برنج بود. مطالعات همچنین نشان می‌دهد که عملکرد باکتری‌های اندوفیت به‌عنوان عوامل بیوکنترلی، تا حد زیادی وابسته به ژنوتیپ میزبان است. در بررسی فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های اندوفیت جدا شده از بافت ساقه سیب‌زمینی در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*، عامل پوسیدگی حلقه‌ای باکتریایی سیب‌زمینی، ۳۲٪ از کل ۱۹۲ نمونه بازدارنده علیه *C. michiganensis* بود. یک سودوموناس فلورسنت، استرین CICA90 قادر به کلونیزاسیون داخلی و خارجی، بافت ریشه و ساقه بود (Lodewyckx *et al*., 2002). نتایج

این تحقیق با بررسی‌های دیگر که در آن تلقیح باکتری‌های اندوفیت موجب افزایش محصول و کاهش بیماری می‌شود، منطبق است. نتایج به‌دست آمده نشان دهندهٔ اثر مثبت و بازدارنده بودن جدایه‌های آنتاگونیست جدا شده از یونجه به‌عنوان یک عامل مهار زیستی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه است. با این وجود مطالعات بیشتر برای اثبات کارایی این جدایه‌ها با هدف کاربرد آن‌ها در شرایط مزرعه نیاز است.

References

Backman, P.A. & Sikora, R.A. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. Biological Control, 46: 1–3.

Bermpohl, A., Dreier, J., Bahro, R. & Eichenlaub, R. 1996. Exopolysaccharides in the pathogenic interaction of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with tomato plants. Microbiological Research, 151: 391–399.

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.

Brooks, D.S., Gonzalez, C.F., Appel, D.N. & Filer T.J. 1994. Evaluation of endophytic bacteria as potential biological control agents for oak wilt. Biological Control, 4: 373-381.

Fulkerson, J.F. 1960. Pathogenicity and stability of strains of *Corynebacterium insidiosum*. Phytopatholgy, 50: 377–380.

Gnanamanickam, S.S. & Ebenzar, I.J. 2007. Epiphytic Bacteria, Their Ecology and Function. pp.131-153. In: Gnanamanickam, S.S. (ed.), Plant-Associated Bacteria. Springer.

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

Hugh, R. & Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. Journal of Bacteriology, 66: 24–26.

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.

Innerebner, G., Knief, C. & Vorholt J.A. 2011. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system. Applied and Environmental Microbiology, 77(10): 3202–10.

Jahr, H., Bahro, R., Burger, A., Ahlemeyer, J. & Eichenlaub, R. 1999. Interaction between *Clavibacter michiganensis* and its host plants. Applied and Environmental Microbiology, 2: 113–118.

Kiraly, Z., El-Zahaby, H.M. & Klement, Z. 1997. Role of extracellular polysaccharides (EPS) slime of plant pathogenic bacteria in protecting cells to reactive oxygen species. Journal of Phytopathology, 145: 59–68.

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

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

Leigh, J.A. & Coplin, D.L. 1992. Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions. Annual Review of Microbiology, 46: 307–346.

Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M. & van der Lelie, D. 2002. Endophytic bacteria and their potential application. Critical Reviews in Plant Sciences, 21(6): 583–606.

McCulloc, L. 1925. *Aplanobacter insidiosum* nr sp., the cause of an alfalfa disease. Phytopathology, 15: 496–497.

Mueller S.C. 2007. Alfalfa Growth and Development. Division of Agriculture and Natural Reasearch. Publication 8289.

Prabhat, N.J., Garima, G. Prameela, J. & Mehrotra, R. 2013. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: A potential gateway to sustainable agriculture. Greener Journal of Agricultural Sciences, 3(2): 73-84.

Raupach, G.S., Liu L., Murphy, J.F., Tuzun S. & Kloepper J.W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). Plant Disease, 80: 891-894.

Ryan, A.D., Kinkel, L.L. & Schottel, J.L. 2004. Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. Biochemical Science Technology, 14: 301–311.

Samac, D.A., Nix, R.J. & Oleson, A.E. 1998. Transmission frequency of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* to alfalfa seed and identification of the bacterium by PCR. Plant Disease, 82: 1362–1367.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory Guide for the Identification of Pant Pathogenic Bacteria. American Phytopathological Society, Paul, MN.

Sigmon, J. & Larcom, L.L. 1996. The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. Electrophoresis, Wiley Online Library, 17(10): 1524–1527.

Stajkovich, O., De Meyer, S., Milicic, B., Willems, A. & Delic D. 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Botanicaserbica, 33(1): 107–114.

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.

Vichova, J. & Kozova, Z. 2004. The virulence of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* strains and tests of alfalfa varieties for resistance to the wilt pathogen. Journal of Plant Protection Research, 44(2): 147–154.

Wilhelm, E., Arthofer, W., Schafleitner, R. & Krebs, B. 1998. *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castenea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 52: 105.

Inhibitation of alfalfa endophytic bacteria against *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* causal agent of wilt disease in *in vitro* and greenhouse conditions

Mitra Omidi Nasab, Gholam Khodakaramian
Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Corresponding author: Mitra Omidi Nasab, email: momidi68@yahoo.com

Received: Jun., 26, 2016 5 (1) 1-13 Accepted: Dec., 02, 2017

Abstract

Endophytic bacteria are important group of bacteria that produce phytohormones, antifungal and antibacterial agents, siderophore, nutrient competition and induced systemic resistance in the host, causing the biocontrol of plant pathogens. The aim of this study was to obtain endophytic isolates with antagonistic effects against the alfalfa wilt agent, *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* in the laboratory and greenhouse. In order to conduct this research study, samples and isolation of bacteria from alfalfa fields in Hamedan province were performed. Then, in the laboratory conditions, their antagonistic effects against *Cmi* were investigated. The experiments were conducted in laboratory on NA (Nutrient Agar) culture medium in a completely randomized design with three replications by determining the pathogenic bacterium growth inhibition. The obtained data were analyzed by Statistical Analysis System (SAS) software and the means were compared by Duncan's multiple range test. Based on the laboratory studies results, eight antagonistic strains with inhibition diameter higher than 6 mm were selected for the greenhouse studies. In the greenhouse conditions, the strains were evaluated for their effects on increasing growth factors of alfalfa. The results showed that isolates 8 and 56 showed higher biocontrol efficacy. These isolates increased plant growth factors at 1% level statistical probability. The 16srRNA encoding genes of strains were amplified and sequenced. Result showed that they were belonged to the genera *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., *Escherichia coli*, *Sphingomonas paucimobilis* and *Paenibacillus glycanilyticus*. These isolates have been effective in biocontrol of wilt bacterial agents in the laboratory and greenhouse conditions, and increasing plant growth factors. Endophytic bacteria including *Bacillus subtilis* and *Sphingomonas paucimobilis* showed effective performance against pathogenic bacteria. In addition they had great impact on plant growth characteristics such as fresh weight, dry weight and plant height. These effects may be due to the production of antibiotics and induced systemic resistance to biological control of bacterial wilt disease in the laboratory and greenhouse and increasing plant growth factors. These results are promising and may be used in the biocontrol and the management of soil-borne diseases.

Keywords: endophytes, primer, inhibitation, bacterial wilt