گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٦، شماره ١، بهار ١٤٠٢

10.22055/ppr.2023.42716.1672

تاثیر باکتری اندوفیت *Enterobacter* sp. جداشده از ریشه ریحان روی تحریک رشد و مهار بیماری شانکر باکتریایی گیاهچه گوجه فرنگی

طاهره سلیمی[۱]، محمدرضا عالی منش[۲*]، آرش فاضلی[۳] و مجید بگ‌نظری[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۲- **نویسنده مسوول**: استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران (m.alimanesh@ilam.ac.ir)
۳- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
۴- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۰۵

چکیده

شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی با عامل *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) از بیماری‌های محدود کننده کشت گوجه‌فرنگی است. در این پژوهش ١٦ باکتری اندوفیت جدا شده از ریحان از نظر خاصیت ضد باکتریایی در آزمایشگاه علیه عامل شانکر باکتریایی و تحریک رشد و افزایش فنل کل گیاهچه‌های گوجه-فرنگی آزمایش شدند. در مرحله بعد بهترین باکتری جهت مهار شانکر باکتریایی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه آزمایش گردید. همچنین تغییرات فیزیولوژیکی مرتبط با فنل کل،کاتالاز و پراکسیداز در گیاهچه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. نهایتا شناسایی مولکولی بهترین جدایه باکتری توسط آغازگرهای ژن RNA ریبوزومی 16S صورت گرفت. هیچکدام از باکتری‌های اندوفیت خاصیت ضد باکتریایی علیه شانکر باکتریایی در شرایط آزمایشگاه نشان ندادند، اما جدایه ReA1 بیشترین ویژگی‌های تحریک رشد شامل وزن‌تر و خشک، ارتفاع ساقه و افزایش فنل کل را در مقایسه با سایر باکتری‌ها نشان داد. با فرض اثر احتمالی جدایه ReA1 در مکانیسم القای مقاومت در گوجه فرنگی، این جدایه علیه باکتری Cmm استفاده شد. نتایج نشان داد که این باکتری سبب کاهش پنجاه درصدی بیماری و افزایش فاکتورهای رشدی در گوجه فرنگی می‌شود. همچنین آنزیم های آنتی‌اکسیدانی شامل پراکسیداز،کاتالاز و میزان فنل کل در گیاهان تیمار شده با جدایه ReA1 در مقایسه با شاهد افزایش نشان دادند. براساس نتایج حاصل از توالی یابی جدایه ReA1 به عنوان باکتری *Enterobacter* sp. تشخیص داده شد. ریحان گیاه غیرمیزبان برای Cmm می‌باشد و باکتری‌های اندوفیت ریحان اثر مستقیم ضد باکتریایی علیه Cmm نداشتند. در عین حال *Enterobacter* sp. جدایه ReA1 قادر به مهار زیستی شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی با مکانیسم القاء مقاومت بود.

***کلیدواژه‌ها:* *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ، مهار زیستی ، فنل کل ، القاء مقاومت**

دبیر تخصصی: دکتر میلاد آئینی

Citation: Salimi, T., Alymanesh, M.R., Fazeli, A. & Bagnazari, M. (2023). Effect of endophytic bacterium *Enterobacter* sp. isolated from basil root on growth stimulation and control of tomato seedling bacterial canker disease. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *46*(1), 39-55. https://doi.org/10.22055/ppr.2023.42716.1672.

مقدمه

گوجه فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* L. یکی از اعضای تیره بادنجانیان[1] است، که منشأ آن دشت‌های ساحلی غرب آمریکای جنوبی می‌باشد (Knapp & Peralta, 2016). این گیاه از محصولات مهم کشاورزی در جهان محسوب می‌شود که به‌دلیل بالا بودن ارزش غذایی و نیز ارزش اقتصادی، با تولید ۱۸۲ میلیون تن دومین محصول مهم در جهان است (Al-Maawali et al., 2021). عامل پژمردگی باکتریایی و شانکر گوجه‌فرنگی *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* است که یک باکتری گرم مثبت متعلق به خانواده Microbacteriaceae می‌باشد. این بیماری از مخرب‌ترین بیماری‌های باکتریایی گوجه‌فرنگی در سراسر جهان می‌باشد و تحت قرنطینه‌های شدید بین‌المللی قرار دارد (Eichenlaub & Gartemann, 2011; Jang et al., 2022). این بیماری در اکثر مناطق کشت گوجه‌فرنگی در جهان گزارش شده است و باعث خسارات قابل توجه محصول هم در مزرعه و هم در گلخانه می‌شود (Kawaguchi & Tanina, 2014). اولین بار در سال ۱۹۰۹ بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی از گلخانه‌ای در ایالت میشیگان آمریکا گزارش شد (Sen et al., 2015) و در ایران در سال ۱۳۶۷ اولین نشانه‌های بیماری، در یک مزرعه گوجه‌فرنگی در حومه شهرستان ارومیه در استان آذربایجان غربی مشاهده گردید (Mazarei & Orumchi, 1993). این بیماری بعداً در ایران از مناطق مختلف ازجمله آذربایجان شرقی، فارس، زنجان و برخی مناطق دیگر در کشور گزارش گردید (Ansari et al., 2019). روش های مختلفی برای مهار این باکتری وجود داد که یکی از این روش‌های سازگار با محیط زیست مهار زیستی، استفاده از باکتری های مفید می باشد. یک گروه از این باکتری های مفید اندوفیت ها می باشند. در اوایل سال ۱۹۲۶، برای اولین بار حضور باکتری در بافت‌های سالم گیاهان گزارش شد و از دهه۱۹۴۰ گزارش‌های متنوعی از حضور باکتری‌های اندوفیت در بافت‌های مختلف گیاهی وجود داشته است (Hallmann et al., 1997). باکتری‌های اندوفیت گروه جالبی از میکروارگانیسم‌ها هستند که دارای فعالیت‌های مفید مختلفی درگیاهان هستند و توانایی کلونیزه کردن و زنده ماندن در بافت‌های داخلی گیاهان را بدون ایجاد آسیب ظاهری دارند (Hernández-Pacheco et al., 2021). اندوفیت‌های باکتریایی عملکردهای مهمی مانند افزایش تولید، تحریک رشد و نمو و نیز تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک را دارا هستند. علاوه بر آن باعث تحریک مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا شده و سطح تحمل را به انواع تنش های محیطی و زیستی افزایش می‌دهند (Afzal et al., 2019). این باکتری‌ها از ریشه‌ها، ساقه‌ها، برگ‌ها، دانه‌ها، گل‌ها و میوه‌های گونه‌های مختلف گیاهی جدا شده‌اند (Nawed & Chandra, 2015). با این حال، وجود آن‌ها در بافت‌های ریشه در مقایسه با بافت‌های هوایی گیاه شایع‌تر است (Omomowo & Babalola, 2019) و معمولاً در فضاهای بین سلولی بافت‌های زنده وجود دارند. زیرا این نواحی دارای اسیدهای آمینه، کربوهیدرات‌ها و مواد مغذی معدنی فراوان هستند (Ali et al., 2022). تنوع اندوفیت‌ها نیز تحت تأثیر ویژگی‌های گیاه میزبان، از جمله بافت، مرحله رشد، ژنوتیپ و وضعیت سلامتی است (Wu et al., 2021). باکتری‌های اندوفیت دارای طیف گسترده‌ای از اثرات روی میزبانشان هستند و فنوتیپ و رشد میزبان را به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که دارند، تحت تاثیر قرار می‌دهند. تحقیقات براساس دو کاربرد اصلی از این باکتری‌ها، شامل حفاظت گیاه در برابر بیماری‌ها و بهبود رشد گیاه است (Bacon & Hinton, 2006). تحقیقات نشان داده است که میکروب‌های اندوفیت مزایایی شامل افزایش توانایی برای تحمل تنش

1- Solanaceae

غیرزیستی، مبارزه یا سرکوب بیمارگرها و تقویت جریان مواد مغذی به گیاه و رشد آن را سبب می شوند (Omomowo & Babalola, 2019). ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گیاهی علفی، یک ساله و از خانواده نعناعیان می‌باشد که گیاهی ادویه‌ای، دارویی و به‌عنوان سبزی تازه نیز استفاده می‌شود. به علت وجود مواد موثره موجود در آن، بیشتر به‌عنوان یک گیاه دارویی معرفی شده است (Shahrajabian et al., 2020). از این گیاه باکتری‌های اندوفیت مختلفی گزارش شده است مثلا در تحقیقی از ریحان و نعناع (*Mentha arvensis*) باکتری‌های اندوفیت *Actinopolyspora*، *Streptomyces*، *Saccharopolyspora* و *Micromonospora* جداسازی شدند و این باکتری‌ها اثرات ضدقارچی علیه انواع قارچ‌های بیمارگر داشتند (Madhurama et al., 2014). گزارش‌های مختلفی در مورد دامنه میزبانی اندوفیت‌ها وجود دارد. برخی از باکتری‌های اندوفیت فقط قادر به تقویت رشد گیاهانی هستند که ارتباط بسیار نزدیک با میزبان طبیعی آن‌ها دارند (Ma et al., 2011) و برعکس، گزارش‌هایی از اندوفیت‌هایی وجود دارد که رشد میزبان‌های مختلف گیاهی را تقویت می کنند. در حالت دوم دامنه میزبانی وسیع اندوفیت‌ها، کاربرد آن‌ها در کشاورزی را افزایش می دهد. به عنوان نمونه باکتری *Burkholderia vietnamiensis* C12 جدا شده از گیاه دارویی *Ficus tikoua* Bur قادر به تحریک رشد برنج و مهار بیماری ناشی از *Rhizoctonia solani* روی این گیاه غیر میزبان بود (Meng, et al., 2023). انواع مختلفی از مکانیسم های مهار زیستی مانند تولید ترکیبات ضد باکتریایی، سیدروفور و غیره توسط باکتری‌های اندوفیت علیه بیمارگرها به کار می رود. یکی از این مکانیسم های مهم مقاومت القائی می باشد که در باکتری های اندوفیت نسبتا مهمتر از سایر عوامل مهار زیستی جدا شده از ریزوسفر یا اپیفیت و... است. اصطلاح مقاومت القایی یک اصطلاح عمومی برای حالت القایی مقاومت در گیاهان است که توسط القاءکننده‌های بیولوژیکی یا شیمیایی ایجاد می‌شود. در این حالت قسمت‌های مختلف گیاه که در معرض بیمارگر یا القاء کننده‌ها نبوده اند نیز در برابر حمله بعدی میکروب‌های بیماری‌زا محافظت می شوند. به‌طور کلی، مقاومت القائی حفاظت در برابر طیف وسیعی از بیمارگرها را ایجاد می‌کند (Pieterse et al., 2014). در این پژوهش تلاش می‌گردد باکتری های اندوفیتی از گیاه ریحان جداسازی گردد که در درجه اول قابلیت تحریک رشد و در درجه بعد توانایی کنترل بیماری در گیاه گوجه فرنگی را دارا باشند. جهت رسیدن به این هدف، غربالگری اولیه برای یافتن بهترین باکتری مفید در بر اساس ویژگی های تحریک رشدی آنها صورت می‌گیرد. در ادامه بعد از یافتن بهترین باکتری محرک رشد، توانایی این باکتری در کنترل بیماری شانکر باکتریایی گوجه فرنگی سنجیده می شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ریشه ریحان

نمونه‌برداری از ریشه‌های سالم ریحان در استان ایلام از شهر ایلام و شهر آسمان آباد انجام گرفت. ابتدا نمونه‌های ریشه با آب شهری برای زدودن گل و لای سطحی شستشو داده شدند. در ادامه قطعات ۳-۲ سانتی‌متری از ریشه‌ها تهیه گردید. این قطعات به‌مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضدعفونی شدند و بعد از سه بار شستشو، پنج دقیقه در هیپوکلریت سدیم دو درصد قرار گرفتند. در این مرحله نمونه‌ها پنج بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها به ظرف حاوی کلرید جیوه ۰/۱ درصد انتقال و دو دقیقه در آن قرار داده شدند؛ سپس نمونه‌ها مجدداً سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. در نهایت نمونه‌ها در هاون چینی سترون حاوی آب مقطر سترون کوبیده شدند و به کمک لوپ سترون در تمام سطح محیط کشت باکتریایی آگار مغذی (Merck) پخش گردیدند و در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند

(Yarte et al., 2022). بعد از خالص سازی برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها، آنها در گلیسرول ۲۰ درصد و در دمای منفی هفتاد درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

آماده‌سازی و کشت بذرها ، اندازه‌گیری وزن تر، خشک و ارتفاع گیاهچه در آزمایشگاه

بذور گوجه‌فرنگی رقم پتومچ (رقمی زودرس با میوه هایی سفت و دارای مقاومت به برخی آفات و بیماری ها) در زیر هود بیولوژیک (شرکت کاوش طب، هود لامینار کلاس ۲ تایپ A2 مدل BSC-L160)، با استفاده از الکل ۹۶ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد به مدت دو دقیقه ضد عفونی سطحی شدند و با آب مقطر سترون ۱۰ بار شستشو داده شدند. بذرهای سترون شده به ظروف حاوی مایه تلقیح باکتری اندوفیت (غلظت 10^8 cfu/ml) اضافه گردیدند و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی شیکر (ویجنز، آلمان) با دور ۱۲۰ و دمای ۲۸ درجه قرار داده شدند. پس از طی زمان مذکور، بذور بر روی فویل آلومینیومی سترون برای حذف رطوبت قرار گرفتند. بذور شاهد (عدم تلقیح توسط باکتری) و تیمار (تلقیح شده توسط باکتری) در سینی‌های کشت حاوی نسبت مساوی از کوکوپیت و پرلیت استریل شده در اتوکلاو،کشت داده شدند. پس از ۲۰ روز ، وزن‌تر گیاهچه اندازه‌گیری گردید. سپس گیاهچه‌ها داخل پاکت به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از خشک شدن گیاهچه ها، وزن خشک آن‌ها مجدداً اندازه‌گیری شد(Sánchez-Pérez et al., 2020). از ترازوی دقیق آزمایشگاهی (دقت ۰/۰۰۰۱ گرم ، ساخت ژاپن مدل GR-120) برای تعیین وزن تر وخشک و از کولیس برای تعیین ارتفاع گیاهچه استفاده گردید. این آزمون روی تمام باکتری‌های اندوفیت جداشده در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گردید که هر تکرار شامل پنج گیاهچه بود.

بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری علیه باکتری بیمارگر *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* در شرایط آزمایشگاهی

برای بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری علیه باکتری بیمارگر *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* جدایه Ta18 (تهیه شده از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز) ، از روش بخار کلروفرم استفاده گردید (Ryan et al., 2004). در این روش برای ارزیابی اثر تقابل اندوفیت و بیمارگر، مقداری از کشت ۴۸-۲۴ ساعته باکتری اندوفیت به صورت لکه‌ای روی محیط آگار مغذی کشت شد. پس از ۴۸ ساعت که باکتری رشد کرد، توسط پنبه‌ی آغشته به اتانول ۹۶ درصد پاک شد. در مرحله ظروف پتری به‌صورت وارونه قرار داده شدند و یک قطره کلروفرم روی درب ظروف پتری ریخته شد. پس از گذشت ۲۰دقیقه ، درب ظروف پتری برداشته شد و در زیر هود به مدت ۳۰ دقیقه هوادهی گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر (OD: ۰/۱ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر) به صورت یکنواخت روی محیط پخش گردید و به مدت ۷۲ساعت در انکوباتور (انکوباتور آزمایشگاهی میکروبیولوژی مدل XB032 ساخت فرانسه) نگهداری شد، پس از این مدت قطر هاله بازدارنده جهت بررسی اثر بازدارندگی اندازه‌گیری گردید. این آزمون در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌ها روی عامل شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت آگار مغذی کشت شدند و بعد از ۴۸-۲۴ ساعت سوسپانسیونی از کشت باکتری اندوفیت با غلظت 10^8 CFU/ml به‌وسیله آب مقطر استریل در طول موج ۶۰۰ نانومتر آماده شد و سوسپانسیون باکتری مانند مراحل ذکر شده در بخش قبل به بذور تلقیح گردید. در تیمارهای شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. سپس در سینی‌های کشت که حاوی کوکوپیت و پرلیت سترون بودند، کشت شدند. بعد از

سه هفته نشاهای گوجه‌فرنگی به گلدان‌های پلاستیکی که با مخلوطی از رس و ماسه استریل به نسبت ۲:۱ پر شده بود کشت شدند. جدایه Ta18 باکتری Cmm روی محیط کشت YDC کشت داده شدند و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند، پس از اینکه باکتری روی محیط کشت YDC رشد کرد، سوسپانسیونی با غلظت 1×10^8 CFU/ml تهیه شد. در مرحله دو برگی، مایه‌زنی Cmm با استفاده از یک سوزن تشریح حاوی ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری در قسمت ساقه (گره دو برگ اولیه) انجام شد. گیاهان در تیمار شاهد سالم با آب مقطر سترون با استفاده از سوزن مایه‌زنی شدند و در شاهد بیمار فقط گیاهانی که با باکتری اندوفیت تلقیح نشده بودند، تلقیح با Cmm صورت گرفت. این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و در شش تکرار (هر تکرار شامل سه گیاهچه) به روش Boudyach et al. (۲۰۰۱) با اندکی تغییرات در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ایلام انجام گرفت. دمای گلخانه در روز بین ۲۴ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در شب بین ۱۶ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد متغیر بود و آبیاری یک روز در میان انجام گردید. رطوبت نسبی گلخانه بین ۷۰٪ تا ۸۰ ٪ درصد حفظ شد.

تعیین شدت بیماری

ارزیابی شدت بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی با استفاده از مقیاس عددی صفر تا پنج ثبت شد. در این مقیاس صفر برابر با عدم وجود علائم پژمردگی در برگ، مقیاس عددی ۱ شامل اندکی پژمردگی (۱۰-۱ درصد برگ‌ها داری پژمردگی)، مقیاس عددی ۲ شامل ۲۵-۱۱ درصد پژمردگی، مقیاس عددی ۳ شامل پژمردگی ناحیه‌ای که در آن ۴۹-۲۶ درصد برگ‌ها پژمردگی همراه با کلروز داشتند، مقیاس عددی ۴ شامل واژگونی قابل توجه برگ‌ها که در آن ۷۴-۵۰ درصد از برگ‌ها پژمردگی داشتند و مقیاس عددی ۵ شامل پژمردگی کامل برگ‌ها بود. $DS\% = \sum n/5N \times 100$: $DS\% =$, disease severity (%) ۵: بالاترین نمره , $\sum n$: برابر با مجموع نمرات گیاهان تیمار است و N تعداد گیاهان (Shternshis et al., 2002).

اندازه‌گیری فنل کل

به منظور اندازه‌گیری فنل کل از روش Seevers et al. (۱۹۷۱) استفاده شد. ابتدا ۰/۱ گرم از برگ تر گیاه را در پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده شد و در تاریکی به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. در مرحله‌ی بعد یک میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته و در میکروتیوپ دیگر به آن یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد افزوده و حجم محلول با آب مقطر دوبار تقطیر به پنج میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم پنج درصد به آن افزوده شد. سپس محلول حاصل به مدت یک ساعت در تاریکی نگهداری شد و جذب هر نمونه در طول موج ۷۶۵ نانومتر قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید غلظت ترکیبات فنل کل بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید. برای هر آزمون شش تکرار زیستی در نظر گرفته شد.

آماده‌سازی عصاره آنزیمی و سنجش پروتئین کل

جهت تهیه عصاره آنزیمی یک گرم از نمونه‌های برگ فریز شده با ترازوی آزمایشگاهی وزن شدند و سپس روی یخ در هاون چینی تا ایجاد یک مخلوط همگن به کمک بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH=۷/۴) به خوبی ساییده شدند. نسبت استخراج ۱:۱۰ (وزنی/حجمی) (یک گرم برگ با ۱۰ میلی‌لیتر بافر) استفاده شد. در مرحله بعد مخلوط حاصل به لوله‌های فالکون ۱۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد و با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از پایان مرحله سانتریفیوژ، محلول شفاف رویی به میکروتیوپ‌های علامت‌گذاری شده منتقل و در فریزر منفی هفتاد درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. این نمونه‌ها جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز مورد استفاده قرار گرفتند.

جهت استخراج آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز بافر فسفات سدیم، با غلظت ۵۰ میلی مولار با pH= ۷ و حاوی دو میلی‌مولار EDTA استفاده شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول در برگ از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. یک میلی‌لیتر از معرف برادفورد به همراه ۱۰۰ میکرو لیتر عصاره آنزیمی پس از اختلاط کامل در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و جذب آن در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی در غلظت‌های ۲۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه محاسبه گردید.

اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش (Aebi, 1984) اندازه‌گیری شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی همراه با ۴۰۰ میکرولیتر از محلول بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی‌مولار و ۳۰۰ میکرولیتر H_2O_2 مخلوط شد و سرعت حذف H_2O_2 در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر برای یک دقیقه اندازه‌گیری شد. در این آزمایش به‌منظور صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، ۲ میلی‌لیتر از بافر حاوی H_2O_2 فاقد عصاره آنزیمی به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. میزان فعالیت این آنزیم با استفاده از ضریب خاموشی $۳۹/۴ mM^{-1}\ cm^{-1}$ بر اساس سرعت مصرف هیدروژن پراکسید در دقیقه به‌صورت زیر محاسبه شد: فعالیت آنزیم کاتالاز مساوی است با اختلاف جذب تقسیم بر عدد ۳۹/۴ ضربدر عدد ۱۰۰.

اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش Herzog and Fahimi (۱۹۷۳) اندازه‌گیری شد. ابتدا در هر دو کوئت نمونه مقدار سه میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ریخته شد و سپس به آن‌ها مقدار ۴/۵۱ میکرولیتر H_2O_2 ۳۰ درصد و مقدار ۳/۳۵ میکرولیتر ماده گایاکول افزوده شد. این دو کوئت در دستگاه اسپکتروفتومتر جاگیری شدند و عدد قرائت شده صفر شد. سپس به کوئت نمونه مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره گیاهی اضافه شد و بلافاصله تغییرات جذب به مدت یک دقیقه در طول موج ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنزیمی برحسب میلی‌مول در دقیقه به ازای هر میلی‌گرم پروتئین مورد بررسی قرار گرفت. ضریب خاموشی پراکسیداز در ۴۷۰ نانومتر $۸/۲ mM^{-1}\ cm^{-1}$ می‌باشد.

شناسایی باکتری

برای شناسایی مولکولی از آغازگرهای 27f (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و 1492r (5′- CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′) جهت تکثیر ژن 16S rRNA استفاده شد (Frank et al., 2008). پس از مشاهده باند در محدوده ۱۵۰۰-۱۴۵۰ جفت بازی، محصول PCR بعد از ارسال به شرکت معتبر (شرکت ژنتیک کدون) توالی‌یابی گردید. توالی‌های بدست آمده در پایگاه NCBI و با استفاده از نرم افزار BLAST N مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان مشابهت با توالی‌های مشابه در پایگاه داده‌ها بررسی گردید . جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم کلادوگرام از نرم افزار Mega 7 و روش Neiboer-joining استفاده شد. بر اساس وضعیت تاکسونومیکی هر باکتری Outgroup مناسب انتخاب و پس از همردیف کردن توالی‌های به‌دست آمده، کلادوگرام با هزار بار Bootstrap رسم گردید.

اندازه گیری ویژگی های عملکردی گوجه فرنگی تیمار شده با باکتری اندوفیت در شرایط گلخانه

در پایان مرحله آزمایش‌های گلخانه‌ای مطابق روش ذکر شده در بخش قبل، وزن تر، خشک (برحسب گرم) و ارتفاع گیاهچه (بر حسب میلی متر) اندازگیری گردید. تنها تفاوت با این مرحله این بود که زمان برداشت گیاه طولانی‌تر بود (سه هفته دیرتر تا علائم بیماری بروز کند).

آنالیز آماری

این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و در شش تکرار برای آزمون های فیزیولوژیکی و فاکتورهای رشدی و بیماریزایی انجام گردید. آزمون‌ها در قالب

طرح کاملا تصادفی و آنالیزهای آماری توسط نرم افزار SAS 9.1 انجام پذیرفت. میانگین داده‌های به دست آمده از سنجش شاخص‌ها با تجزیهٔ واریانس و ضریب اطمینان ۹۵ درصد با آزمون های LSD و دانکن انجام شد. در مورد شاخص بیماری از طریق آزمون ناپارامتری نیز محاسبات صورت گرفت.

نتایج

جدایه برتر باکتری

تعداد ۱۶ باکتری از ریحان جدا گردید. هیچکدام از این جدایه ها اثر ضدباکتریایی مستقیم روی محیط کشت علیه Cmm نشان ندادند. بهترین اثر رشدی و افزایش میزان فنل کل روی گیاهچه گوجه فرنگی مربوط به جدایه ReA1 بود، لذا این باکتری برای آزمون‌های کاهش بیماری زایی نیز مد نظر قرار گرفت. در سطح احتمال یک درصد این باکتری تمام فاکتورهای رشدی شامل وزن تر و خشک و ارتفاع ساقه را افزایش داد. همچنین میزان فنل کل در مقایسه با شاهد، افزایش قابل توجه داشت (جدول ۱). در بین شاخص‌های رشدی، بیشترین اثر مربوط به افزایش وزن خشک گیاهچه بود. تقریبا همه فاکتورها بیش از دو برابر افزایش نشان داد. از طرفی در مطالعات و تحقیقات مختلف نشان داده شده است که عمدتاً باکتری‌های اندوفیتی که روی افزایش رشد و خصوصاً افزایش ترکیبات دفاعی گیاه مانند فنل کل، موثر هستند، در ایجاد حفاظت از گیاه در مقابل انواع بیمارگرهای گیاهی نیز موثر خواهند بود. چون این باکتری روی هر چهار فاکتور فنل کل، ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک موثر بود (جدول ۱)؛ برای ادامه آزمایش‌ها جهت بررسی کاهش بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت تا نقش احتمالی پدیده مقاومت القایی در مهار Cmm اثبات گردد.

جدول ۱- اثرات محرک رشدی و افزایش فنل کل روی گیاهچه گوجه فرنگی در اثر تلقیح شانزده جدایه باکتری اندوفیت و تفاوت فاحش جدایه ReA1 در مقایسه با سایر جدایه‌ها و شاهد

Table 1. The Effects of growth stimulant and increase of total phenol on tomato seedlings due to the inoculation of sixteen endophytic bacterial isolates and the significant difference of ReA1 isolate compared to other isolates and control

Total Phenol	Stem height	Dry weight	Wet weight	Isolates
5.287±0.039 a	11.83±0.624 a	0.473±0.008 a	3.183±0.116 a	**ReA1**
3.280±0.057 ef	8.50±0.408 b	0.374±0.005 b	2.193±0.155 c	**ReA11**
3.103±0.095 fg	6.67±1.027 c	0.227±0.007 f	1.390±0.033 e	**ReA13**
3.257±0.079 ef	8.67±0.850 b	0.270±0.009 e	1.990±0.110 d	**ReA4**
3.470±0.073 cd	9.00±0.408 b	0.290±0.015 d	2.307±0.182 c	**ReA5**
3.973±0.097 b	8.83±0.236 b	0.316±0.023 c	2.967±0.110 b	**ReA6**
3.203±0.079 fg	5.33±0.236 d	0.145±0.008gh	1.247±0.069 ef	**ReA7**
3.437±0.118 de	5.83±0.471 cd	0.148±0.011gh	1.250±0.049 ef	**ReA8**
3.187±0.128 fg	5.67±0.471 cd	0.148±0.006gh	1.293±0.090 ef	**ReA9**
3.187±0.071 fg	5.83±0.236 cd	0.145±0.006gh	1.273±0.073 ef	**ReA10**
3.237±0.058 f	6.50±0.408 cd	0.145±0.007gh	1.273±0.046 ef	**Re12**
3.517±0.078 cd	5.67±0.471 cd	0.140±0.006gh	1.297±0.079 ef	**Re13**
3.017±0.045 g	5.50±0.408 cd	0.138±0.005gh	1.277±0.096 ef	**Re15**
3.440±0.098 de	5.83±0.236 cd	0.141±0.009gh	1.250±0.071 ef	**Re10**
3.647±0.120 c	6.17±0.236 cd	0.153±0.009 g	1.407±0.156 e	**R12**
3.473±0.057 cd	6.17±0.624 cd	0.151±0.006 g	1.363±0.057 ef	**Re4**
3.233±0.054 f	5.50±0.408 cd	0.126±0.002 h	1.140±0.037 f	**Control**

در هر ستون میانگین هایی که دارای حرف مشترک هستند بر اساس آزمون LSD و دانکن در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی داری نمی باشد.

*The numbers in each column that have a same letter do not have significant difference in 5% level based on LSD and Duncan's test.

شدت بیماری

باکتری اندوفیت ReA1 بدون اثر مستقیم ضدباکتریایی علیه Cmm توانست بیماری را کاهش دهد. شدت بیماری در کاربرد توام ReA1 و Cmm حدود ۴۳ درصد در مقایسه با گیاه شاهد بیمار (Cmm تنها) کاهش یافت (جدول ۲). آنالیز آماری معنی‌دار بودن کاهش بیماری در سطوح مختلف را کاملا نشان داد هر چند جهت سهولت مشاهده نتایج در نمودار، محاسبه با آزمون‌های پارامتری نشان داده شده است اما محاسبات با آزمون ناپارامتری نیز در معنی‌داری نتایج تغییری ایجاد نکرد.

فاکتورهای رشدی

باکتریReA1 توانست میزان فاکتورهای رشدی وزن تر (شکل 1A) و خشک (شکل 1B) و ارتفاع ساقه (شکل1C) را افزایش دهد. میزان هر سه مورد به ترتیب از بیشترین به کمترین مربوط به کاربرد ReA1 تنها،کاربرد توام ReA1 و Cmm ، شاهد فاقد باکتری و Cmm تنها بود. هر چند در مورد ارتفاع ساقه بین کاربرد ReA1 تنها و کاربرد توام ReA1 و Cmm اختلاف مشاهده شده، معنی‌دار نبود.

بررسی تغییرات فیزیولوژیکی

جدایه ReA1 توانست میزان فنل کل (شکلA۲)، پراکسیداز (شکل2B) و کاتالاز (شکل2C) را افزایش دهد به نحوی که عمدتاً میزان ترکیبات به ترتیب از بیشترین به کمترین مربوط به کاربرد توام ReA1 و ReA1،Cmm تنها، Cmm تنها و شاهد فاقد باکتری بود که در سطح ۰/۰۰۰۱ درصد معنی‌دار بودند. تنها مورد استثناء میزان فنل کل در کاربرد ReA1 تنها و Cmm تنها بود که اختلاف معنی‌داری نشان نداد. این تغییرات فیزیولوژیکی مشاهده شده به همراه کاهش بیماری بر دخیل بودن مکانیسم مقاومت القائی بعد از کاربرد این باکتری تاکید می کند.

شناسایی باکتری

توالی به‌دست آمده با سایر توالی‌ها در بانک اطلاعات NCBI توسط نرم افزار BlastN همتراز شدند. نتایج نشان داد که جدایه ReA1 به جنس .*Enterobacter* sp بالاترین شباهت را دارد (میزان مشابهت ۱۰۰ درصد و E.value معادل صفر با برخی توالی های جنس مذکور مشاهده گردید). برای اطمینان بیشترکلادوگرام (شکل 3) با مقایسه این جدایه با سایر باکتری‌های مشابه رسم گردید و مطابق انتظار بیشترین شباهت به برخی گونه‌های .*Enterobacter* sp وجود داشت و Outgroup نیز بیشترین اختلاف را با جدایه مورد نظر داشت.

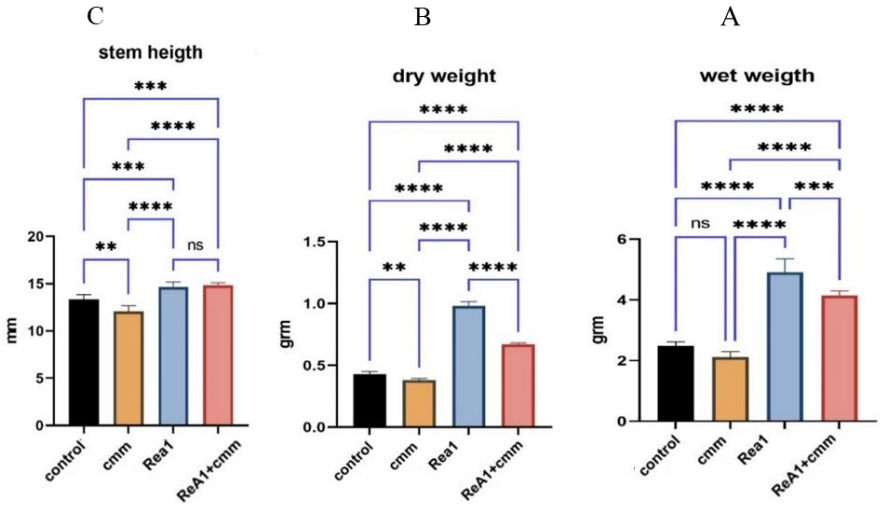
بحث

برخی از میکروارگانیسم‌ها در بافت‌های داخلی گیاه ساکن هستند و به‌صورت اندوفیت می‌باشند. اندوفیت‌های باکتریایی قسمت‌های مختلف گیاه را کلونیزه می‌کنند (Dasa et al., 2017). تحقیقات بر روی میکروارگانیسم‌های اندوفیت از گیاهان مختلف نشان داده است که این باکتری‌ها قابلیت کاربرد به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه، عوامل مهار زیستی و نیز کودهای زیستی را دارند (Alaylar, 2022).

جدول ۲- مقایسه‌های شدت بیماری در گیاهچه گوجه فرنگی شامل باکتری بیمارگر تنها (Cmm)؛ کاربرد تلقیح باکتری بیمارگر و اندوفیت (ReA1+Cmm)؛ تلقیح باکتری اندوفیت تنها (ReA1) و شاهد تلقیح شده با آب به جای باکتری (Control).

Table 1. Comparisons of disease severity in tomato seedlings including the inoculation of pathogenic bacteria alone (Cmm); Inoculation of pathogenic bacteria and endophytic bacterium (ReA1+Cmm); Inoculation of endophytic bacterium alone (ReA1) and control inoculated with water instead of bacteria (Control).

Disease severity (%)	Isolates
0 c	ReA1
%۵۳.۳۳ b	ReA1+Cmm
%۹۳.۳۳ a	Cmm
0 c	Control

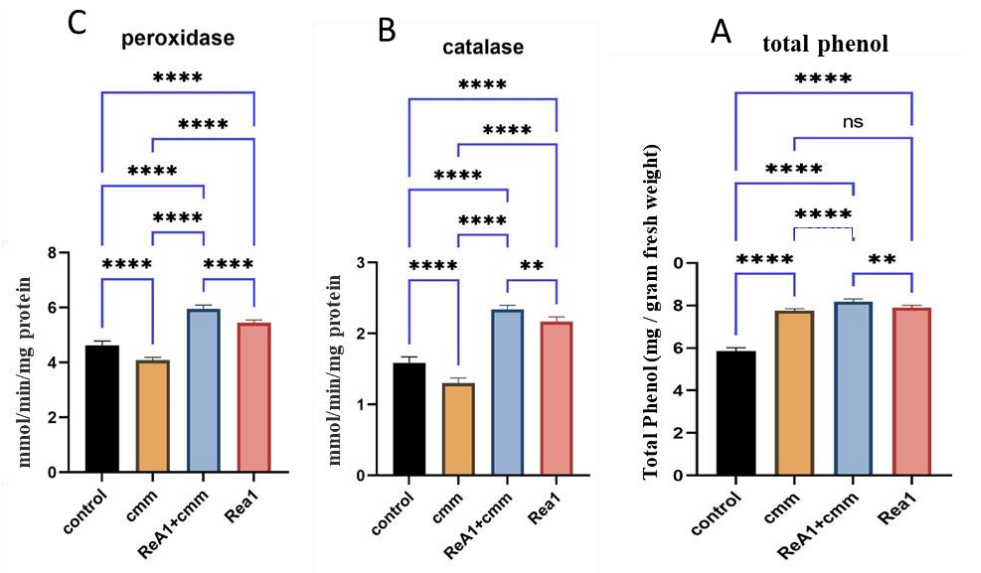


شکل ۱- تاثیرات رشدی در اثر تلقیح جدایه ReA1 و Cmm به صورت تنها و توام روی مقدار وزن تر (A) ، خشک (B) و ارتفاع ساقه (C) در گیاهچه گوجه فرنگی . * , , *** و **** : به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ ، ۱ ، ۰/۱ و ۰/۰۱ درصد را نشان می‌دهد.**

Figure 1. Growth effects due to inoculation of ReA1 isolate and Cmm separately and in combination on the amount of fresh weight (A), dry weight (B) and stem height (C) in tomato seedlings. *, **, * and****: show significance at the probability level of 5, 1, 0.1 and 0.01 percent, respectively.**

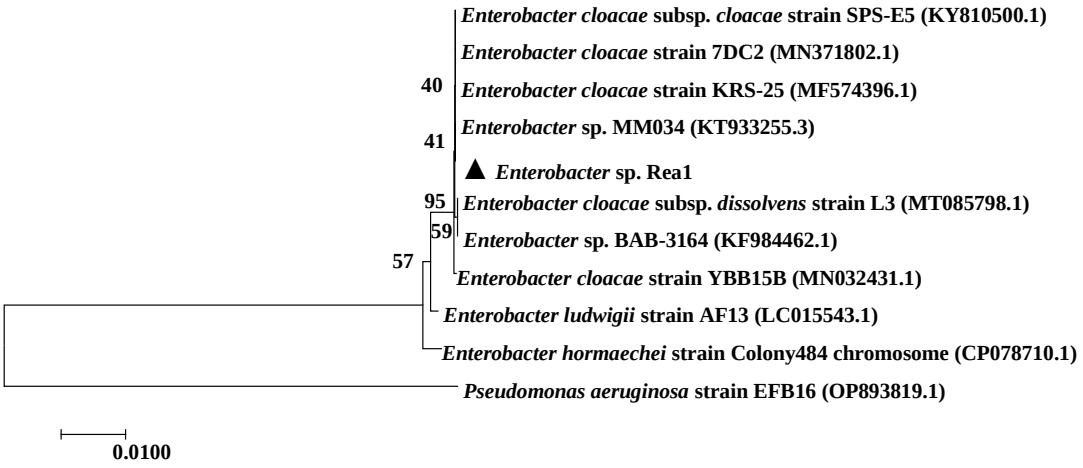
جنس *Enterobacter* sp. از ریحان در این تحقیق جداسازی گردید. طبق مطالعات انجام شده این جنس باکتریایی در خانواده نعناعیان از گیاهان آویشن (Abdelshafy Mohamad et al., 2020)، گیاه رزماری (Sharma et al., 2021)، گیاه *Ziziphora capitata* (Egamberdieva et al., 2017) و *Ocimum sanctum* (Panigrahi et al., 2020) به‌عنوان اندوفیت جداسازی شده است. گیاهان ساز وکارهای دفاعی متعددی در برابر اغلب بیمارگرها دارند. القای مقاومت در گیاهان سال‌های طولانی می‌باشد که شناخته شده است و به معنی بالابردن مقاومت گیاه با تحریک سیستم دفاعی آن توسط یک محرک می‌باشد (Mandal, 2010). مقاومت سیستمیک القاشده توسط باکتری‌های تحریک کننده رشد به‌صورت سیستمیک در بعضی از گیاهان ایجاد می‌شود. در واقع گیاهان با مقاومت القایی که نوعی از پاسخ میزبان است که رشد بیمارگرها را محدود می‌کند، به آلودگی پاسخ می‌دهند. تحقیقات نشان داده است باکتری‌های اندوفیت مقاومت سیستمیک القایی (ISR) را برای محافظت از گیاهان در برابر بیمارگرها بدون نشان دادن هیچ‌گونه واکنش فوق حساسیتی تحریک می‌کنند(Safara et al., 2022). چون مقاومت القائی ایجاد شده توانایی حفاظت عمومی علیه طیف گسترده‌ای از بیمارگرها را دارد (Jacob et al., 2020)، در این تحقیق جدایه sp. ReA1 *Enterobacter* با پیش فرض احتمالی قابلیت ایجاد مقاومت القائی علیه Cmm روی گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گرفت. در مورد گیاه گوجه فرنگی در تحقیقی مشخص گردید که باکتری های اندوفیت مقاومت علیه *Ralstonia syzygii subsp. indonesiensis* را ایجاد می‌کنند (Yanti, 2019).

از اولین مراحل از فعالیت‌های دفاعی گیاه تجمع سریع ترکیبات فنلی در محل آلودگی می‌باشد که رشد بیمارگرها را کند یا محدود می‌کند (Egert & Tevini, 2002). ترکیبات فنلی به عنوان ضدمیکروبی عمل می‌کنند و برای دفاع میزبان در تعامل بیمارگر میزبان حیاتی می‌باشند. ترکیبات فنلی استحکام مکانیکی و فیزیکی دیواره سلول میزبان را افزایش داده و باعث مهار تهاجم بیمارگر می‌شوند (M'piga et al., 1997).



شکل ۲- تغییرات فیزیولوژیکی در اثر کاربرد جدایه ReA1 **و** Cmm **به صورت تنها و توام روی میزان فنل کل** (A) **، کاتالاز** (B) **و پراکسیداز** (C) **در گیاهچه‌های گوجه فرنگی.** *, **, *** و **** **: به ترتیب معنی دار بودن در سطح احتمال ۵ ، ۱ ، ۰/۱ و ۰/۰۱ درصد را نشان می دهد.**

Figure 2. Physiological changes due to inoculation of ReA1 isolate and Cmm separately and in combination on the amount of total phenol (A), catalase (B) and peroxidase (C) in tomato seedlings. *, **, * and****: show significance at the probability level of 5, 1, 0.1 and 0.01 percent, respectively.**



شکل۳- کلادوگرام به‌دست آمده برای جدایه ReA1 **. درخت فیلوژنی به کمک نرم افزار** Mega 7 **و با روش** neighbor-joining **با اعتبارسنجی** bootstrap **در ۱۰۰۰ تکرار رسم گردید.** Outgroup **از جنس** *Pseudomonas* **انتخاب گردید و بیشترین اختلاف را با جدایه** ReA1 **نشان داد.**

Figure 3. Cladogram obtained for ReA1 isolate. The phylogenetic analysis was performed using the neighbor-joining method with 1000 replicates of bootstrapping using the MEGA7 softwar. Outgroup was selected from *Pseudomonas* genus and it had the highest distance with the ReA1 isolate.

پراکسیدازها در اثر تنش‌های زیستی فعال شده و در نتیجه‌ی تیمار گیاه با عوامل آنتاگونیست افزایش پیدا می‌کنند. این آنزیم ها گروهی از آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو هستند که منجر به تجزیه آب اکسیژنه شده و سلول را در برابر مقادیر سمی H_2O_2 محافظت می‌کنند (Parida & Das, 2005). برخی از گونه های

Bacillus اندوفیت قادر به افزایش پراکسیداز در گوجه فرنگی بودند (Lanna-Filho et al., 2013). همچنین باکتری های اندوفیت *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas putida* که بیماری پژمردگی گوجه فرنگی ایجاد شده توسط *Fusarium oxysporum* f.sp *lycopersici* را کاهش دادند باعث افزایش میزان پراکسیداز شدند (Hassanein & Al-Amari, 2021). یکی از اولین سطوح دفاع گیاه علیه حمله بیمارگر، دیواره‌ی سلولی می‌باشد و پراکسیدازها در فرایند سنتز دیواره سلولی نقش کلیدی دارند و پراکسیداز یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز لیگنین می‌باشند (Blee et al., 2003). آنزیم کاتالاز (CAT) منجر به تجزیه پراکسیدهیدروژن (H2O2) می‌شود (Gill & Tuteja, 2010). این آنزیم به‌عنوان یک آنزیم آنتی اکسیدانی عمل می‌کند همچنین در کاهش اثرات تخریبی اتم فعال اکسیژن، حذف و جاروب کردن پراکسیدهیدروژن تولید شده در پراکسی زوم‌ها نیز نقش مهمی را ایفا می‌کند (Simova-Stoilova et al., 2008). در این پژوهش ترکیبات فنلی، پراکسیداز و کاتالاز در اثر تیمار باکتریایی افزایش نشان دادند که با توجه به نقش این ترکیبات و آنزیم‌ها در کاهش بیماری این حالت قابل توجیه است.

این تحقیق با این فرض انجام گردید که باکتری‌های اندوفیت جدا شده از ریحان قادر به حفاظت سایر گیاهان دیگر (مانند گوجه‌فرنگی) در مقابل بیمارگرها از طریق مقاومت القایی می‌باشند، که این موضوع تا حد زیادی دراین تحقیق به اثبات رسید. چون یک ویژگی و مزیت این مکانیسم این است که عمدتاً دامنه اثر آن روی طیف وسیعی از انواع گی اهان و بیماری‌ها می باشد.

در پژوهشی مشابه تحقیق اخیر، باکتری‌های اندوفیت از گیاه ریحان جداسازی شدند و در برابر *Rhizoctonia solani* عامل بیماری بلایت غلاف در برنج مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج بیانگر این بود که سویه‌های انتخابی *Bacillus altitudinis* GTS-16، *B. tequilensis* BTL-4 و *B. safensis* BTL-5 با تغییر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مرتبط با دفاع در برنج تحت شرایط تنش بیماری‌زایی، مقاومت سیستمیک را القاء کردند و تولید بالای آنزیم‌هایی مرتبط با دفاع مانند پراکسیداز را باعث شدند (Sahu et al., 2020).

همچنین مطالعات زیادی اثر توائم تحریک رشد و مهار زیستی برخی باکتری‌ها را نشان داده است (Wang et al., 2021). در پژوهش اخیر نیز این مطلب اثبات گردید به نحوی که باکتری ReA1 علاوه بر مهار قابل توجه بیماری، وزن تر و خشک و ارتفاع گیاهچه را نیز افزایش داد. هر چند در ادامه پیشنهاد می‌گردد که اثر این باکتری تا مرحله باردهی گیاه بررسی گردد چون بسیاری از تحقیقات هم نشان داده است که اثرات چشمگیری که در مرحله گیاهچه یا جوانه زنی بذور مشاهده می‌شود (مثل اثرات دو یا سه برابر شدن فاکتورهای رشد در این تحقیق) در مراحل بلوغ و میوه دهی خود را به میزان کمتری نشان می‌دهند. همچنین روی سایر گیاهان گلخانه‌ای و سایر بیماری‌های مختلف، این باکتری آزمایش گردد تا دامنه اثر آن برای کاربرد به عنوان عامل مهار زیستی یا کود زیستی به صورت دقیق‌تری تعیین گردد. در این تحقیق سه ترکیب و آنزیم مهم که جهت اثبات القاء مقاومت در گیاهان به کار می رود، بررسی گردید. در عین حال به منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات فیزیولوژیکی که در گیاهان بعد از تلقیح باکتری روی می‌دهد؛ در تحقیقات آینده بهتر است بررسی تغییرات تعداد بیشتری از آنزیم‌ها و ترکیبات دفاعی در گوجه فرنگی یا سایر گیاهان انجام پذیرد چون تعداد ترکیبات زیادی در این حوزه جهت مطالعه وجود دارد.

باکتری *Enterobacter* sp. ReA1 جدا شده از گیاهی مربوط به خانواده لامیاسه (گیاه ریحان) روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی از خانواده سولاناسه آزمایش شد که بدون تأثیر مستقیم ضدباکتریایی توانست بیماری شانکر باکتریایی را کاهش دهد.

اثرات اصلی احتمالی این باکتری در مهار بیماری، با پدیده مقاومت القایی و افزایش ترکیبات دفاعی و ضدمیکروبی در گیاه مرتبط می‌باشد. دامنه‌ی تأثیر مفید این باکتری اندوفیت روی گیاهی متفاوت احتمال کاربردی بودن این باکتری در کشاورزی به عنوان عامل مهار زیستی روی انواع گیاهان و علیه طیف گسترده ای از بیماری‌ها را افزایش می‌دهد. همچنین این باکتری تحریک رشد گیاه را سبب گردید که استفاده همزمان از این باکتری به عنوان کود زیستی و عامل مهار زیستی را ممکن می‌سازد.

سپاس‌گزاری

از تمام کارکنان و مسئولین دانشگاه ایلام به عنوان تامین کننده هزینه و امکانات این پژوهش کمال قدردانی را داریم. از جناب آقای دکتر سید محسن تقوی عضو هیات علمی گروه گیاهپزشکی دانشگاه شیراز، برای تامین برخی جدایه‌های بیمارگر سپاسگزاریم.

References

Abdelshafy Mohamad, O. A., Ma, J.-B., Liu, Y.-H., Zhang, D., Hua, S., Bhute, S., Hedlund, B. P., Li, W.-J., & Li, L. (2020). Beneficial endophytic bacterial populations associated with medicinal plant *Thymus vulgaris* alleviate salt stress and confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *Frontiers in plant science*, 11, 47. https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00047.

Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. In *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126).

Afzal, I., Shinwari, Z. K., Sikandar, S., & Shahzad, S. (2019). Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiological research, 221, 36-49. https://doi: 10.1016/j.micres.2019.02.001.

Alaylar, B. (2022). Isolation and characterization of culturable endophytic plant growth-promoting *Bacillus* species from *Mentha longifolia* L. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, *46(1)*, 73-82. https://doi: 10.3906/tar-2109-24.

Ali, B., Hafeez, A., Javed, M. A., Afridi, M. S., Abbasi, H. A., Qayyum, A., Batool, T., Ullah, A., Marc, R. A., & Al Jaouni, S. K. (2022). Role of endophytic bacteria in salinity stress amelioration by physiological and molecular mechanisms of defense: *A comprehensive review*. *South African Journal of Botany*, 151, 33-46. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.09.036.

Al-Maawali, S. S., Al-Sadi, A. M., Ali Khalifa Alsheriqi, S., Nasser Al-Sabahi, J., & Velazhahan, R. (2021). The potential of antagonistic yeasts and bacteria from tomato phyllosphere and fructoplane in the control of Alternaria fruit rot of tomato. All Life, 14(1), 34-48. https://doi: 10.1080/26895293.2020.1858975.

Ansari, M., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., Valenzuela, M., Siri, M. I., & Osdaghi, E. (2019). Multiple introductions of tomato pathogen Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis into Iran as revealed by a global-scale phylogeographic analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(24), e02098-19. https://doi.org/10.1128/AEM.02098-19.

Bacon, C. W., & Hinton, D. M. (2006). Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In *Plant-associated bacteria* (pp. 155-194). Springer, Dordrecht. 10.1007/978-1-4020-4538-7_5.

Blee, K. A., Choi, J. W., O'Connell, A. P., Schuch, W., Lewis, N. G., & Bolwell, G. P. (2003). A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry*, *64(1)*, 163-176. https://doi: 10.1016/s0031-9422(03)00212-7.

Boudyach, E. H., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E., & Aoumar, A. A. B. (2001). Selection of antagonistic bacteria of Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Science and Technology*, *11*(1), 141-149. https://doi.org/10.1080/09583150020029817.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Dasa, I., Pandaa, M. K., Rathb, C. C., & Tayungc, K. (2017). Bioactivities of bacterial endophytes isolated from leaf tissues of *Hyptis suaveolens* against some clinically significant pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(8), 131-136. https://doi:10.7324/JAPS.2017.70818.

Egamberdieva, D., Wirth, S., Behrendt, U., Ahmad, P., & Berg, G. (2017). Antimicrobial activity of medicinal plants correlates with the proportion of antagonistic endophytes. *Frontiers in microbiology*, *8*, 199. https://doi: 10.3389/fmicb.2017.00199.

Egert, M., & Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (Allium schoenoprasum). Environmental and Experimental Botany, 48(1), 43-49. https://doi: 10.1016/S0098-8472(02)00008-4.

Eichenlaub, R., & Gartemann, K.-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: molecular investigation of gram-positive bacterial plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1). https://doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095258.

Frank, J.A., Reich, C.I., Sharma, S., Weisbaum, J.S., Wilson, B.A. and Olsen, G.J. (2008). Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology*, *74(8)*, pp.2461- 2470. https://doi: 10.1128/AEM.02272-07.

Gartemann, K.-H., Abt, B., Bekel, T., Burger, A., Engemann, J., Flügel, M., Gaigalat, L., Goesmann, A., Gräfen, I., & Kalinowski, J. r. (2008). The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity. *Journal of Bacteriology*, *190(6)*, 2138-2149. https:// doi: 10.1128/JB.01595-07.

Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, *48(12)*, 909-930. https:// doi: 10.1016/j.plaphy.2010.08.016.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W., & Kloepper, J. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian journal of microbiology*, 43(10), 895-914. https://doi: 10.1139/m97-13.

Hernández-Pacheco, C. E., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Flores, A., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2021). Tissue-specific diversity of bacterial endophytes in Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa* Brot. ex Horm.), and screening for their multiple plant growth-promoting activities. *Current Research in Microbial Sciences*, *2*, 100028. https://doi: 10.1016/j.crmicr.2021.100028.

Herzog, V., & Fahimi, H. D. (1973). A new sensitive colorimetric assay for peroxidase using 3, 3′-diaminobenzidine as hydrogen donor. *Analytical biochemistry*, 55(2), 554-562. https:// doi: 10.1016/0003-2697(73)90144-9.

Hassanein, M. A. F., & Al-Amari, A. (2021). Endophytic Bacteria as Apotential Agent for Control of Tomato Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp *Lycopersici*. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, 3119-3132. 10.3389/fmicb.2021.731764. eCollection 2021.

Jacob, J., Krishnan, G. V., Thankappan, D., & Amma, D. K. B. N. S. (2020). Endophytic bacterial strains induced systemic resistance in agriculturally important crop plants. In *Microbial Endophytes* (pp. 75-105). Woodhead Publishing. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00004-1.

Jang, H., Kim, S. T., & Sang, M. K. (2022). Suppressive Effect of Bioactive Extracts of *Bacillus* sp. H8-1 and *Bacillus* sp. K203 on Tomato Wilt Caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Microorganisms*, *10(2),* 403. https:// doi: 10.3390/microorganisms10020403.

Knapp, S., & Peralta, I. E. (2016). The tomato (*Solanum lycopersicum* L., Solanaceae) and its botanical relatives. *The tomato genome*, 7-21. 10.1007/978-3-662-53389-5_2.

Kawaguchi, A., & Tanina, K. (2014). Genetic groups of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* identified by DNA fingerprinting and the effects of inoculation methods on disease development. *European journal of plant pathology*, *140(3)*, 399-406. https://doi: 10.1007/s10658-014-0475-9.

Lanna-Filho, R., Souza, R. M., Magalhães, M. M., Villela, L., Zanotto, E., Ribeiro-Júnior, P. M., & Resende, M. L. (2013). Induced defense responses in tomato against bacterial spot by proteins synthesized by endophytic bacteria. *Tropical Plant Pathology*, *38*, 295-302.https://doi.org/10.1590/S1982-56762013005000011.

Ma, Y., Rajkumar, M., Zhang, C., & Freitas, H. (2016). Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation. *Journal of environmental management*, 174, 14-25. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.02.047.

Madhurama, G., Sonam, D., Urmil, P. G., & Ravindra, N. K. (2014). Diversity and biopotential of endophytic actinomycetes from three medicinal plants in India. *African Journal of Microbiology Research*, 8(2), 184-191. https://doi: 10.5897/AJMR2012.2452.

Mandal, S. (2010). Induction of phenolics, lignin and key defense enzymes in eggplant (*Solanum melongena* L.) roots in response to elicitors. *African Journal of Biotechnology*, *9(47)*, 8038-8047. https://doi: 10.5897/AJB10.984.

Mazarei, M., & Orumchi, S. (1993). Investigation of bacterial canker of tomato in West Azarbaidjan. In Proceedings of the 11th Plant Protection Congress of Iran 28 Aug.-2 Sep. 1993 Rasht.

Meng, X. J., Medison, R. G., Cao, S., Wang, L. Q., Cheng, S., Tan, L. T., ... & Zhou, Y. (2023). Isolation, identification, and biocontrol mechanisms of endophytic Burkholderia vietnamiensis C12 from Ficus tikoua Bur against *Rhizoctonia solani*. *Biological Control, 178*, 105132. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105132.

M'piga, P., Belanger, R., Paulitz, T., & Benhamou, N. (1997). Increased resistance *to Fusarium oxysporumf*. sp. *radicis-lycopersiciin* tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescensstrain* 63-28. *Physiological and molecular plant pathology, 50(5),* 301-320. https://doi: 10.1006/pmpp.1997.0088.

Nawed, A., & Chandra, R. (2015). Endophytic bacteria: optimizaton of isolation procedure from various medicinal plants and their preliminary characterization. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 8(4),* 233-238.

Omomowo, O. I., & Babalola, O. O. (2019). Bacterial and fungal endophytes: tiny giants with immense beneficial potential for plant growth and sustainable agricultural productivity. *Microorganisms, 7(11),* 481. https:// doi: 10.3390/microorganisms7110481.

Ordookhani, K., Sharafzadeh, S., & Zare, M. (2011). Influence of PGPR on growth, essential oil and nutrients uptake of sweet basil. *Advances in Environmental Biology, 5(4),* 672-677.

Panigrahi, S., Mohanty, S., & Rath, C. (2020). Characterization of endophytic bacteria Enterobacter cloacae MG00145 isolated from Ocimum sanctum with Indole Acetic Acid (IAA) production and plant growth promoting capabilities against selected crops. *South African Journal of Botany*, 134, 17-26. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.09.017.

Parida, A. K., & Das, A. B. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety, 60(3),* 324-349. https:// doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.010.

Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S., & Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, 52, 347-375. https:// doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102340. Epub 2014 Jun 2.

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. *Biocontrol Science and Technology, 14(3),* 301-311. https://doi/abs/10.1080/09583150410001665187.

Sahu, P. K., Singh, S., Gupta, A. R., Gupta, A., Singh, U. B., Manzar, N., Bhowmik, A., Singh, H. V., & Saxena, A. K. (2020). Endophytic *bacilli* from medicinal-aromatic perennial *Holy basil* (*Ocimum tenuiflorum* L.) modulate plant growth promotion and induced systemic resistance against *Rhizoctonia solani* in rice (*Oryza sativa* L.). *Biological control*, 150, 104353. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104353.

Safara, S., Harighi, B., Bahramnejad, B. and Ahmadi, S. (2022). Antibacterial activity of endophytic bacteria against sugar beet root rot agent by volatile organic compound production and induction of systemic resistance. *Frontiers in Microbiology*, 13. https:// doi: 10.3389/fmicb.2022.921762.

Sánchez-Pérez, B. N., Zenteno-Rojas, A., Rincón-Molina, C. I., Ruíz-Valdiviezo, V. M., Gutiérrez-Miceli, F. A., Vences-Guzmán, M. A., Villalobos-Maldonado, J. J., & Rincón-Rosales, R. (2020). Rhizosphere and endophytic bacteria associated to *Ocimum basilicum* L. with decaclorobiphenyl removal potential. *Water, Air, & Soil Pollution*, *231*(3), 1-15. https://doi.org/10.1007/s11270-020-04481-6.

Shahrajabian, M. H., Sun, W., & Cheng, Q. (2020). Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): A review. *International Journal of Food Properties*, *23*(1), 1961-1970. https://doi.org/10.1080/10942912.2020.1828456.

Seevers, P., Daly, J., & Catedral, F. (1971). The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant physiology*, 48(3), 353-360. https://doi.org/10.1104/pp.48.3.353.

Sen, Y., van der Wolf, J., Visser, R. G., & van Heusden, S. (2015). Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance, and interactions. *Plant Disease, 99(1),* 4-13. https:// doi: 10.1094/PDIS-05-14-0499-FE.

Sharma, M., Sood, G., & Chauhan, A. (2021). Bioprospecting beneficial endophytic bacterial communities associated with *Rosmarinus officinalis* for sustaining plant health and productivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *37(8),* 1-17. https://doi.org/10.1007/s11274-021-03101-7.

Shternshis, M., Beljaev, A., Shpatova, T., Bokova, J., & Duzhak, A. (2002). Field testing of Bacticide®, Phytoverm® and Chitanase for control of the raspberry midge blight in Siberia. *Biological Control, 47(6),* 697-706. https://doi.org/10.1023/A:1020574914831.

Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N., & Feller, U. (2008). Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. *Plant, Soil and Environment*, 54(12), 529-36.

Yanti, Y. (2019). Involvement of Jasmonic Acid in the Induced Systemic Resistance of Tomato against *Ralstonia syzigii* subsp. *indonesiensis* by Indigenous Endophyte Bacteria. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 347, No. 1, p. 012024). IOP Publishing. 10.1088/1755-1315/347/1/012024.

Yarte, M. E., Gismondi, M. I., Llorente, B. E., & Larraburu, E. E. (2022). Isolation of endophytic bacteria from the medicinal, forestal and ornamental tree Handroanthus impetiginosus. *Environmental Technology*, *43(8),* 1129-1139. https://doi.org/10.1080/09593330.2020.1818833.

Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021). Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, 9(9), 1988. https:// doi: 10.3390/microorganisms9091988.

Wu, W., Chen, W., Liu, S., Wu, J., Zhu, Y., Qin, L., & Zhu, B. (2021). Beneficial relationships between endophytic bacteria and medicinal plants. Frontiers in plant science, *12*, 646146. https://doi: 10.3389/fpls.2021.646146.

© 2023 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)
46(1), Spring, 2023

10.22055/ppr.2023.42716.1672

Effect of endophytic bacterium *Enterobacter* sp. isolated from basil root on growth stimulation and control of tomato seedling bacterial canker disease

T. Salimi[1], M.R. Alymanesh[2*], A. Fazeli[3], M. Bagnazari[4]

1. Master student, Faculty of agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of agriculture, Ilam University, Ilam, Iran (m.alimanesh@ilam.ac.ir)
3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
4. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

Received: 6 January 2023 Accepted: 25 March 2023

Abstract

Background and Objectives

Bacterial canker of tomato caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Cmm, is one of the limiting diseases of tomato cultivation. Because of the chemical control problems, biological control methods have been used to control this disease in recent investigation. Basil (*Ocimum basilicum* L.) is an annual herbaceous plant from the Lamiaceae family, and various endophytic bacteria have been reported from this plant. Also, many studies have shown that endophytic bacteria can stimulate growth and control many plant diseases. Therefore, in recent research, it was tried for the first time to test endophytic bacteria isolated from basil plants against tomato bacterial canker.

Materials and Methods

In this research, 16 endophytic bacteria were isolated from basil. They were tested for their antibacterial properties against tomato bacterial canker in laboratory conditions using chloroform vapor. Also, the effect of these bacteria on increasing total phenol and growth factors, including fresh weight, dry weight, and seedling height, were investigated. In the next step, the best bacteria in terms of growth factors were used to control bacterial canker, on tomato seedlings, under greenhouse conditions. Next, the physiological changes related to total phenol, catalase and peroxidase were investigated. Finally, molecular identification was done by PCR using universal 16SrRNA gene-specific primers ,27f and 1492r, DNA sequencing and BlastN in NCBI Genebank.

Results

ReA1 isolate was detected as Enterobacter sp. by DNA sequencing results. None of the endophytic bacteria showed antibacterial properties against bacterial canker under laboratory conditions. ReA1 isolate showed the highest growth stimulation and total phenol increase compared to other bacteria; therefore, it was used against tomato bacterial canker and reduced the disease by nearly fifty percent. Also, the growth factors were increased compared to the infected and healthy controls after inoculation with ReA1. In addition, the amount of peroxidase, catalase, and total phenol increased in

plants treated with ReA1 isolate compared to the control. So that the amount of total phenol, peroxidase, and catalase, respectively, from the highest to the lowest, was related to the application of ReA1 and Cmm, ReA1 alone, Cmm alone, and the control without bacteria.

Discussion

Recent research showed that *Enterobacter* sp. strain ReA1 isolated from a plant belonging to the Lamiaceae family (basil) was tested on tomato plants from the Solanaceae family, which was able to reduce tomato bacterial canker disease without a direct antibacterial effect. The possible main effects of this bacterium are related to the phenomenon of induced resistance in the plant and the increase of defensive and antimicrobial compounds in the plant. This control effect on the different plant species belonging to Solanaceae probably allows using this bacterium as a biological control agent in many plants and against a wide range of plant diseases. It also stimulates plant growth, making the simultaneous use of this bacterium as a fertilizer and biocontrol agent possible.

Keywords: Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis, Biological Control, Total phenol, Induction of Resistance

Associate editor: M. Aeini (Ph.D.)

Citation: Salimi, T., Alymanesh, M.R., Fazeli, A. & Bagnazari, M. (2023). Effect of endophytic bacterium *Enterobacter* sp. isolated from basil root on growth stimulation and control of tomato seedling bacterial canker disease. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *46*(1), 39-55. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2023.42716.1672.