

Research Article

Biocontrol of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) using symbiotic and non-symbiotic rhizobacteriaSedighe Mohammadikhah¹, Pejman Khodaygan^{✉1}, Khalil Malekzadeh², Roohallah Saberi Riseh¹¹ Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran² Department of Plant Genetics and Plant Production, Agriculture Faculty, Vali-E-Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran**Corresponding author**

✉ Pkhodaygan@vru.ac.ir

Abstract**Keywords**Bacterial Wilt of Bean,
Biocontrol, Induced
systemic resistance, Growth-
promoting bacteria,
Rhizobium

Bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) is one of the most important diseases of common bean. The purpose of this study was to isolate and identify symbiotic and non-symbiotic rhizobacteria with antagonistic potential against bacterial wilt of common bean and to evaluate the beneficial characteristics of bacterial isolates. A total of 100 bacterial strains were isolated from bean, soybean, lentil, chickpea, fenugreek, yellow alfalfa and alhagi. Strains were screened for their antagonistic activity. Eleven isolates were selected and their ability to induce resistance in bean plants (cv. Khomein) against Cff was tested under greenhouse conditions. Moreover, defense enzymes such as peroxidase, polyphenol oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and total phenols contents were determined in different treatments. The results showed that the level of these enzymes increased in the combination of *rhizobium* and pathogen. Analysis of the 16S rRNA gene sequences revealed that representative isolates belong to the genera *Pantoea*, *Sinorhizobium*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, and *Rhizobium*. Our research revealed that the isolated rhizobacteria strains exhibit both potential for biological nitrogen fixation and antagonistic activity. Given the constraints associated with chemical compounds, the employment of these bacteria as a viable solution in the management of bacterial wilt of bean appears crucial and essential for a safe, efficient, and sustainable approach.

Received: 23 March 2024**Revised:** 25 June 2024**Accepted:** 18 August 2024**Available online:** 16 April 2025**Cite this article:**Mohammadikhah S, Khodaygan P, Malekzadeh KH, Saberi Riseh R, 2025. Biocontrol of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) using symbiotic and non-symbiotic rhizobacteria. *J Appl Res Plant Prot* 14 (3): 189–204.<https://dx.doi.org/10.22034/ARPP.2025.19613>

Copyright© 2025 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.

This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

بررسی امکان مهار زیستی پژمردگی باکتریایی لوبیا ناشی از *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* با استفاده از ریزوباکترهای همزیست و غیرهمزیست

صدیقه محمدی خواه^۱، پژمان خدایگان^{۱*}، خلیل ملک زاده^۲، روح اله صابری ریشه^۱

^۱ گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

^۲ گروه ژنتیک و تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران

نویسنده مسئول: pkhodaygan@vru.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۰۴ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۴/۰۵ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۲۸

چکیده

پژمردگی باکتریایی با عامل *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* از مهم‌ترین بیماری‌های لوبیای معمولی است. پژوهش حاضر با هدف ارزیابی امکان کنترل زیستی این بیماری با استفاده از ریزوباکترهای همزیست و غیرهمزیست انجام گرفت. در مجموع ۱۰۰ جدایه باکتریایی از گیاهان لوبیا، سویا، عدس، نخود، شنبلیله، یونجه زرد و خارشتر جداسازی شدند و ویژگی‌های آنتاگونیستی در آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. یازده جدایه دارای ویژگی مناسب انتخاب شدند و توانایی آن‌ها در القای مقاومت روی گیاهان لوبیای محلی خمین در برابر Cff در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر آن، سطح آنزیم‌های دفاعی پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز و محتوای فنل کل در تیمارهای مختلف مورد سنجش و ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که سطح این آنزیم‌ها در تیمارهای ترکیب رایزوبیوم و بیمارگر افزایش یافته است. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و آنالیز ترادف نوکلئوتیدی ناحیه 16S rRNA نشان داد که یازده جدایه برتر متعلق به جنس‌های *Sinorhizobium*، *Pantoea*، *Enterobacter*، *Xanthomonas* و *Rhizobium* می‌باشند. یافته‌های ما نشان داد که تعدادی از این ریزوباکترها علاوه بر توانایی بالقوه در تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، دارای توان آنتاگونیستی نیز می‌باشند. بنابراین استفاده از این باکتری‌ها می‌تواند به عنوان جایگزینی ایمن، مؤثر و پایدار در سیستم‌های کشاورزی مورد توجه باشد.

کلمات کلیدی: القای مقاومت سیستمیک، باکتری محرک رشد، پژمردگی باکتریایی لوبیا، رایزوبیوم، مهار زیستی

مقدمه

شامل کاهش قابل توجه عملکرد خالص محصول و کاهش بازارپسندی بوده که در آن شکل ظاهری و اندازه دانه‌ها تحت تاثیر قرار می‌گیرد. مدیریت این بیماری به دلیل بذرزاد بودن عامل بیماری‌زا که باعث می‌شود باکتری بتواند مسافت زیادی را از طریق بذر آلوده طی کند مشکلی اساسی می‌باشد. کاهش استفاده از سموم و کودهای شیمیایی یکی از چالش‌های جامعه مدرن است. بنابراین استفاده از روش‌های سالم و کم خطر از جمله مهار زیستی مورد توجه قرار گرفته است. میکروارگانیسم‌های مفید خاک می‌توانند نقشی کلیدی در این چالش ایفا کنند (Goncalves et al. 2021). ریزوباکترهایی که با تحریک رشد و سرکوب بیماری‌ها به گیاهان سود می‌رسانند. ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (Plant growth-promoting rhizobacteria) نامیده می‌شوند. اثرات مثبت این ریزوباکترها در ریزوسفرو، علاوه بر افزایش رشد گیاه شامل کاهش حساسیت به

حبوبات دومین منبع غذایی مهم بشر می‌باشد. در میان حبوبات، گسترده‌ترین سطح زیر کشت و همچنین بالاترین ارزش اقتصادی متعلق به لوبیا (*Phaseolus vulgaris* Linnaeus) است (Yazdi Samadi & Abdemeyshaei 1996). کشت این محصول تحت تاثیر بیماری‌های مختلفی قرار می‌گیرد که بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *Curtobacterium* (Cff) از شایع‌ترین و مخرب‌ترین آن‌ها است (Araujo et al. 2018). پژمردگی باکتریایی لوبیا برای اولین بار در ایالات متحده در سال ۱۹۲۲ گزارش شد (Hedges 1922). در ایران نیز در سال ۲۰۱۳ در مزارع لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) شهرستان مرند (استان آذربایجان شرقی) مشاهده و گزارش گردید (Osdaghi 2014; Osdaghi et al. 2020). خسارت اقتصادی بیماری عمدتاً

گره گیاهان مختلف با هدف ارزیابی کارکرد آنتاگونیستی آنها در برابر باکتری Cff و غربالگری جدایه‌های باکتریایی براساس آزمون‌های بیوکنترلی و محرک رشدی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه بود.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه بیمارگر

جدایه بیمارگر *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* عامل بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا با کد سویه ICMP 22053 P990 از کلکسیون باکتری‌شناسی دانشگاه تهران تهیه شد. این جدایه در محیط کشت نوترینت براث (Nutrient Broth) که از شرکت ایبرسکو ساخت ایران تهیه شده بود و حاوی گلیسرول ۸۵ درصد بود ذخیره و در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. جهت استفاده روزمره از کشت این جدایه باکتریایی روی محیط نوترینت آگار (Nutreint agar) شرکت ایبرسکو ساخت ایران استفاده شد.

جداسازی جدایه‌های باکتریایی از گره ریشه و خاک

نمونه‌برداری از گیاهان لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.)، سویا (*Glycine max* L.)، عدس (*Lens culinaris* L.)، نخود (*Cicer arietinum* L.)، شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)، یونجه زرد (*Melilotus officinalis* L.) و خارشر (*Alhagi maurorum* Medik) از استان‌های اصفهان، کرمان، البرز، مرکزی، قزوین، همدان، کرمانشاه، چهارمحال بختیاری، لرستان، گیلان و مازندران طی فصل‌های بهار و تابستان ۱۴۰۱-۱۴۰۰ انجام شد. ریشه‌هایی که دارای گره بودند به همراه خاک ناحیه ریزوسفر داخل پلاستیک قرار داده شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور جداسازی باکتری از گره‌ها، تعدادی گره صورتی رنگ و سالم انتخاب و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد و اتانول ۷۰ درصد در آب مقطر سترون خرد شدند، یک قطره از سوسپانسیون حاصل روی تشتک پتری حاوی محیط کشت عصاره مخمر مانیتول آگار (Yesat extract Manitol Agar) شامل ۰/۵ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم هفت آب ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)، ۰/۱ گرم سدیم کلراید (NaCl)، ۵ گرم مانیتول (Mannitol)، ۰/۴ گرم عصاره مخمر (Yeast extract) در یک لیتر آب مقطر تهیه شد، به صورت چهارخطی کشت داده شد. جداسازی باکتری‌ها از خاک به روش تهیه سری رقت از نمونه خاک و کشت سوسپانسیون روی تشتک پتری حاوی

بیماری‌هایی که توسط بیمارگرهای باکتریایی ایجاد می‌گردند نیز می‌باشد. نمونه‌هایی از این ریزوباکترها متعلق به جنس‌های *Pseudomonas*، *Pantoea*، *Azospirillum*، *Serratia*، *Bacillus*، *Enterobacter* و *Rhizobium* می‌باشند که می‌توانند بافت گیاه را کلونیزه کرده، به خوبی گسترش یابند و از گیاه در طول دوره رشد، محافظت کنند (Kour et al. 2020). پتانسیل استفاده از ریزوباکترها در مهار زیستی پژمردگی باکتریایی لوبیا در چندین مورد گزارش شده است. کاربرد *Pantoea agglomerans* Mergaert در تیمار بذر، به طور موثری پژمردگی باکتریایی را در شرایط گلخانه سرکوب می‌کند (Hsieh et al. 2005) و همچنین مشخص شده است تیمار بذر لوبیا با *Rhizobium leguminosarum* Frank شدت پژمردگی باکتریایی را در شرایط گلخانه کاهش می‌دهد (Huang & Erickson 2007). سویه‌های باکتریایی که در ریزوسفر گیاه لوبیا زندگی می‌کنند ممکن است پتانسیل محافظت از گیاه را داشته باشند (Sendi et al. 2020). استفاده از ریزوباکتری‌های آنتاگونیست در مهار زیستی نشان داد که این میکروارگانیسم‌ها نه تنها مستقیماً با رقابت و آنتی‌بیوز بلکه با ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه نسبت به عوامل بیماری‌زای بطور غیرمستقیم، نیز می‌توانند عمل کنند. باکتری‌هایی که قادر به ایجاد گره روی ریشه حبوبات هستند، مکانیسم‌های مستقیم و غیرمستقیم برای افزایش رشد گیاه را ارائه می‌دهند. مکانیسم‌های مستقیم شامل تثبیت نیتروژن، محلول‌سازی فسفات نامحلول، تولید هورمون‌های گیاهی و آنزیم ACC دامیناز است، در حالی که مکانیسم‌های غیرمستقیم شامل تولید سیدروفور است که باعث افزایش جذب آهن توسط گیاهان می‌شود (Vargas et al. 2017). مکانیسم‌های مهار زیستی ارائه شده توسط باکتری‌های گره‌زای حبوبات کمتر از باکتری‌هایی که در تقویت رشد گیاه نقش دارند، مورد مطالعه قرار گرفته است. با این وجود، برای برخی از سویه‌های متعلق به چندین جنس و گونه ریزوبیایی، مکانیسم‌های مختلف مهار زیستی گزارش شده است، که می‌توان به مایکوپارازیتیسم، تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، تولید باکتریوسین‌ها، متابولیت‌های ضد قارچی مانند سیانید هیدروژن و فیتوآلکسین‌ها و همچنین القای سیستمیک مقاومت در گیاهان اشاره نمود (Das et al. 2017). اگرچه تمام این مطالعات نشان داده است که ریزوباکتری‌ها در جهت کنترل پاتوژن‌های مختلف گیاهان از طریق مکانیزم‌های مختلف عمل می‌کنند، اما این توانایی تاکنون بر روی باکتری‌های روی ریشه گیاهان لگو مورد مطالعه دقیق قرار نگرفته است. هدف از پژوهش حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های تشکیل دهنده

برای ارزیابی تولید سیانید هیدروژن ابتدا جدایه‌ها روی محیط YMA حاوی چهار درصد گلیسین بصورت چمنی کشت شدند. سپس یک کاغذ صافی سترون (آغشته به معرف شامل اسیدپیکریک ۰/۵ درصد و سدیم کربنات ۲ درصد) در قسمت داخل درب تشتک پتری قرار داده شد و تشتک‌های پتری کاملاً با پارافیلیم به دقت مسدود شدند تا از خروج هرگونه متابولیت‌های فرار ممانعت به عمل آید. یک تشتک پتری نیز به عنوان شاهد بدون باکتری در نظر گرفته شد، سپس تشتک‌های پتری به صورت وارونه در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌های رشد کرده بر روی سطح محیط کشت، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف که درون درب هر تشتک پتری تعبیه شده بود دچار تغییر رنگ خواهد شد. میزان تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نارنجی نشان دهنده تولید سیانید هیدروژن توسط جدایه‌های باکتریایی قلمداد شد (Alstrom 1987).

تولید آنزیم لیپاز

محیط کشت شامل ۱۰ گرم پپتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱ گرم کلرور کلسیم و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه گردید. ۱۰ میلی‌لیتر توئین ۸۰ را به صورت جداگانه اتوکلاو و به محیط در حال خنک شدن قبل از ریختن در تشتک پتری‌ها اضافه شد، سپس باکتری به صورت نقطه ای روی آن کشت گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت ایجاد هاله رسوبی در اطراف هر یک از کلنی‌ها دلیل بر فعالیت لیپاز باکتری در نظر گرفته شد (Schaad et al. 2001).

آزمون بیماری‌زایی

در کلیه بررسی‌های گلخانه ای از بذر لوبیا چیتی رقم محلی خمین که از پردیس تحقیقات و آموزش لوبیای خمین تهیه و استفاده شد. بذرها پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت سه دقیقه و شست و شو با آب مقطر سترون درون گلدان پلاستیکی حاوی مخلوط خاک، کوکوپیت و پرلیت به نسبت مساوی کشت شدند. بعد از رشد گیاه و رسیدن به مرحله دو برگگی بوسیله باکتری Cff با جمعیت معادل 1×10^9 سلول در میلی‌لیتر و با استفاده از سرنگ انسولین به فاصله بین میانگره اول و دوم ساقه، مایه‌زنی شدند. هر آزمون نیز با سه تکرار انجام شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲۹ - ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۵ - ۷۵ درصد نگهداری شدند. از آب مقطر

YMA صورت گرفت. تشتک‌های پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شدند. کلونی‌های لعابدار و محدب رشد کرده روی سطح محیط کشت انتخاب و مجدد جداسازی و بازکشت شدند. جدایه‌های جدا شده روی محیط کشت YMA به صورت نقطه ای کشت و پس از رشد، در دمای چهار درجه سلسیوس برای استفاده روزانه نگهداری شدند. برای نگهداری بلندمدت جدایه‌ها درون میکروتیوپ محتوی گلیسرول ۸۵ درصد ذخیره و در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Vincent 1970).

بررسی توان بیوکنترلی و محرک رشدی جدایه‌ها

بررسی اثر آنتاگونیستی (آنتی بیوز) در آزمایشگاه

برای ارزیابی اثر آنتاگونیستی هر یک از جدایه‌ها آزمون بررسی قطر هاله‌ی بازدارنده (آنتی بیوز) در آزمایشگاه انجام شد. برای این منظور سوسپانسیون با غلظت معادل 1×10^8 سلول در میلی‌لیتر از باکتری Cff تهیه شد (EPPO Bulletin 2004). سوسپانسیون تهیه شده با استفاده از لوپ روی محیط کشت YMA به طور یکنواخت پخش گردید، پس از خشک شدن سطح محیط، یک لوپ از هر جدایه آنتاگونیست روی سطح محیط با فواصل منظم و مشخص به صورت لکه‌ای کشت داده شدند. یک تشتک پتری هم به عنوان شاهد فقط با سوسپانسیون باکتری Cff کشت داده شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت نگهداری تشتک پتری در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، هاله شفاف ایجاد شده اطراف کلنی باکتری‌ها به عنوان فعالیت مثبت محسوب شد و قطر هاله اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد (Petruta et al. 2008).

حل‌کنندگی فسفات معدنی

محیط کشت شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم (CaCl_2)، ۵ گرم فسفات کلسیم (Ca_3PO_4)، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم (MgSO_4) و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر تهیه شد، پس از سترون شدن درون تشتک پتری ریخته شد. باکتری به صورت لکه‌گذاری بر روی تشتک پتری کشت و ظروف تشتک در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفته و پس از گذشت ۷۲ ساعت، ایجاد حلقه شفاف اطراف کلنی به عنوان توانایی جدایه باکتریایی در انحلال فسفات مد نظر قرار گرفت (Son et al. 2006).

تولید سیانید هیدروژن

نمونه‌ها بلافاصله درون کاغذ آلومینیومی پیچیده و داخل ازلت مایع قرار گرفته و به دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس منتقل شدند. این بررسی با پنج تیمار در سه تکرار انجام شد.

زیست‌سنجی تولید آنزیم‌های دخیل در دفاع

میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز، فنیل آلانین آمونیلایز و تغییرات میزان فنل کل طی بازه‌های زمانی مشخص شده در تیمار جدایه‌ی ریزوباکتر به تنهایی، تیمار تعاملی جدایه ریزوباکتر و همراه بیمارگر Cff در مقایسه با شاهد آلوده (مایه‌زنی تنها با بیمارگر) و شاهد سالم (بدون مایه‌زنی با بیمارگر و مایه‌زنی با آب مقطر) بررسی شد. نمونه‌گیری از بافت برگ طی روزهای مذکور انجام شد. سنجش آنزیم پراکسیداز به روش (Plewa et al. 1991) و آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز به روش (Dcunha et al. 1996)، پلی فنل اکسیداز به روش (Nicolini et al. 1991) و ارزیابی میزان فنل کل به روش فولین-سیاکالیتو (Roland & Iaima 1999) انجام شد. در ابتدا نیم گرم از بافت برگ به بافر استخراج حاوی پتاسیم فسفات ۵۰ میلی مولار دارای Polyvinylpyrrolidone (PVP) یک درصد و Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) یک میلی مولار اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی بلافاصله برای تعیین کمیت پروتئین کل (Bradford 1976) و سنجش‌های آنزیمی در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در فواصل زمانی مشخص به مدت سه دقیقه به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UPLAN ساخت کشور ایتالیا در طول موج ۴۷۰ نانومتر در محیط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی مولار و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول چهار درصد، ۱۰۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن یک درصد و عصاره آنزیمی خام خوانده شد. فعالیت فنیل آلانین آمونیلایز در یک مخلوط واکنش حاوی یک میلی لیتر از بافر استخراج، ۵۰۰ میکرولیتر فنیل آلانین ۱۰ میلی مولار، ۴۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی مخلوط و پس از یک ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سلسیوس، واکنش با اضافه کردن اسیدکلریدریک ۶ مولار متوقف شد، فعالیت آنزیم در طول موج ۲۹۰ نانومتر خوانده شد و به صورت میکروگرم اسید سینامیک تولید شده در ساعت در هر میلی گرم پروتئین بیان شد. سنجش آنزیم پلی فنل اکسیداز در مخلوط واکنش حاوی ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات، ۲۰۰ میکرولیتر پیروگال و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی در طول موج ۴۲۰ نانومتر پس از سه دقیقه خوانده شد.

سترون به عنوان شاهد استفاده شد. گلدان‌ها تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی به صورت روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. جهت اجرای اصول کخ، با مشاهده علائم نکروز و پژمردگی، جداسازی مجدد باکتری بیمارگر از گیاهان انجام شد و جدایه‌ای که مجدد جداسازی شد براساس ریخت‌شناختی کلنی، مشاهده میکروسکوپی و انجام آزمون واکنش گرم مورد ارزیابی قرار گرفت (Urrea & Harveson 2014).

آزمون گره‌زایی و بررسی زمان استقرار جدایه ریزوبیوم روی ریشه

بذر لوبیا پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد و شست‌شو با آب مقطر در گلدان‌های پلاستیکی حاوی نسبت مساوی از مخلوط خاک، کوکوپیت و پرلیت استریل، کشت گردید. سوسپانسیون از جدایه‌ها در محیط عصاره مخمر مانیتول برات (Yesat extract Manitol Broth) تهیه شد. چهار میلی لیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها با $OD_{600} = 0.5$ تهیه و به خاک گلدان‌های حاوی گیاهچه لوبیا (سه روز پس از کاشت بذر در گلدان) اضافه شد. آزمون با سه تکرار برای هر جدایه انجام گردید و برای تیمار شاهد، سه گلدان بدون مایه‌زنی در نظر گرفته شد. گلدان‌ها یک روز در میان آبیاری و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۹ - ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت دو هفته گیاهان از خاک گلدان بیرون کشیده شدند و توانایی جدایه‌ها در تشکیل گره روی ریشه آن‌ها بررسی و با گیاهان شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند، همچنین جهت بررسی زمان استقرار جدایه ریزوبیوم روی ریشه، کاشت گیاه لوبیا و مایه‌زنی مشابه روش ذکر شده انجام شد و ده روز بعد از کاشت به صورت روزانه یک گیاه از خاک بیرون کشیده شد و تشکیل گره بر روی ریشه با گیاه شاهد مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت (Vincent 1970).

مایه‌زنی باکتری بیمارگر و نمونه‌برداری

دو هفته پس از کاشت گیاهان لوبیا در گلدان و اطمینان از استقرار و ایجاد گره بوسیله جدایه با کد ۱۴۰، مایه‌زنی باکتری Cff مطابق با روش توضیح داده شده قسمت آزمون بیماریزایی انجام شد. برای سنجش میزان تغییرات آنزیم‌های دفاعی نمونه‌برداری در فاصله‌های زمانی صفر (یک روز قبل از مایه‌زنی باکتری Cff)، ۲۴ ساعت (یک روز بعد از مایه‌زنی باکتری Cff) و ۱۲۰ ساعت (پنج روز پس از مایه‌زنی باکتری Cff) از قسمت برگ گیاهان لوبیا در هر تیمار مورد آزمایش صورت گرفت.

پیکومول، یک میکرولیتر DNA و ۲۲ میکرولیتر آب بدون نوکلئاز بود. در این پژوهش، کلیه واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز با دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad مدل T100TM انجام شد. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، سپس واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۶۹ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه بود. سه مرحله فوق ۳۴ بار تکرار شدند و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. قطعه مورد نظر ۱۳۰۰ bp در میان ۱۰ جدایه برتر تکثیر شد و کیفیت آن‌ها روی ژل آگارز یک درصد ارزیابی شد. محصول PCR نمونه‌ها برای توالی‌یابی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شدند. کلیه توالی‌های خام دریافت شده توسط نرم افزار BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.0.9.0 مورد بررسی و ویرایش قرار گرفت و توسط ابزار nucleotide blast در پایگاه داده NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با توالی‌های موجود در پایگاه مذکور مقایسه شدند. سپس کلیه توالی‌ها از طریق ابزار BankdIt در پایگاه داده NCBI ثبت و برای آن‌ها شماره دسترسی دریافت شد. درخت فیلوژنتیک برای ژن 16S rRNA جدایه‌های پژوهش حاضر به همراه توالی‌های سویه‌های شاخص مرجع آن‌ها که از NCBI GenBank اخذ شده بود، با استفاده از الگوریتم هم‌ردیفی Clustal W و توسط نرم افزار MEGA7 رسم گردید. دندروگرام با استفاده از روش آماری درست‌نمایی بیشینه (Maximum likelihood) ساخته شد. اطمینان به گره‌ها با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ (Bootstrap) تخمین زده شد. فواصل تکاملی با استفاده از مدل kimura 2-parameter model محاسبه شد (Thompson et al. 1997).

فعالیت آنزیمی برحسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره به دست آمد. برای سنجش میزان فنل کل ابتدا نیم گرم از بافت برگ در پنج میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده شد و مخلوط حاصل به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری گردید. پس از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه، به ۵۰۰ میکرولیتر از فاز روشن ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و حجم محلول با آب مقطر به ۲/۵ میلی لیتر رسانده شد. به محلول حاصل ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم پنج درصد افزوده و جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی با اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۲۵ نانومتر قرائت گردید.

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست بر پایه توالی‌یابی ژن 16S rRNA شناسایی مولکولی جدایه‌های آنتاگونیست برتر از نظر توان ایجاد هاله بازدارنده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و جفت آغازگر عمومی 16S rRNA (1387r/63f) (جدول ۱) انجام شد (Marchesi et al. 1998). استخراج DNA جدایه‌ها به روش معمول فنل-کلروفرم انجام شد (Ausuble et al. 1988). کیفیت DNA توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد تایید شد. به منظور تکثیر ناحیه ژن 16S rRNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chain reaction) با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر که مخلوط واکنش شامل ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش (Taq DNA Polymerase 2x Master mix RED) محصول شرکت آمپلیکون (Ampliqon) از کشور دانمارک، یک میکرولیتر از هر کدام آغازگر پیش‌رو و پس‌رو با غلظت ۱۰

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش.

Table 1. Sequence of primers used in this study.

Primer name	Sequence
63f	CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC
1387r	GGG CGG WGT GTA CAA GG

نتایج

در مجموع تعداد ۱۰۰ جدایه باکتریایی طی جداسازی اولیه از خاک و گره‌های روی ریشه گیاهان لوبیا، سویا، عدس، نخود، شنبلیله، یونجه زرد و خارستر روی محیط YMA جداسازی و خالص‌سازی شدند. نتایج بررسی ویژگی‌های بیوکنترلی و آنتاگونیستی جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌های ۱۴۰، ۱۲،

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی‌های گلخانه‌ای این پژوهش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS V 9.1 انجام و نمودارها با نرم افزار Excel 2013 ترسیم گردیدند. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت (Duncan & Ferris 1983).

حل‌کنندگی فسفات را داشتند، جدایه‌های ۱۴۰، ۲۸۳ و ۴۰۵ دارای توانایی تولید آنزیم لیپاز بودند و همچنین جدایه ۴۰۵ دارای توان تولید سیانید هیدروژن نیز بود (جدول ۲).

جدول ۲. ویژگی‌های آنتاگونیستی جدایه‌های برتر جداسازی شده از گره ریشه گیاهان مختلف.

Table 2. Antagonistic properties of superior isolates isolated from root nodules of different plants.

Strain code	Host	isolated from	Inhibition zone	Phosphate solubilization	Production of HCN	Production of lipase	Genus	Accession number
140	Bean	Nodule	+14mm	-	-	+	<i>Rhizobium</i>	OR672974
12	Bean	Nodule	+10mm	-	-	-	<i>Rhizobium</i>	OR673075
283	Lentil	Nodule	+5mm	+	-	+	<i>Rhizobium</i>	OR672739
352	Bean	Nodule	+32mm	+	-	-	<i>Sinorhizobium</i>	OR672737
405	Sweet clovers	Nodule	+12mm	+	+	+	<i>Sinorhizobium</i>	OR085960
40	Fenugreek	Nodule	+24mm	+	-	-	<i>Xanthomonas</i>	OR672740
370	Chickpea	Nodule	+4mm	-	-	-	<i>Pantoea</i>	OR672972
280	Lentil	Nodule	+28mm	-	-	-	<i>Enterobacter</i>	OR673073
535	Soybean	Nodule	+18mm	+	-	-	<i>Enterobacter</i>	OR085848
101	Bean	Nodule	+32mm	-	-	-	<i>Rhizobium</i>	OR673071
425	Alhagi	Soil	+16mm	-	-	-	<i>Rhizobium</i>	OR085848



شکل ۱. هاله بازدارنده ایجاد شده توسط جدایه‌های باکتری آنتاگونیست در برابر کورتوباکتریوم، سمت راست: جدایه ۱۴۰، سمت چپ: جدایه ۴۲۵.
Figure 1. Inhibitory halo created by isolate bacteria Antagonist against *Curtobacterium* right: isolate 140, left: isolate 425.

آزمون بیماری‌زایی

شد. به تدریج در سایر برگ‌ها علائم نکروز و پژمردگی مشاهده شد. به طوریکه بعد از گذشت ۲۰ روز گیاه دچار پژمردگی کامل شد. گیاهانی که به عنوان شاهد با آب مقطر سترون به همان صورت مایه‌زنی شده بودند با گذشت زمان بدون علائم بیماری بودند. در همه موارد ویژگی‌های باکتری عامل بیماری که از گیاه آلوده جداسازی گردیده بود، مشابه جدایه اولیه بود.

اولین علائم بیماری پنج روز پس از مایه‌زنی باکتری Cff به ساقه گیاه، به صورت نکروز و سبز خشک شدن حاشیه اولین برگ گیاه ظاهر شد که با گذشت زمان این علائم در کل سطح برگ پیشرفت کرد و در نهایت منجر به پژمردگی کامل برگ



شکل ۲. سمت راست: مشاهده علائم پژمردگی در گیاه لوبیا مایه‌زنی شده با بیمارگر Cff، سمت چپ: گیاه شاهد مایه زنی شده با آب مقطر استریل بدون مشاهده علائم پژمردگی.

Figure 2. Right: observation of wilting symptoms in the plant bean inoculated with Cff pathogen, left: control plant inoculated with sterile distilled water without wilting symptoms.

آزمون گره‌زایی

نشان داد که متعلق به جنس *Rhizobium* می‌باشد. در بررسی صورت گرفته برای مشخص شدن زمان تشکیل اولین گره روی ریشه گیاه مشاهدات نشان داد که اولین گره‌ها ۱۵ روز پس از مایه‌زنی با جدایه ۱۴۰ بر روی ریشه تشکیل شده است و گیاهان شاهد بدون گره بودند.

از میان یازده جدایه برتر دارای توان ایجاد هاله بازدارنده در شرایط آزمایشگاه تنها جدایه ۱۴۰ توان ایجاد گره روی ریشه گیاه میزبان خود (لوبیا) که از آن نیز جداسازی شده بودند را در شرایط گلخانه داشت. بررسی توالی ژن 16S rRNA این جدایه



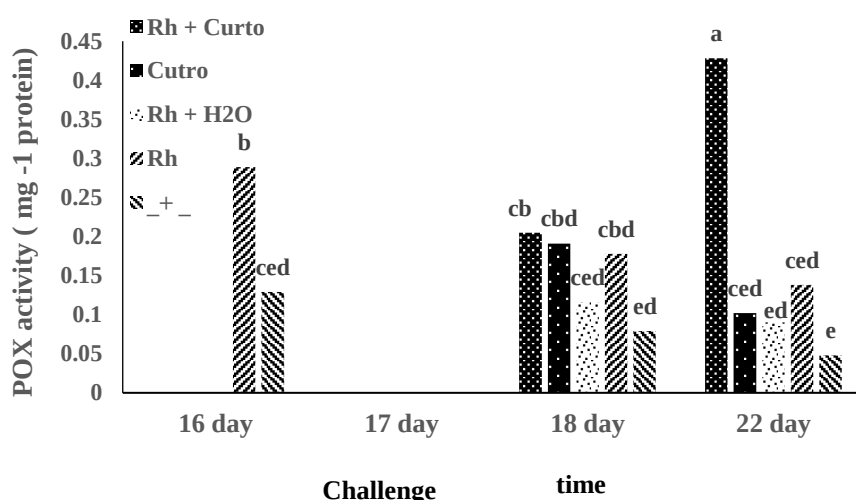
شکل ۳. سمت راست: گره‌های ایجاد شده روی ریشه گیاه لوبیا با مایه‌زنی توسط جدایه ۱۴۰، سمت چپ: ریشه گیاه شاهد بدون مایه‌زنی.

Figure 3. Right: nodules created on the root of bean plant with inoculation by isolate 140, left: control plant root without inoculation.

سنجش زیستی آنزیم‌های دفاعی

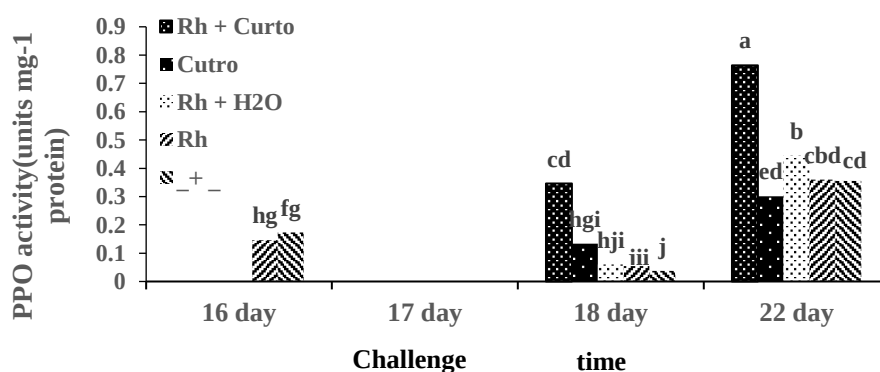
نتایج آزمون نشان داد که سطح آنزیم‌های پراکسیداز، پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیلیاز به طور قابل توجهی در

تیمار جدایه ۱۴۰ و باکتری Cff در مقایسه با سایر تیمارها افزایش یافته است.



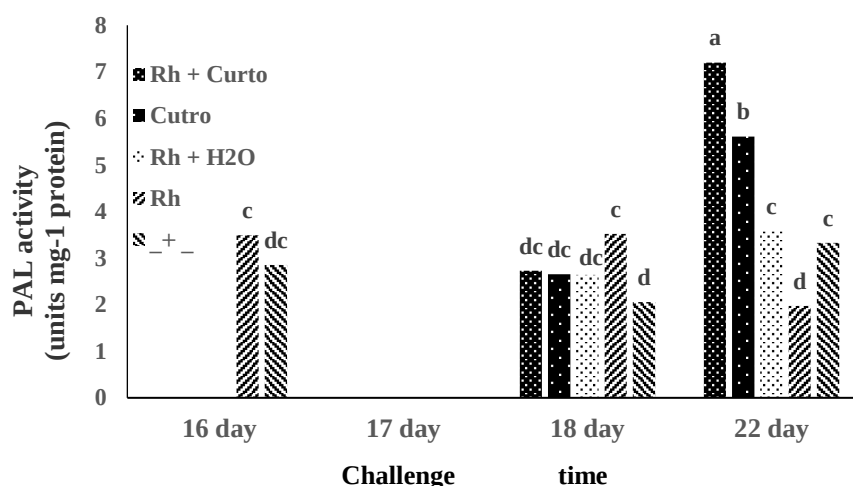
شکل ۴. تغییرات آنزیم پراکسیداز در گیاه لوبیا رقم محلی خمین در تیمارهای مختلف: رایزوبیوم + کورتوباکتریوم (Rh+Curto)، کورتوباکتریوم (Curto)، رایزوبیوم + آب (Rh + H₂O)، رایزوبیوم (Rh)، شاهد بدون مایه‌زنی بیمارگر (Control) در زمان‌های مختلف: ۱۶ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۷ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۸ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۲۲ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، Challenge: زمان مایه‌زنی باکتری کورتوباکتریوم به ساقه گیاه لوبیا.

Figure 4. Changes in peroxidase enzyme in local Khomein bean plant in different treatments: *Rhizobium* + *Curtobacterium* (Rh+Curto), *Curtobacterium* (Curto), *Rhizobium* + water (Rh + H₂O), *Rhizobium* (Rh), Control without pathogen inoculation at different times: 16 days after inoculation of *Rhizobium* isolate into potting soil, 18 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, 17 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, 22 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, Challenge: Time of inoculation of *Curtobacterium* bacteria into bean plant stem.



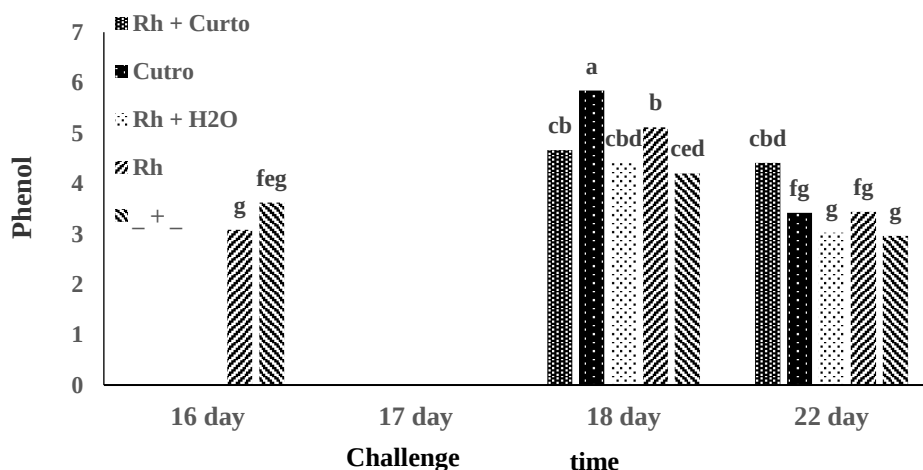
شکل ۵. تغییرات آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در گیاه لوبیا رقم محلی خمین در تیمارهای مختلف: رایزوبیوم + کورتوباکتریوم (Rh+Curto)، کورتوباکتریوم (Curto)، رایزوبیوم + آب (Rh + H₂O)، رایزوبیوم (Rh)، شاهد بدون مایه‌زنی بیمارگر (Control) در زمان‌های مختلف: ۱۶ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۷ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۸ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۲۲ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، Challenge: زمان مایه‌زنی باکتری کورتوباکتریوم به ساقه گیاه لوبیا.

Figure 5. Changes in polyphenol oxidase enzyme in local Khomein bean plant in different treatments: *Rhizobium* + *Curtobacterium* (Rh+Curto), *Curtobacterium* (Curto), *Rhizobium* + water (Rh + H₂O), *Rhizobium* (Rh), Control without pathogen inoculation at different times: 16 days after inoculation of *Rhizobium* isolate into potting soil, 17 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, 18 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, 22 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, Challenge: Time of inoculation of *Curtobacterium* bacteria into bean plant stem.



شکل ۶. تغییرات آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز در گیاه لوبیا رقم خمین محلی خمین در تیمارهای مختلف: رایزوبیوم + کورتوباکتریوم (Rh+Curto)، کورتوباکتریوم (Curto)، رایزوبیوم + آب (Rh + H₂O)، رایزوبیوم (Rh)، شاهد بدون مایه‌زنی بیمارگر (Control) در زمان‌های مختلف: ۱۶ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۷ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۸ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۲۲ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، Challenge: زمان مایه‌زنی باکتری کورتوباکتریوم به ساقه گیاه لوبیا.

Figure 6. Changes in the enzyme phenylalanine ammonia lyase in the local Khomein variety of bean plant in different treatments: *Rhizobium* + *Curtobacterium* (Rh+Curto), *Curtobacterium* (Curto), *Rhizobium* + water (Rh + H₂O), *Rhizobium* (Rh), Control without pathogen inoculation at different times: 16 days after inoculation of the *Rhizobium* isolate into the potting soil, 17 days after inoculation of *Rhizobium* into the potting soil, 18 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, 22 days after inoculation of *Rhizobium* into the potting soil, Challenge: Time of inoculation of the *Curtobacterium* bacteria into the bean plant stem.

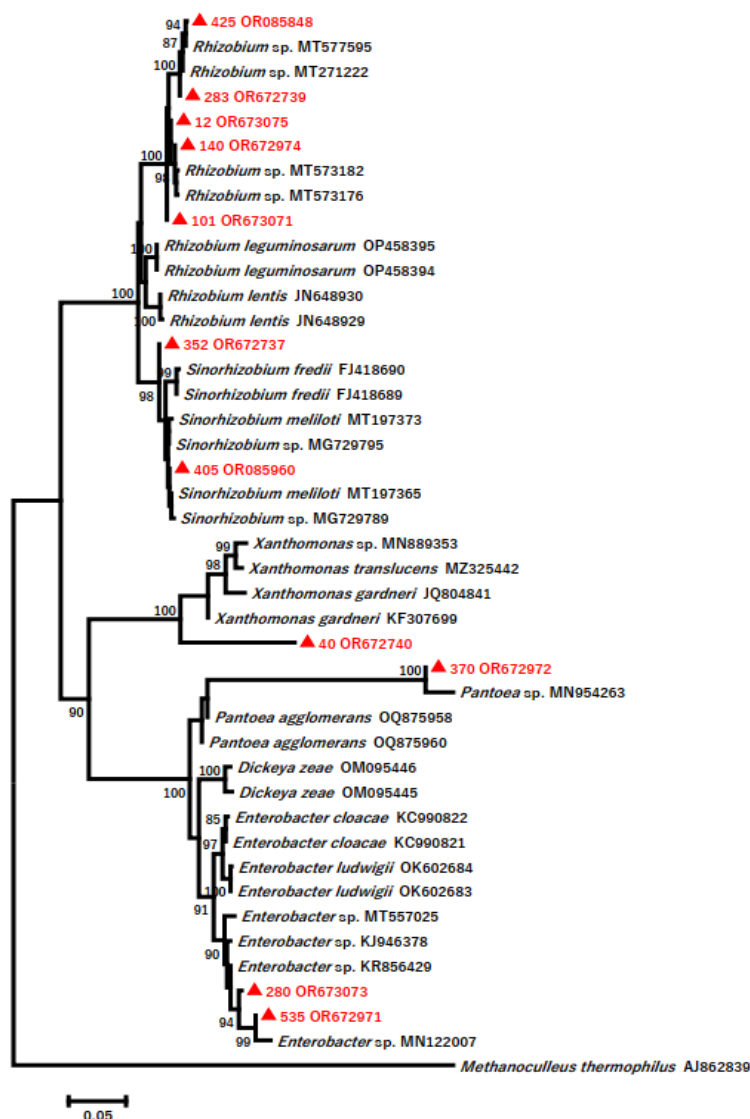


شکل ۷. تغییرات میزان فنل کل در گیاه لوبیا رقم خمین محلی خمین در تیمارهای مختلف: رایزوبیوم + کورتوباکتریوم (Rh+Curto)، کورتوباکتریوم (Curto)، رایزوبیوم + آب (Rh + H₂O)، رایزوبیوم (Rh)، شاهد بدون مایه‌زنی بیمارگر (Control) در زمان‌های مختلف: ۱۶ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۷ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، ۱۸ روز پس از مایه‌زنی جدایه رایزوبیوم به خاک گلدان، ۲۲ روز پس از مایه‌زنی رایزوبیوم به خاک گلدان، Challenge: زمان مایه‌زنی باکتری کورتوباکتریوم به ساقه گیاه لوبیا.

Figure 7. Changes in total phenol content in local Khomein bean plants in different treatments: *Rhizobium* + *Curtobacterium* (Rh+Curto), *Curtobacterium* (Curto), *Rhizobium* + water (Rh + H₂O), *Rhizobium* (Rh), Control without pathogen inoculation at different times: 16 days after inoculation of *Rhizobium* isolate into potting soil, 17 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, 18 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, 22 days after inoculation of *Rhizobium* into potting soil, Challenge: Time of inoculation of *Curtobacterium* bacteria into bean plant.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها بر اساس ترادف بخشی از ناحیه 16S rRNA

تجزیه و تحلیل مقایسه توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های برتر دارای توان بازدارندگی در برابر باکتری Cff با سایر توالی‌های سویه‌های استاندارد موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار BLAST مشخص نمود که جدایه‌های منتخب متعلق به جنس‌های *Pantoea*، *Xanthomonas*، *Enterobacter*، *Rhizobium* و *Sinorhizobium* تایید کرد (شکل ۸).



شکل ۸. درخت فیلوژنی رسم شده به روش درست نمایی بیشینه (ML) بر اساس ترادف بخشی از ناحیه 16S rRNA جدایه‌های منتخب در این مطالعه و سویه‌های مرجع به دست آمده از NCBI. خطای میعار برآورد شده با استفاده از روش بوت استرپ و براساس ۱۰۰۰ تکرار محاسبه شد، *Methanoculleus thermophilus* به عنوان گونه خارج از گروه انتخاب شد.

Figure 8. Phylogenetic tree using maximum-likelihood (ML) algorithm based on the 16S rRNA gene sequence of selected isolates in this study and reference strains obtained from NCBI. The estimated standard error was calculated using bootstrap method and based on 1000 repetitions, *Methanoculleus thermophilus* was selected as outgroup species.

بحث

استفاده از PGPR یکی از امیدوارکننده‌ترین رویکردها برای مدیریت بیماری در کشاورزی معاصر و جایگزینی است که می‌تواند اتکا به مواد شیمیایی را به حداقل برساند (Timmermann et al. 2017). در طی نمونه‌برداری و جداسازی اولیه از ناحیه ریزوسفر و گره ریشه گیاهان مختلف خانواده لگومینوز تعداد ۱۰۰ جدایه باکتری جداسازی گردید. تاثیر آنتاگونیستی این جدایه‌ها در برابر باکتری Cff عامل بیماری پژمردگی باکتریایی به روش هاله بازدارنده مورد ارزیابی قرار گرفت. شناسایی مولکولی براساس توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های برتر دارای توان بازدارندگی در برابر باکتری Cff نشان داد این جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *Pantoea*، *Rhizobium*، *Sinorhizobium* و *Xanthomonas* می‌باشند. این جدایه‌ها احتمالاً به عنوان ریزوبیاهای اصلی ایجاد کننده گره بر روی ریشه این گیاهان و یا به عنوان باکتری‌های همراه و اندوفیت کمک کننده به فرایند گره‌زایی بر روی ریشه این گیاهان فعال بوده‌اند. اخیراً دو گونه‌ی *Xanthomonas* از گال‌های ایجاد شده توسط اگر و باکتریوم بر روی ریشه گیاه تاج‌خروس و فیکوس بنجامین جدا شده‌است که به عنوان جدایه‌های همراه شناسایی شده‌اند (Mafakheri et al. 2022). در مطالعه‌ای که بر روی کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا (*C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) توسط تیمار بذر لوبیا با *Rhizobium leguminosarum* و *Pantoea agglomerans* صورت گرفته بود مشخص شد بذرهای تیمار شده با هر یک از این عوامل مهار زیستی، کاهش قابل توجهی در بروز و شدت پژمردگی باکتریایی و افزایش ظهور و ارتفاع گیاهچه نشان داده‌اند و در این میان تاثیر *Rhizobium leguminosarum* مشهودتر بوده است (Huang et al. 2007). در بررسی انجام شده به منظور ارزیابی توانایی سه سویه *Rhizobium* sp. و *Bradyrhizobium* sp. در سرکوب رشد پاتوژن‌های قارچی پوسیدگی ریشه *Rhizoctonia solani* J. G. Kuhn، *Fusarium solani* Link و *Fusarium oxysporum* W. C. Snyder & H. N. Hansen، 1858 و *Macrophomina phaseolina* Tassi در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌های ریزوبیا قادر به سرکوب پاتوژن‌های قارچی با بالاترین میزان بازدارندگی بودند (Nakei et al. 2024). در مطالعه‌ای دیگر با هدف بررسی پتانسیل آنتاگونیستی *Bacillus subtilis* Ehrenberg (Chohn 1872) در برابر بیماری‌های قارچی گوجه‌فرنگی و بررسی قابلیت آن در افزایش رشد نهال‌های گوجه‌فرنگی با استفاده از تلقیح تک سویه

و تلقیح همزمان با *Rhizobium* sp. انجام شد، نتایج نشان داد این باکتری بروز و شدت *Botrytis* sp. را کاهش داد. علاوه بر این، سنجش ارتقاء رشد نشان داد که تلقیح مشترک *B. subtilis* و *Rhizobium* sp. باعث افزایش سطح برگ و وزن خشک ریشه در مقایسه با تلقیح تک سویه شد (Konig et al. 2024).

ارزیابی جدایه‌ها در جهت انحلال تری کلسیم فسفات نامحلول مشخص کرد که تعدادی از جدایه‌ها (مشخص شده در جدول ۲) توان حل کردن فسفر را در شرایط ارزیابی کیفی در تشک پتری در آزمایشگاه را دارا بودند و از میان آن‌ها جدایه‌هایی که این توانایی را دارا بودند و مورد شناسایی مولکولی نیز قرار گرفتند مشخص شد که این جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *Enterobacter*، *Pantoea*، *Rhizobium*، *Sinorhizobium* می‌باشند. تولید اسیدهای آلی به عنوان سازوکار اصلی انحلال فسفات‌های معدنی کاملاً مستند و ثابت شده است. که در این میان اسید گلوکونیک به عنوان مهمترین عامل انحلال فسفر توسط جنس‌های مختلف باکتری‌های ریزوبیومی تولید می‌شود (Halder et al. 1990).

توانایی تولید سیانید هیدروژن و نقش و تاثیرات متقابل این متابولیت در ریشه‌گاه گیاهان توسط سویه‌های مختلف باکتری به اثبات رسیده است. با توجه با اینکه درصد کمی از این باکتری‌های ریزوبیومی به عنوان سیانوژن معرفی شده‌اند (Antoun 2013)، تعیین توان تولید سیانید هیدروژن جدایه‌ها در این بررسی نیز مشخص کرد که تعداد اندکی از این جدایه‌ها این توانایی را دارند (جدول ۲) که در میان آن‌ها جدایه ۴۰۵ که در شناسایی مولکولی مشخص شد متعلق به جنس *Sinorhizobium* می‌باشد توان نسبتاً کمی در تولید سیانید هیدروژن دارد و رنگ کاغذ صافی معرف را به قهوه‌ای روشن تغییر داد.

در این بررسی همچنین مشخص شد که جدایه‌های ۱۴۰ و ۲۸۳ به ترتیب جداسازی شده از گره ریشه گیاه لوبیا و عدس متعلق به جنس *Rhizobium* و جدایه ۴۰۵ جدا شده از گره ریشه گیاه یونجه زرد که متعلق به جنس *Sinorhizobium* می‌باشد، توان تولید آنزیم لیپاز را دارند. در مطالعه‌ای که بر روی باکتری *Rhizobium leguminosarum* با هدف بررسی توانایی آن در تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک و بهبود طول و وزن اندام هوایی و ریشه گیاه باقلا انجام شد مشخص شد که باکتری *R. leguminosarum* قادر به تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک از جمله لیپاز می‌باشد که موجب بهبود و ارتقا رشد گیاه باقلا می‌شود (Alsalm et al. 2018).

مقاومت سیستمیک القایی ISR شامل آبخاری از واکنش‌های

دفاعی است که از محل القاء به قسمت‌های دوردست گیاه گسترش می‌یابد و شامل انتقال سیگنال با واسطه فیتوهورمون‌ها، تولید فیتوالکسین‌ها، حفاظت از استرس اکسیداتیو، آنزیم‌های مربوط به دفاع گیاه (فنیل آلانین آمونیلایز، پراکسیداز، β -1-3 گلوکاناز) و تشکیل موانع ساختاری مانند ضخیم شدن دیواره، رسوب کالوز و تجمع فنولیک‌ها می‌شود (Verhagen et al. 2004). اثر القا مقاومت گیاه لوبیا در برابر پژمردگی باکتریایی را با استفاده از مایه‌زنی جدایه ۱۴۰ جدا سازی شده از گره ریشه گیاه لوبیا که در شناسایی مولکولی مشخص شد متعلق به جنس *Rhizobium* می‌باشد و سبب تشکیل هاله بازدارنده در برابر باکتری عامل بیماری پژمردگی باکتریایی (Cff) در آزمایشگاه گردیده و در کلونیزاسیون ریشه و تشکیل گره‌های همزیستی بر روی ریشه گیاه لوبیا توانا بود مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیلایز حاکی از آن است که میزان فعالیت این آنزیم‌ها در روزهای بعد از مایه‌زنی بیمارگر نسبت به زمان صفر (قبل از مایه زنی بیمارگر) افزایش داشته است. همچنین فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهان تیمار شده با باکتری ریزوبیوم و بیمارگر Cff نسبت به گیاهان شاهد آلوده و شاهد سالم و همچنین گیاهان تیمار شده با باکتری ریزوبیوم و مایه‌زنی شده با آب مقطر افزایش قابل توجهی داشته است. افزایش فعالیت این آنزیم‌های دفاعی در گیاهان لوبیا دلیل بر ایجاد مقاومت القایی بوجود آمده توسط باکتری ریزوبیوم به عنوان محرک است. آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز از جمله آنزیم‌هایی هستند که در اکسیداسیون فنل به کینون و تشکیل لیگنین در سلول‌های گیاهی در طول حمله بیمارگرها نقش مهمی دارند (Flott et al. 1989). آنزیم فنیل آلانین آمونیلایز اولین آنزیم در مسیر فنیل پروپانویید است که مسئول سنتز فیتوالکسین و لیگنین که در سیستم دفاعی گیاه شرکت می‌کنند. فنیل آلانین آمونیلایز همچنین در بیوسنتز هورمون دفاعی سالیسیلیک اسید، که هم برای مقاومت موضعی و هم مقاومت سیستمیک لازم است، شرکت می‌کند (Dixon & paiva 1995).

این نتایج نشان می‌دهد که همزیستی بین گیاه لوبیا و باکتری ریزوبیوم که طی یکسری سیگنال‌هایی صورت می‌گیرد قادرند پاسخ‌های ایمنی را در گیاه فعال کنند. اگرچه مطالعات بیشتری برای تایید اثربخشی گونه‌های متمایز از *Rhizobium* sp. در کاهش بروز بیماری پژمردگی لوبیا مورد نیاز است، اما مایه زنی با *Rhizobium* sp. باعث ایجاد ISR شد و کل گیاه را برای افزایش دفاع در برابر Cff آماده کرد. مکانیسم‌های متعددی

ممکن است مسئول کاهش میزان و شدت پژمردگی باکتریایی لوبیا و رشد گیاهچه لوبیا در مطالعه حاضر باشند. در طی مراحل مختلف تعامل همزیستی، گونه های فعال اکسیژن ROS (Reactive oxygen species) می‌تواند به طور گسترده جابه‌جا شود. در نتیجه شبکه‌های سیگنال‌دهی ROS طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی، از جمله پاسخ به محرک‌های زیستی را کنترل می‌کنند و به عنوان یک سیگنال اولیه در گیاهان عمل می‌کنند (Baxter et al. 2014). هورمون‌های دفاعی گیاه وضعیت ROS گیاهان را تعدیل می‌کنند (Sewelam et al. 2013). بنابراین مایه‌زنی *Rhizobium* به سیستم ریشه، قسمت‌های انتهایی گیاه را برای افزایش دفاع پاتوژن حساس می‌کند. پاسخ‌های طولانی‌مدت ظرفیت دفاعی ناشی از استرس اکسیداتیو را در برگ‌های لوبیا زمانی که در معرض پاتوژن Cff قرار گرفتند، افزایش می‌دهد (Mittler et al. 2011). در بررسی ارتباط بین تغییرات فنوتیپی ایجاد شده در گیاهان بادام زمینی مایه‌زنی شده با *Bradyrhizobium* sp.، *Bacillus* sp. و *Sclerotium rolfsii* Tode مولکول‌های دخیل در پاسخ‌های ایجاد شده در گیاه بادام زمینی به هر میکروارگانیسم مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد فعالیت آنزیم پراکسیداز که مرتبط با پاسخ بادام زمینی به پاتوژن *S. rolfsii* است در گیاهانی که همزمان مایه‌زنی شده بودند نسبت به گیاهانی که فقط با *S. rolfsii* مایه‌زنی شده بودند، زودتر القا شده بود همچنین افزایش محتوای ترکیبات فنلی ناشی از عامل کنترل زیستی *Bacillus* sp. تحت تأثیر مایه‌زنی همزمان با *Bradyrhizobium* sp. قرار گرفت (Figueredo et al. 2014). در پژوهشی القای مقاومت سیستمیک توسط ریزوباکتری‌های محرک رشد (PGPR) به همراه ریزوبیوم در نخود فرنگی در برابر پژمردگی فوزاریومی نخود فرنگی مورد سنجش قرار گرفت و نتیجه بررسی‌ها تایید کرد که گیاهانی به طور همزمان با PGPR و *Rhizobium* تیمار شده بودند توانایی زنده‌مانی بیشتری نسبت به گیاهانی که به صورت منفرد تیمار شده بودند را داشتند. همچنین افزایش سطح آنزیم‌های مرتبط با دفاع، به عنوان مثال، L- فنیل آلانین آمونیلایز، پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز نیز در گیاهانی که به صورت مشترک مایه‌زنی شده بودند ثبت شد (Figueredo et al. 2017). در بررسی دیگر مشخص شد که مایه‌زنی ریزوبیا به همراه قارچ میکوریزا آربوسکولار (*Arbuscular mycorrhizal fungi*) می‌تواند بر بیماری پوسیدگی طوقه قرمز سویا با عامل (*Cylindrocladium parasiticum* Morgan) تأثیر بگذارد (Gao et al. 2012). در بررسی دیگر مایه‌زنی گیاه لوبیا رقم Rosa با *Rhizobium etli*

بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا می‌باشند، با تعیین توالی بخشی از ژن 16S rRNA مشخص شد این جدایه‌ها متعلق به جنس‌های باکتریایی *Enterobacter*، *Pantoea*، *Sinorhizobium* و *Xanthomonas* می‌باشند. این جدایه‌ها دارای توان ایجاد هاله بازدارنده در برابر عامل پژمردگی باکتریایی لوبیا همچنین توان انحلال فسفات، توان تولید سیانید هیدروژن می‌باشند، بنابراین در بحث مهار زیستی می‌توانند مورد توجه قرار گیرند.

سپاسگزاری

از کارشناس محترم آزمایشگاه باکتری شناسی دانشگاه تهران که ایزوله باکتری *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) را در اختیار ما قرار داده اند، تشکر و قدردانی می‌کنم.

Reference

- Alstrom S, 1987. Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant & Soil* 102: 3–9.
- Alsalmim HA, Abood A, Abbas LM, 2018. Ability of *Rhizobium leguminosarum* inoculum to improve fava beans (*Vicia faba*) growth and produce some hydrolytic enzyme. *Iraqi Journal of Science* 1231–1236.
- Antoun H, 2013. Plant-growth-promoting rhizobacteria.
- Ausubel F, Brent FM, Kingstone RE, Moor DD, Smith JA, et al., 1988. Current Protocol in Molecular Biology. Greene, Publishing Associates, Wiley Interscience, New York, USA. 4757 pp.
- Araujo FDD S, Santos DS, Pagotto CC, de Araujo WL, Eberlin MN, 2018. Mass spectrometry characterization of endophytic bacterium *Curtobacterium* sp. strain ER1/6 isolated from *Citrus sinensis*. *Journal of Mass Spectrometry* 53(1): 91–97.
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N, 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* 65(5): 1229–1240.
- Bradford MM, 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.
- Dcunha GB, Satyanarayan V, Nair PM, 1996. Segovia منجر به افزایش قابل توجه مقاومت در برابر بیماری بلایت هاله‌ای ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* Burkholder شد (Young 1978). پیش تیمار لوبیا با *R. etli* باعث کاهش ۷۵ درصدی اندازه علایم نکروز ایجاد شده توسط بیمارگر در مقایسه با گیاهانی که فقط با پاتوژن تیمار شده بودند، شد (Diaz-Valle et al. 2019). این بررسی‌ها قابل توجه است زیرا هر روشی که بتواند خسارت بیماری را با هزینه کم و به روشی ایمن از نظر زیست محیطی کاهش دهد از اهمیت قابل توجهی برخوردار است.
- در این پژوهش مشخص شد که از بین ۱۰۰ جدایه جداسازی شده از گره ریشه و خاک ریزوسفر گیاهان لوبیا، عدس، سویا، شنبلیله، خارشتر، نخود و یونجه زرد، تعداد یازده جدایه دارای توان ایجاد هاله بازدارنده در برابر باکتری *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Cff) عامل Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*. *Phytochemistry* 42(1): 17–20.
- Das K, Prasanna R, Saxena AK, 2017. Rhizobia: a potential biocontrol agent for soilborne fungal pathogens. *Folia microbiologica* 62: 425–435.
- Diaz-Valle A, Lopez-Calleja AC, Alvarez-Venegas R, 2019. Enhancement of pathogen resistance in common bean plants by inoculation with *Rhizobium etli*. *Frontiers in Plant Science* 10: 1317.
- Dixon RA, Paiva NL, 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant Cell* 7(7): 1085.
- Duncan LW, Ferris H, 1983. Validation of a model for prediction of host damage by two nematode species. *Journal of Nematology* 15(2): 227.
- Figueredo MS, Tonelli ML, Taurian T, Angelini J, Ibanez F, 2014. Interrelationships between *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144 in the induced systemic resistance against *Sclerotium rolfsii* and symbiosis on peanut plants. *Journal of Biosciences* 39: 877–885.
- Figueredo MS, Tonelli ML, Ibanez F, Morla F, Cerioni G, 2017. Induced systemic resistance and symbiotic performance of peanut plants challenged with fungal pathogens and co inoculated with the biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 and *Bradyrhizobium* sp. SEMIA6144. *Microbiological Research* 197: 65–73.
- Flott BE, Moerschbacher BM, Reisener HJ, 1989.

- Peroxidase isoenzyme patterns of resistant and susceptible wheat leaves following stem rust infection. *New Phytologist* 111(3): 413–421.
- Gao X, Lu X, Wu M, Zhang H, Pan R, 2012. Co-inoculation with rhizobia and AMF inhibited soybean red crown rot: from field study to plant defense-related gene expression analysis. *PLoS One* 7(3): e33977.
- Goncalves RM, da Silva Junior TAF, Soman JM, da Silva JC, Maringoni AC, 2021. Effect of crop rotation on common bean cultivars against bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *European Journal of Plant Pathology* 159: 485–493.
- Halder A, Mishra A, Bhattacharyya P, Chakrabartty P, 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *The Journal of General & Applied Microbiology* 36(2): 81–92.
- Hedges F, 1922. A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. *Science* 55(1425): 433–434.
- Hsieh T, Huang H, Erickson R, 2005. Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. *Journal of Phytopathology* 153(10): 608–614.
- Huang H, Erickson R, 2007. Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on *Pythium* damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology* 155(1): 31–37.
- Huang H, Erickson R, Hsieh T, 2007. Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. *Crop Protection* 26(7): 1055–1061.
- Konig F, Sandri MR, Russi A, Granada CE, Schwambach J, 2024. Biocontrol of tomato pathogens by *Bacillus subtilis* F62 and its synergistic action in plant growth promotion with *Rhizobium* sp. L5. *Biocontrol Science & Technology* 1–15.
- Kour D, Kaur T, Devi R, Rana KL, Yadav N, 2020. Biotechnological applications of beneficial microbiomes for evergreen agriculture and human health. In: Kour D, Kaur T, Devi R, Rana KL, Yadav N, Rastegari AA, Yadav AN (eds). *New & Future Developments in Microbial Biotechnology & Bioengineering*. Elsevier. Pp. 255–279.
- Mafakheri H, Taghavi SM, Zarei S, Portier P, Dimkic I, 2022. *Xanthomonas bonasiae* sp. nov. and *Xanthomonas youngii* sp. nov., isolated from crown gall tissues. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 72(6): 005418.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, 1998. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied & Environmental Microbiology* 64(2): 795–799.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VF, 2011. ROS signaling: the new wave. *Trends in plant Science* 16(6): 300–309.
- Nakei M, Venkataramana P, Ndakidemi P, 2024. Evaluating *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as potential biocontrol agents for root rot fungi in soybean seedlings. *Technology in Agronomy* 4(1): 1_11.
- Nicoli MC, Elizalde BE, Pitotti A, Lerici CR, 1991. Effect of sugars and maillard reaction products on polyphenol oxidase and peroxidase activity in food. *Journal of Food Biochemistry* 15(3): 169–184.
- Osdaghi E, 2014. Bacterial wilt of lima bean (*Phaseolus lunatus*) caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, a new disease in Iran. *Journal of Plant Pathology* 96(4): S118–S118.
- Osdaghi E, Young AJ, Harveson RM, 2020. Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Molecular Plant Pathology* 21(5): 605–621.
- Petruta CC, Catalina V, Matilda C, Sorina D, Manuela C, 2008. In vitro inhibition of *Erwinia amylovora* Romanian isolates by new antagonistic bacterial strains. *Romanian Biotechnological Letters journal* . 13(3): 1–10.
- Plewa MJ, Smith SR, Wagner ED, 1991. Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation Research/Fundamental & Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 247(1): 57–64.
- Roland SF, Laima SK, 1999. Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agriculture* 1: 1–5.

- Schaad NW, Jones BJ, Chun W, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria: (3rd ed). American Phytopathological Society (APS Press), St. Paule, USA. 373 PP.
- Sendi Y, Pfeiffer T, Koch E, Mhadhbi H, Mrabet M, 2020. Potential of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) root microbiome in the biocontrol of root rot disease and traits of performance. *Journal of Plant Diseases & Protection* 127(4): 453–462.
- Sewelam N, Kazan K, Thomas-Hall SR, Kidd BN, Manners J, 2013. Ethylene response factor 6 is a regulator of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *PLoS One* 8(8): e70289.
- Son HJ, Park GT, Cha MS, Heo MS, 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. *Bioresource Technology* 97(2): 204–210.
- Timmermann T, Armijo G, Donoso R, Seguel A, Holuigue L, *et al.*, 2017. Paraburkholderia phytofirmans PsJN protects *Arabidopsis thaliana* against a virulent strain of *Pseudomonas syringae* through the activation of induced resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30(3): 215–230.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F. Higgins DG, 1997. The Clustal_x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876–4882.
- Urrea CA, Harveson RM, 2014. Identification of sources of bacterial wilt resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Disease* 98(7): 973–976.
- Vargas LK, Volpiano CG, Lisboa BB, Giongo A, Beneduzi A, 2017. Potential of Rhizobia as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. Springer. 153–174 PP.
- Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, Van Loon L, *et al.*, 2004. The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(8): 895–908.
- Vincent JM, 1970. A Manual for the Practical Study of the Root-Nodule Bacteria. Publisher for the International Biological Programme by Blackwell Scientific. 164 PP.
- Yazdi Samadi B, Abdemeyshaei S, 1996. Agronomical plant breeding. Iran University press, 283 PP. (In Farsi).