بررسی فعالیت ضدمیکروبی جدایه‌های باسیلوس اندوفیت بر علیه باکتری نوار قهوه‌ای برنج

سید محمد علوی[۱،*]، سعید طریقی[۲]، حشمت اله رحیمیان[۳]

۱ - دانشجوی دکتری باکتری شناسی گیاهی- گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشیار باکتری شناسی - گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد باکتری شناسی - گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

Email: smalavi59@yahoo.com*

چکیده

هفده جدایه از باکتری اندوفیت طی یک بررسی در درختان جنگلی مازندران جداسازی شدند. بررسی‌های بیوشیمیایی و پروتئینی جدایه‌ها سبب گروهبندی باکتری‌ها در چهار گروه متفاوت گردید. سپس با روش مولکولی بر پایه 16S rDNA و ویژگیهای بیوشیمیایی تعیین شده، وجود گونه‌های *Bacillus subtilis*، *B. megaterium*، *B. thuringiensis* و *B. endophyticus* در بین نمونه‌ها تایید شد. نتایج ارزیابی ضدمیکروبی بر علیه باکتری *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* عامل بیماری نوار قهوه‌ای (Bacterial brown stripe) برنج در شرایط محیط کشت نشان داد که گونه‌های *B. subtilis* و *B. megaterium* بیشترین هاله بازدارنده را بر علیه باکتری نوار قهوه‌ای برنج تولید نمودند و جدایه-های مربوط به گونه‌های *B. thuringienesis* و *B. endophyticus* نتایج مثبتی را بر علیه باکتری نواری برنج در محیط کشت آزمایشگاهی نشان ندادند. فعالیت ضدمیکروبی گونه‌های باسیلوس بر علیه باکتری نوار قهوه‌ای برنج برای اولین بار در ایران بررسی می‌گردد.

واژگان کلیدی: اندوفیت، باسیلوس، ضدمیکروبی، نوار قهوه‌ای

مقدمه:

جنس باسیلوس جزء باکتری گرم مثبت متعلق به خانواده *Bacillaceae* می‌باشد. این جنس شامل گونه‌های متعددی دارای روابط متنوع با سایر موجودات زنده شامل همزیستی تا بیماریزایی را در بر دارد. علاوه بر این از خاک، آب، گیاه، بافت جانوران و سایر نمونه‌ها نیز جداسازی شدند و جزء باکتری همه‌جازی می‌باشد. در صنایع نیز از این باکتری برای اهداف مختلف نظیر تولید ریبوفلاوین، بتالاکتاماز و توکسین‌ها استفاده می‌شود. برخی ویژگیها نظیر تولید متابولیت‌های ثانویه بویژه آنتی‌بیوتیکها، تحمل بالا به تغییرات دما، رشد سریع در محیط کشت و تولید اندوسپور توانسته این باکتری را به عنوان عامل مهم، بی‌خطر و دارای پتانسیل بالا در کنترل بیولوژیک عامل بیماریزای گیاهی مبدل سازد. فاکتورهایی نظیر رقابت، القاء مقاومت سیستمیک، تولید و افزایش هورمون‌های گیاهی، لیپوپپتیدها، متابولیت‌ها، آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی و ترکیبات فرار از مهمترین پارامترهای موثر در کنترل بیولوژیک گونه‌های باسیلوس محسوب می‌گردند [۵، ۶ و ۷]. بررسی‌های زیادی در خصوص فعالیت ضدمیکروبی برخی گونه‌های باسیلوس خصوصاً *B. subtilis* بر علیه پاتوژن‌های گیاهی صورت گرفته است [۸ و ۹]. Ramachandran (۲۰۱۴) در طی یک بررسی بر روی تعدادی از باکتریهای بیماریزای انسانی به تاثیر باکتری *B. subtilis* بر روی این باکتریها اشاره نمود [۸]. Yilmaz در ۲۰۰۶ به اثر گونه‌های باسیلوس خاکزی بر روی باکتریهای خاک پرداخت و نتایج مثبتی ارائه نمود [۱۰]. در ایران نیز جمالی در سال ۱۳۸۱ اثر مثبت برخی استرین‌های *B. subtilis* بر علیه قارچ *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی نخودفرنگی را گزارش نمود [۳]. در تحقیق دیگری نیز قابلیت جدایه‌های *B. subtilis* را بر کنترل قارچ *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا را در ایران نشان دادند [۱]. ذاکری نیز تاثیر ضدقارچی باکتری *B. subtilis* بر علیه *Pythium ultimum* را مشخص نمود [۴].

بیماری نوار قهوه‌ای باکتریایی برنج که نواری شدن هم نامیده می‌شود در بسیاری از کشورهای آسیایی، آفریقایی،

آمریکایی و اروپایی گزارش شده است. این بیماری توسط باکتری *Avidovorax avenae* subsp. *avenae* ایجاد می‌شود که به صورت عمده بذرزاد است و بذرهای برنج آلوده به باکتری به عنوان منبع مهمی از زادمایه اولیه بیماری برای انتقال به مناطق دیگر می‌باشد[۲]. به همین منظور با توجه به نحوه انتقال بیماری و اهمیت بیماری در برنج‌کاریهای شمال کشور در خصوص ارزیابی اولیه تاثیر باسیلوس‌های اندوفیت بر روی این باکتری برای استفاده باکتری آنتاگونیست در سطح بذر و یا در خزانه با هدف نهایی کاهش استفاده از سموم در خزانه نشاء برنج اقدام نمودیم.

مواد و روش‌ها

جداسازی

نمونه‌ها در خرداد ۱۳۹۳ از شاخه‌های یکساله درختان جنگلی مازندران تهیه و به آزمایشگاه منتقل شد. قسمتهایی از پوست شاخه‌ها جدا و با آب شستشو شد و تحت شرایط استریل با اتانول ۷۵٪ برای ۱ دقیقه ضدعفونی سطحی و سپس با آب مقطر استریل دو تا سه بار آب کشیده شدند. قطعات تیمار شده در پلیت استریل حاوی مقدار اندکی آب مقطر خرد شده و حجم کمی از این مایع بر روی محیط کشت Nutrient Agar (NA) به صورت مخطط کشت شده و در دمای ۲۸°C تا نمایان شدن کلنی‌ها نگهداری شد.

شناسایی مولکولی

سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه جمع آوری و با Tris-HCL ۱۰ میلی مولار سه بار شسته شدند. از کیت GeneJET Genomic DNA Purification شرکت(Thermo Scientific, Germany) برای استخراج DNA استفاده شد. DNA کل به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) بکار گرفته شد تا ناحیه‌ی 16S rDNA با پرایمر رفت 27f (- 5´ AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG- 3´) و برگشت 1525r (´5-AAG GAG GTG WTC CAR CC-3´) تکثیر گردد. محصول PCR با استفاده از کیت GeneJET Gel Extraction kit شرکت Thermo Scientific خالص و به منظور توالی‌یابی ارسال شدند.

ارزیابی فعالیت بازدارندگی بر روی محیط کشت

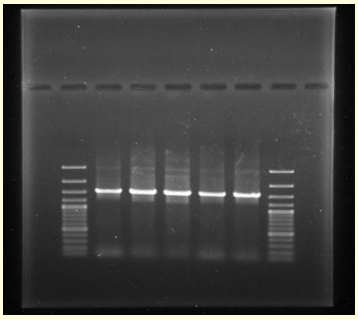
جدایه استاندارد باکتری نواری برنج (*Acidovorax avenae* subsp. *avenae*.) از کلکسیون میکروبی ICMP نیوزیلند با شماره ICMP 254 تهیه شد. محیط کشت NAS (نوترینت براث ۸ گرم، ساکاروز ۸ گرم، آگار ۱۰ گرم در یک لیتر آب) آماده و در شرایط اتوکلاو استریل گردید. محیط کشت در پتری ۱۰ سانتی‌متری پخش و در شرایط استریل نگهدای شدند. باکتری *A. a. a* با OD ۰.۴ بر روی محیط کشت با میله شیشه‌ای استریل پخش و بعد از چند دقیقه مقدار پنج میکرولیتر از هر کدام از جدایه‌های باسیلوس‌ها با OD ۱ در سه قسمت مجزا در پتری‌دیش به فاصله تقریباً یکنواخت قرار گرفتند و پتری‌ها در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت برای مشاهده هاله بازدارنده اقدام شد.

نتایج و بحث

هفده جدایه باسیلوس دارای کلونی باسیلوس (شکل ۱) بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. همه‌ی جدایه‌ها گرم مثبت، میله‌ای شکل، هوازی، متحرک و کاتالاز مثبت بوده و توانایی تشکیل اندوسپور را داشتند. همه باسیلوس‌های بررسی شده از پوست درخت جنگلی ممرز کشت و جداسازی گردیدند.

شکل ۱) کلنی‌های جدایه‌های باسیلوس کشت شده در محیط NAS

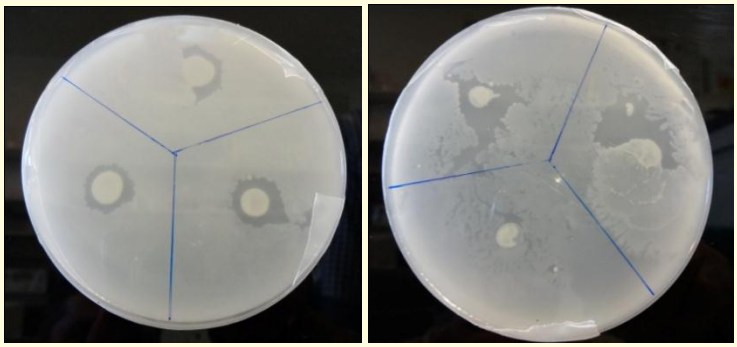
الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱٪ مشخص گردید که پرایمر های F27 و R1525 توالی مورد نظر را تکثیر کردند (شکل ۲). پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌های 16S rDNAجدایه‌ها با توالی‌های ثبت شده موجود در بانک ژن NCBI با استفاده از برنامه BLASTn ، نزدیکترین گونه‌ها مشخص گردید که جمعیت‌های باسیلوس جداشده در درختان ممرز از چهار گونه *Bacillus subtilis*، *B. megaterium*، *B. thuringiensis* و *B. endophyticus* تشکیل و تایید شد.



شکل ۲) ژل آگاروز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مربوط به آغازگرهای 27f و 1525r به همراه مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بار مثبت

در بین ۱۷ جدایه‌ای که بررسی شدند تعداد نه نمونه در گونه *B. subtilis* و سه جدایه در گونه *B. megaterium* و سه مورد در گونه *B. thuringienesis* و دو نمونه در گونه *B. endophyticus* دسته‌بندی شدند. البته تائید دقیق این گونه‌ها در حال بررسی با استفاده از نشانگرهای مولکولی نظیر ERIC، BOX و بررسی ژنهای محافظت شده نظیر rpoD، gyrB و DnaK می‌باشد.

در ۱۷ جدایه مورد مطالعه، هفت نمونه دارای اثرات ضدباکتری متشکل از پنج جدایه در گونه *B. subtilis* و دو جدایه گونه *B. megaterium* بودند که به خوبی توانستند هاله بازدارنده بر علیه باکتری نوار قهوه‌ای برنج را در شرایط محیط کشت تولید نمایند (شکل ۳). هاله تولید شده در گونه *B. subtilis* به طور متوسط ۱۱ میلی‌متر که حداقل ۱۰ و حداکثر ۱۲ میلی‌متر بودند. هاله بازدارنده در گونه *B. megaterium* حدود ۱۶ میلی‌متر اندازه‌گیری شد که از حداقل ۱۴ و حداکثر ۱۷ میلی‌متر را شامل بودند. این اندازه‌گیری‌ها با استفاده از دستگاه کولیس دیجیتال Guanglu و در سه مقطع زمانی تکرار شده و میانگین آنها محاسبه گردید.



شکل ۲) هاله بازدارنده *B. subtilis* بر علیه باکتری نوار قهوه‌ای برنج (چپ) و هاله بازدارنده *B. megaterium* بر علیه باکتری مولد نوار قهوه‌ای برنج (راست)

باسیلوس‌های جدا شده از پوست درختان ممرز کشت و خالص شدند و سایر درختان مطالعه شده نظیر بلوط، راش، افرا و لیلکی فاقد اندوفیت باسیلوس بودند. از آنجایی که درختان جنگلی ممرز دارای خواص ضدمیکروبی می‌باشد و گونه‌های باسیلوس نیز توانایی تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌های معمول و متعارف را دارند شاید بتوان خواص ضد میکروبی عصاره‌ی درخت ممرز را تا حدی ناشی از وجود باسیلوس‌های اندوفیت و متابولیت‌های ثانویه این باکتری‌ها و یا تحریک گیاهان به تولید مواد ضدمیکروبی در اثر همزیستی و ارتباط با باسیلوس‌های اندوفیت در آنها دانست. البته شناسایی ترکیبات ضدمیکروبی گونه‌های باسیلوس مطالعه شده با استفاده از دستگاه GC-MS و توانایی اندوفیت شدن آنها با گیاهان استراتژیک برنج و گندم نیاز به بررسی می‌باشد.

منابع مورد استفاده

۱. پیغامی آشنایی س، شریفی تهرانی ع، احمدزاده م و بهبودی ک، ۱۳۸۷. بررسی قابلیت رشد بیوکنترل دو جدایه از *Bacillus subtilis* روی محیط‌های کشت مختلف به منظور مبارزه بیولوژیک علیه مرگ گیاهچه لوبیا در اثر *Rhizoctonia solani*، خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان. صفحه ۳۴۶.

۲. تقی‌پور م، رحیمیان ح و بابایی‌زاد و، ۱۳۹۴. تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Acidovorax oryzae* عامل نوار قهوه‌ای برنج در استان مازندران. بیماریهای گیاهی، جلد ۵۱، شماره ۱. صفحه‌های ۲۶-۱۱.

۳. جمالی ف، ۱۳۸۱. بررسی اثر آنتاگونیستی چند باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۴. سلسله ذاکری ش، اخوان سپهی ع و رضاپناه م ر، ۱۳۸۷. بررسی فعالیت و ترکیبات ضدقارچی باکتری *Bacillus subtilis* علیه برخی قارچ‌های بیماریزای گیاهی، خلاصه مقالات هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی‌سینا همدان. صفحه ۲۹۹.

5. Barka EA, Gognies S, Nowak J, Audran JC, and Belarbi A, 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control 24(2): 135-142.
6. Ji X, Lu G, Gai Y, Zheng C, Mu Z, 2008. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain. FEMS Microbiology Ecology 65: 565–573.
7. Kloepper JW, Ryu CM, and Zhang S, 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp*. Phytopathology 94(11): 1259-1266.
8. Ramachandran R, Ghosh Chalasani A, Lal R, and Roym U, 2014. A Broad-Spectrum Antimicrobial Activity of *Bacillus subtilis*. RLID 12.1. The Scientific World Journal 10 pages.
9. Sari E, Etebarian HR, Roustaei, A, and Aminian H, 2006. Biological control of *Gaeumannomyces graminis* on wheat with *Bacillus spp*. Plant Pathology Journal *5*: 307-314.
10. Todorova S, and Kozhuharova L, 2010. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil. World Journal of Microbiology and Biotechnology 26: 1207–1216.
11. Yilmaz M, Soran H, and Beyatli, B, 2006. Antimicrobial activities of some *Bacillus spp*. strains isolated from the soil. Microbiological Research 161: 127—131.