مقاله تحقیقی

بررسی بیان ژن *eps E* و نقش اگزوپلی‌ساکارید باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* در کنترل بیماری پاخوره گندم

سعیده رنجبر چهاربرج، مسعود احمدزاده، امیر میرزادی گوهری

گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

مسئول مکاتبات: مسعود احمدزاده، ایمیل: ahmadz@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۱۱ ۸(۲) ۱۱۹-۱۳۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۹

چکیده

باکتری‌های محرک رشد گیاهی پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی به نام اگزوپلی ساکارید تولید می‌کنند که به صورت لایه کپسولی یا لعاب مانند اطراف باکتری احاطه، به زنده‌مانی و حفاظت از آن در تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی در منطقه ریزوسفر کمک می‌نماید، که در این میان، *Bacillus amyloliquefaciens* از نظر تولید انواع پلیمرها و ترکیبات ضدمیکروبی، از قبل مطرح بوده است. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم پاخوره می‌باشدکه بر اثر قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* ایجاد می‌شود. کنترل بیولوژیک این بیماری به توانایی کلنیزاسیون جمعیت باکتری در شرایط تنش‌های ریزوسفر بستگی دارد. در این تحقیق یکی از ژن‌های مهم در تولید پلیمر اگزوپلی‌ساکارید به نام ژن *eps E* در *B. amyloliquefaciens* ردیابی شد. به دنبال آن با بررسی بیان این ژن توسط تکنیک Real Time PCR نشان داده شد باکتری در تیمار مربوط به محیط کشت حاوی قندهای ساکارز و گلوکز در مقایسه با تیمار شاهد افزایش ۶۰ برابری در بیان ژن *eps E* داشته است. به‌منظور بررسی اثر بازدارندگی اگزوپلی ساکارید، آغشته‌سازی بذر در حضور قارچ بیمارگر در قالب طرح کاملاً تصادفی در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری بین گیاهانی که بذرشان با باکتری به همراه اگزوپلی‌ساکارید با مقدار بیشینه (محیط کشت حاوی قند ساکارز وگلوکز) و باکتری با مقدار کمینه اگزوپلی‌ساکارید (محیط کشت Nutrient broth) تیمار شده بود، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. میزان بازدارندگی بیماری در تیمار رقم باران به ترتیب ۸۸ و ۶۴ درصد و رقم اوحدی ۸۸ و ۵۶ درصد به ترتیب مربوط به محیط کشت حاوی EPS با مقدار بیشینه و محیط کشت NB (با مقدار کمینه EPS) بوده است. هم‌چنین، در بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داده شد که باکتری *B. amyloliquefaciens* با توانایی بالا در تولید EPS اثر کنترلی قابل توجهی علیه بیماری پاخوره در مقایسه با تیمار محیط کشت NB داشته است.

واژه‌های کلیدی: گندم، پاخوره، *Gaeumannomyces graminis*، کنترل بیولوژیک، *Bacillus amyloliquefaciens*

مقدمه

بسیاری از پلی‌مرهای زیستی که توسط میکروارگانیسم‌های باکتریایی تولید می‌شوند، به دو دسته کلی تقسیم می‌شوند: ۱– Exopolymeric substances (EPS) یا پلی‌مرهایی که درون باکتری ساخته و سپس به محیط بیرون منتقل می‌شوند. اگزوپلی‌مر یا پلی‌مر خارج سلولی (Exopolymeric substances (EPS در جنس باسیلوس خود به ۳ گروه عمده تقسیم می‌شود که شامل: الف– پلی‌مرهایی سطحی که در کاهش کشش سطحی و چسبیدن باکتری به سطح نقش دارند از قبیل سورفکتین (کاهش دهنده کشش سطحی)، فنجانسین (لیپوپپتید ضدقارچی، و ایتورین (لیپوپپتید ضدمیکروبی). ب–

EPSهای ساختاری که در تشکیل بیوفیلم باکتریایی از طریق برقراری تعاملات بین سلول‌های باکتریایی نقش دارند مانند پلی–گاما–گلوتامات. پ– پلی‌ساکاریدهایی که فعالیت آنزیمی و یا تغذیه‌ای در باکتری را دارند، مانند لوان ساکروز (Exopolysaccharide or Extrapolysaccharide). مطالعات زیادی نشان داده است که این مکانیسم در باکتری *B. amyloliquefaciens* می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده داشته باشد (Marvasi *et al.*, 2010)، یک لایه حفاظتی خارج سلولی متشکل از پلی‌ساکارید در میکروارگانیسم می‌باشد که سبب چسبیدن سلول باکتری به سطح ریشه می‌شود. باکتری‌ها با تولید اگزوپلی‌ساکارید منبع غذایی و آبی برای خود فراهم و pH محیط اطراف را متعادل نگه می‌دارند تا بتواند با افزایش زنده‌مانی در ریزوسفر گیاه را در برابر تنش-های زنده و غیرزنده حفظ نمایند (Malick, 2016). ۲–اندو لیپو پلی‌ساکارید که شامل لیپوپلی‌ساکارید و کپسول پلی-ساکاریدی، که بخشی از غشای برخی از باکتری‌ها را تشکیل می‌دهند.

گونه‌هایی از جنس باسیلوس از مهمترین باکتری‌های آنتاگونیست هستند که توانایی بالایی در تولید ترکیبات ضدمیکروبی دارند، به‌طوریکه می‌توانند با تولید اگزوپلی‌ساکارید به محیط اطراف خود با هدف حفظ قدرت زنده‌مانی جمعیت باکتریایی در شرایط ریزوسفری از استقرار بیمارگرهای قارچی ریشه مانند قارچ عامل پاخوره گندم ممانعت و ازطرفی سبب بهبود رشد گیاه هم شوند. براین اساس گونه‌های باسیلوس جزء میکروفلورهای سازگار ریشه گیاهان هستند (Wu *et al.*, 2015).

بیماری پاخوره ناشی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arex & Oliver در سطح جهانی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم و مهم‌ترین بیماری ریشه این محصول مهم زراعی است. گونه *G. graminis* دارای چهار واریته شناخته شده با دامنه میزبانی متفاوت شامل *G. graminis* var. *tritici* (Ggt)، *G. graminis* var. *avenae* (Gga)، *G. graminis* var. *graminis* (Ggg) و *G. graminis* var. *maydis* (Ggm) می‌باشد. مطالعات نشان داده است که ارقام مقاوم به بیماری پاخوره در گندم و جو گزارش نشده است (Kwak & Weller, 2013). عامل بیماری در سرتاسر دنیا در مناطقی که هوای سرد و معتدل (۱۲–۲۰ درجه سلسیوس) داشته وجود دارد. گندم زمستانه یکی از میزبان‌های اصلی این بیمارگر بوده و عامل این بیماری در هر منطقه که گندم زمستانه کاشته شود، رشد می‌کند. این بیماری در ایران در استان‌های فارس، آذربایجان غربی، اردبیل، گلستان، مرکزی، کرمانشاه، چهارمحال بختیاری بیشتر از سایر مناطق دیده می‌شود (Mohammadi Kohnehshahri *et al.*, 2018).

قارچ بیمارگر به‌صورت میسلیوم در گیاهان آلوده یا به‌صورت میسلیوم و پریتسیوم در بقایای آلوده گیاهان زنده‌مانی خود را حفظ می‌کند و آسکوسپورها در انتشار بیماری اهمیتی ندارند. در پاییز یا بهار، گیاهچه‌ها از طریق ریشه‌های در حال رشد به نزدیکی بقایای گیاهی کلنیزه شده به وسیله قارچ رسیده و با تماس برقرار کردن با میسلیوم قارچ، آلوده می‌شوند. آلودگی میزبان با نفوذ مستقیم میسلیوم قارچ به بافت ریشه یا طوقه صورت می‌گیرد. میزان مایه تلقیح قارچ در خاک تحت تأثیر شرایط محیطی خاک و آنتاگونیست‌های موجود در خاک می باشد. آلودگی ریشه در پاییز اتفاق می‌افتد و معمولاً در اوایل بهار به طوقه و قسمت‌های پایینی ساقه سرایت می‌کند (Cook, 2003). با نزدیک شدن گیاهان به مرحله خوشه‌دهی، علایم بیماری واضح‌تر می‌شود. ارتفاع بوته‌ها غیر یکنواخت شده و به نظر می‌رسد که گیاهان در چند مرحله رسیدگی مختلف باشند.

گیاهان آلوده در مرحله خوشه‌دهی تعداد پنجه‌های اندکی دارند، رسیدگی پیش از موعد داشته و سنبله‌هایشان سفید و عقیم می‌باشد. ریشه‌ها پراکنده، سیاه و ظریف می‌گردند. گیاهان آلوده را می‌توان به آسانی از طوقه‌هایشان با کشیدن از خاک خارج کرد. بد رنگی تیره روی ساقه، درست در بالای سطح خاک قابل مشاهده است که در طول آن یک توده از میسلیوم قهوه‌ای تیره رنگ قارچ زیر غلاف پایینی بین ساقه و غلاف برگ‌های داخلی دیده می‌شود (Hornby, 1998). میزان خسارت ۱۲/۵–۳ درصد برآورد

شده و در بعضی مواقع تا ۴۰ درصد هم گزارش می‌شود (Smiley & Cook, 1973). در حال حاضر بهترین مدیریت Take–all تناوب زراعی با فاصله از گندم، جو و یا گراس‌های مستعد برای مدت یک یا دو سال بسته به خاک و منطقه‌ی آب و هوایی است. از آن‌جا که تاکنون هیچ قارچکش موثر و ارقام مقاومی برای این بیماری گزارش نشده است، در سال‌های اخیر کاربرد میکرواگارنیسم‌های دارای توان بیوکنترل در شرایط آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در حال انجام است.

در مطالعه‌ای که توسط Merikhi *et al.* (2015) صورت گرفت نشان داده شد مجموعه‌ای از باکتری ساکن ریشه به‌ویژه سوموناده‌ای فلورسنت و باسیلوس‌ها در کنترل بیمارگرهای خاکزاد روش موثری می‌باشد. همچنین کاربرد جدایه‌های *Trichoderma* و باکتری *Pseudomonas fluorescens* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با تیمارهای شاهد نشان داد (Arianpour *et al.*, 2015). همچنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد باکتری‌های تولیدکننده پلی‌ساکارید خارج سلولی *P. fluorescens*، *B. polymyxa* و *B. amyloliquefaciens* با القای مقاومت از طریق تحریک فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله پراکسیداز سبب کاهش شدت بیماری در گیاهان گندم شده بودند Haggag (*et al.*, 2014). بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری پاخوره در شرایط گلخانه توسط باکتری‌های جدا شده از مزارع گندم استان همدان نشان داد که گونه‌هایی از باکتری‌های جنس سودوموناس و زانتوموناس با توان تولید آنتی‌بیوتیک، اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مثبت آلوده داشتند (Mohammad Abadi *et al.*, 2020).

در بررسی صورت گرفته در سال ۲۰۱۱ نشان داده شد باکتری‌هایی از جمله سودوموناس‌های فلورسنت با توان تشکیل بیوفیلم بالا نسبت به سایرین دارای توانایی بیشتری در بیوکنترل بیماری پاخوره گندم بودند (Bagheri *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای نشان داده شد تعدادی از گونه‌های باکتری باسیلوس با توانایی تولید انواع لیپوپپتیدهای ضدمیکروبی از قبیل ایتورین، سورفکتین، پلیپاستاتین، باسیلومایسن و دیفیسیدین شناسایی شده توسط HPLC بیشترین توان بیوکنترلی در برابر پاخوره داشتند (Yang *et al.*, 2018). جداسازی گونه‌های متفاوتی از باکتری‌های جنس *Bacillus*، *Burkholderia*، *Pseudomonas* و *Xanthomonas* از نمونه‌های مزارع مختلف گندم نشان داد از میان استرین‌های زیادی که غربال شدند، *Pseudomonas aureofaciens* و *B. subtilis* بیشترین تاثیر در کنترل بیماری پاخوره گندم در گلخانه را داشتند (Nasraoui *et al.*, 2007). از طرفی دیگر بررسی این مطالعات نشان داده است توانایی تولید بیوفیلم در باکتری‌ها می‌تواند یک ویژگی مهم در انتخاب باکتری‌های مفید به‌منظور کنترل بیماری پاخوره در نظر گرفته شود. به‌طور کلی تشکیل ساختار بیوفیلم از دو راه موجب افزایش توانایی بیوکنترلی در پروبیوتیک‌های گیاهی گردد: ۱– بیوفیلم سازوکاری مهم در بقای باکتری‌هاست. باکتری‌های درون بیوفیلم می‌توانند با شرایط اسمزی بیشتر، محدودیت اکسیژن بیشتر و تراکم سلولی بیشتر مقابله کنند. ۲– باکتری *Bacillus velezensis* به محض کلنیزاسیون ریشه مقدار زیادی بیوفیلم تولید کرده، مانع کلنیزاسیون ریشه به‌وسیله سایر میکروارگانیسم‌ها می‌شود (Ahmadzadeh & Sharifi Tehrani, 2022).

مطالعات بسیاری نشان داد که EPS در تشکیل بیوفیلم و توانایی باکتری در چسبیدن به سطح ریشه و کلنیزاسیون آن نقش مهمی دارد. در گزارشی که سال ۱۹۹۸ صورت گرفته بود، مشاهدات حاصل از میکروسکوپ الکترونی نشان داد *Pantoea agglomerans* به‌دلیل توانایی بالا در تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی سبب افزایش توانایی کلنیزاسیون سلول‌های باکتریایی در ریشه گندم و بازده مصرف آب شده بود (Amellal *et al.*, 1998). مطالعات زیادی نشان داده است که مکانیسم تولید اگزوپلی‌ساکارید در باکتری *B. amyloliquefaciens* می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده را داشته باشد (Marvasi *et al.*, 2010)، یک لایه حفاظتی خارج سلولی متشکل از پلی‌ساکارید در میکروارگانیسم که سبب چسبیدن سلول باکتری به سطح ریشه می‌شود و از طریق آن منبع غذایی و آبی برای خود فراهم و pH محیط اطراف را متعادل نگه

می‌دارند، در نتیجه با کلنیزاسیون موفق در محیط ریزوسفری دارای تنش زنده و غیرزنده از استقرار بیمارگرهای ریشه ممانعت نموده (Malick, 2016). از نظر مطالعات ژنومی تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی ایران ۱۶ ژنی دخیل است. در این اپران براساس ترتیب قرار گیری ژن‌ها بر روی آن از قبیل *eps* AB، *eps* C، *eps* D، *eps E*، *eps* F ، *eps* G ، *eps* H، *eps* I ، *eps* J، *eps* K، *eps* L، *eps* M، *eps* N و *eps* O می‌باشند (Argianas, 2015). که در این میان بیان ژن *eps* E در محیط کشت تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید، کد کننده آنزیم گلیکوزیل ترانسفراز، ممانعت از حرکت باکتری در نتیجه دخیل در بهبود تشکیل بیوفیلم در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت (Lee, *et al*., 1997).

در این پژوهش، باتوجه به برخی از خصوصیات گزارش شده از باکتری *B. amyloliquefaciens* شامل توانایی تشکیل اندوسپور و به دنبال آن امکان بقا و رویش مجدد در شرایط نامساعد محیطی، تولید انواع پلیمرهای زیستی مانند سورفکتین با خاصیت کاهش دهنده کشش سطحی و حشره‌کشی، ایتورین و فنجانسین با خاصیت حشره‌کشی و ضدقارچی در شرایط آزمایشگاهی و فرمانتوری (Keshavarzi *et al*., 2017; Vahidinasab *et al*., 2019; Bagheri *et al*., 2018)، این باکتری به‌منظور بررسی توانایی بیوکنترلی بیماری پاخوره گندم با استفاده از پلیمر زیستی اگزوپلی‌ساکارید، انتخاب و اهداف زیر دنبال گردید.

در این مطالعه ابتدا ژن دخیل در تولید پلیمر *eps E* در باکتری ردیابی و برای تعیین اهمیت نوع منبع قندی در محیط کشت در میزان تولید بهینه اگزوپلی‌ساکارید، بیان ژن *eps E* با تکنیک Real Time PCR بررسی شد. در نهایت برای بررسی تاثیر میزان بیشتری از اگزوپلی‌ساکارید بر روی توانایی بیوکنترلی باکتریایی بر روی حفظ تنومندی گیاهچه در برابر بیماگرقارچی پاخوره عامل پوسیدگی ریشه گندم، بازدارندگی از رشد قارچ در آزمایشگاه و گلخانه بر روی ارقام گندم باران و اوحدی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه بیمارگر قارچی و باکتری آنتاگونیست

در این پژوهش، باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* UTB96 از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت شد. قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) از کلکسیون قارچ‌شناسی آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران تهیه و خالص سازی آن انجام شد.

ردیابی وجود ژن *eps E* در *Bacillus amyloliquefaciens* با استفاده از تکنیک PCR

باتوجه به اهمیت ژن *eps E* در سنتز پلی‌ساکارید خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم، این ژن انتخاب و در باکتری پس از استخراج DNA ردیابی شد. برنامه‌ی حرارتی PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده توسط نرم افزار Primer 3 plus (جدول ۱)، شامل یک مرحله‌ی واسرشته شدن اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و سپس یک برنامه ۴۰ چرخه‌ای با هرچرخه شامل ۲۰ ثانیه با دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه دمای ۶۰ درجه سلسیوس، ۲۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سلسیوس و یک بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه اجرا شد (Guttenplan *et al*., 2010).

بررسی توان تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری

ابتدا به منظور بررسی توان تولید اگزولی ساکارید توسط *B. amyloliquefaciens*، ابتدا باکتری در محیط کشت Nutrient broth=NB کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوباسیون شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت تلقیح شده، به صورت لکه‌ای بر روی تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت شامل: ۲۰ گرم ساکارز و یا گلوکز، ۵ گرم پپتون، ۲ گرم دی‌پتاسیم‌فسفات، ۲ گرم مونوپتاسیم‌فسفات، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۱۰ گرم آمونیوم‌سولفات و ۱ گرم عصاره مخمری و ۱۵ گرم آگار با حجم یک لیتر و pH=7 کشت داده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. در این بررسی خاصیت کشسانی و حالت لعاب اطراف کلنی مبنی

بر توانایی تولید پلیمرقندی، مورد بررسی قرار گرفت (Sirajunnisa *et al.*, 2013). در بررسی‌های مربوط به این مطالعه از محیط کشت NB یا Nutrient Agar به عنوان تیمار شاهد که کمترین میزان اگزوپلی‌ساکارید را دارد، برای مقایسه در ارزیابی‌های مربوط به تاثیر مقدار کم و زیاد EPS در میزان توانایی بیوکنترلی باکتری استفاده شد. برای این منظور مقدار اگزوپلی‌ساکارید تولید شده در محیط کشت‌های دارای قند ساکارز و یا گلوکز و NB پس از کشت باکتری در هریک از محیط کشت‌های مربوطه و انکوباسیون آن‌ها، مقدار پلیمر تولید شده در محیط کشت‌ها استخراج و توزین شد.

جداسازی و استخراج EPS

به منظور بررسی میزان تولید اگزوپلی ساکارید، هریک از محیط کشت‌های تلقیح شده حاوی قندهای گلوکز و ساکارز و محیط کشت NB به لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به فالکون جدید منتقل و سپس حجم مساوی اتانول سرد اضافه و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه تیمارها سانتریفیوژ و پس از حذف فاز رویی (سوپرناتانت)، به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک فاز رسوبی هریک از تیمارها در دمای ۶۰ درجه سلسیوس دستگاه فور قرار داده شدند.

جدول ۱– توالی آغازگرهای ژن *eps E*

Table 1. Primers sequence of *eps E* gene

Name of primer	Primer direction	Primer sequence
eps–F	Forward	5´ – CGCCTCTTACGCCAAATTCAT–3´
eps–R	Reverse	5´ – GTCAGGACGGAGATGACCTTT–3´

بررسی بیان ژن *eps E* با استفاده از تکنیک Real Time PCR در محیط کشت تولید کننده اگزوپلی‌ساکارید

پس از آن‌که وجود ژن *eps E* توسط واکنش PCR اثبات گردید. به‌منظور بررسی اثر ترکیب محیط کشت بر روی میزان بیان *eps E*در مقایسه با محیط کشت NB از تکنیک Real time PCR استفاده شد. واکنش‌های Real Time PCR در دستگاه StepOne Real Time PCR (Applied Biosyscience, USA) و کیت 2x SYBR green (Ampliqon, Denmark) برنامه دمایی استفاده شده شامل دمای نگهداری اولیه ۹۵ درجه به مدت ۱۵ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۷ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه به مدت ۲۰ ثانیه می‌باشد. در نهایت مرحله آزمون نقطه ذوب با شیب دمایی ۰/۳ درجه سلسیوس اجرا شد. میزان بیان ژن *eps E* پس از به‌دست آوردن Ct (آستانه چرخه) در هر یک از نمونه‌ها، با فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه و آنالیز آن توسط روش Livak *et al.*, (2001) صورت گرفت. در این تکنیک از ژن 16srRNA به‌عنوان ژن مرجع یا خانه‌دار استفاده شد (Weimin *et al.*, 2011). استخراج RNA از باکتری و سنتز cDNA با استفاده از روش Weimin *et al.*, (2011) انجام گرفت.

بررسی اثر EPS در میزان جذب زیستی فلزات سنگین

جهت بررسی توانایی اگزوپلی‌ساکارید در جذب زیستی فلز سنگین، فلزات مس وکبالت برای ادامه این بررسی انتخاب شدند برای این منظور، ابتدا توانایی زنده مانی و رشد باکتری در حضور فلز سنگین مس وکبالت به صورت نمک‌های سولفات مس وکلرید کبالت در محیط

کشت حاوی ۲۰ گرم ساکارز و یا گلوکز، ۵ گرم پپتون، ۲ گرم دی‌پتاسیم‌فسفات، ۲ گرم مونوپتاسیم‌فسفات، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات ۷ آبه، ۱۰ گرم آمونیوم‌سولفات و ۱ گرم عصاره مخمری و ۱۵ گرم آگار با حجم یک لیتر و pH=7 سنجیده شد. برای تعیین توانایی رشد و زنده مانی باکتری در حضور فلزات سنگین با روش سری رقت میزان جمعیت باکتری به دست آمد. پس از بررسی توانایی زنده‌مانی باکتری در حضور فلزات مس وکبالت، غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پی پی ام در محیط کشت ذکر شده، اضافه و پس از تلقیح سوپانسیون باکتریایی، به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. در نهایت پس از سانتریفیوژ تیمارها با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه، فاز رویی هریک از تیمارها ار فیلتر ۰/۲ میکرومتری عبور داده شدند و فاز مایع عبوری از فیلتر برای آزمایشگاه آریا شیمی شریف– مرکز تخصصی آنالیز مواد معدنی و آلی جهت آنالیز میزان فلزات مس و کبالت ارسال گردید. درصد جذب زیستی فلز سنگین با فرمول زیر محاسبه شد (Gutpa & Diwan, 2017).

$$x = (\frac{1-F}{I}) \times 100$$

X: درصد جذب زیستی فلزسنگین

F: غلظت نهایی فلز سنگین

I: غلظت اولیه فلز سنگین

بررسی تأثیر باکتری به همراه EPS بر جوانه‌زنی بذور گندم در شرایط آزمایشگاهی

جهت بررسی تأثیر اگزوپلی‌ساکارید بر میزان جوانه‌زنی بذور ابتدا برای هریک از تیمارها از قبیل محیط کشت حاوی مقدار بیشینه از EPS به همراه باکتری، محیط کشت NB به عنوان تیمار دارای کمترین مقدار EPS و آب مقطر به‌عنوان تیمار شاهد، ۱۰ عدد بذر ضدعفونی شده تهیه شد. سپس لوله‌های فالکون با حجم ۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰ میلی-لیتر محیط کشت تلقیح شده با سوسپانسیون باکتریایی با میزان جمعیت 10^{-8} CFU/ml به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با دور ۱۸۰ در دقیقه در انکوباتور شیکردار قرار داده شد. در نهایت بذور پس از خشک شدن روی کاغذ صافی واتمن، روی کاغذ صافی سترون مرطوب درون پلیت‌ها؛ درون ژرميناتور و در دمای ۲۶ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. میزان جوانه-زنی بذور در هریک از تیمارها ثبت گردید (Ashraf *et al.*, 2004).

بررسی توان بازدارندگی از رشد بیمارگر توسط باکتری آنتاگونیست به همراه اگزوپلی‌ساکارید تولید شده

به منظور بررسی تاثیر اگزوپلی‌ساکارید بیشینه به همراه باکتری در بازدارندگی از رشد بیمارگر در مقایسه با تیمار شاهد (کمترین مقدار EPS)، ابتدا یک دیسک از کشت ۷ روزه قارچ پاخوره به فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از لبه پتری حاوی محیط کشت NA+PDA قرار داده شد. سپس ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به همراه اگزوپلی‌ساکارید تولید شده با فاصله ۴/۵ سانتی‌متر از قارچ بیمارگر قرار داده شد. تیمارها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از پر شدن سطح پتری مربوط به تیمار شاهد (قارچ پاخوره بدون کشت باکتری)، شعاع رشد میسلیوم قارچی در حضور باکتری همراه با بیشینه اگزوپلی‌ساکارید و باکتری با کمینه تولید اگزوپلی‌ساکارید (NB) و تیمار شاهد اندازه-گیری شد. درصد بازدارندگی از رشد قارچ با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Saechow *et al.*, 2018).

درصد بازدارندگی از رشد قارچ = $[(R1 - R2)/R1] \times 100$

R_1 = شعاع رشد میسلیوم قارچ در شاهد

R_2 = شعاع رشد میسلیوم قارچ در تیمار

بررسی تاثیراگزوپلی‌ساکارید در بازدارندگی از مرگ گیاهچه

در این ارزیابی از بذور ارقام گندم اوحدی و باران استفاده شد. ابتدا بذور با اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم رقیق شده ضدعفونی شدند. سپس بذور با

سوسپانسیون باکتریایی بذر محیط کشت (حاوی قند ساکارز وگلوکز) با بیشینه اگزوپلی‌ساکارید و محیط کشت NB تیمار شدند و پس از خشک شدن در مجاورت هوا به مدت ۲ ساعت، درون هر یک از لوله‌های آزمایشی حاوی محیط کشت Water agar یک بذر تلقیح شده به صورت مورب قرار داده شد. یک دیسک از کشت تازه قارچ پاخوره در کنار هریک از بذور درون لوله آزمایشی قرار داده شد. در این بررسی در تیمار شاهد بذور با آب مقطر استریل، تیمار تلقیح شدند. در نهایت لوله‌های آزمایشی به مدت ۷ روز در ژرمیناتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت به بررسی وجود علایم در محل خروج ریشه‌چه و ساقه‌چه از بذر اقدام شد (Saechow *et al*., 2018).

تأثیر اگزوپلی‌ساکارید به همراه باکتری در کنترل بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه‌ای

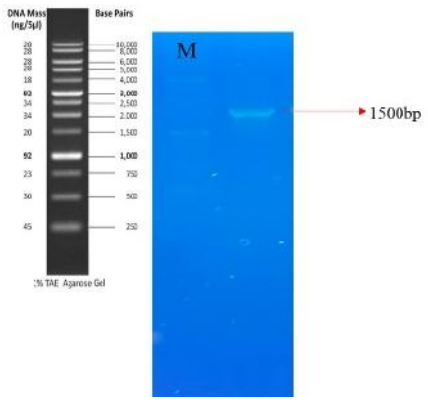
ابتدا ترکیبی از خاک به نسبت ۱:۱:۱:۱ خاک‌برگ، ماسه، پرلیت و خاک مزرعه تهیه و با روش Tyndalization (در دمای ۷۵ یا ۸۰ درجه سلسیوس به مدت یک ساعت در سه روز متوالی) استریل شد. بذور ارقام گندم اوحدی و باران با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۳ درصد، الکل اتانول ۷۰ درصد به ترتیب مدت ۱ و ۲ دقیقه ضدعفونی و در نهایت سه بار با آب مقطر شستشو داده شدند (Smiley & Yan, 2009). به‌منظور تهیه مایه تلقیح باکتریایی، ابتدا محیط کشت حاوی قند ساکارز و گلوکز و NB تهیه و پس از اتوکلاو هریک از محیط‌ها به میزان ۲ درصد از پیش کشت از قبل تهیه شده تلقیح و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با دور rpm ۱۷۰ در دقیقه نگهداری شدند. با استفاده از روش سری رقت میزان جمعیت باکتری در تیمارهای مورد بررسی به دست آمده و به میزان 10^8 CFU در هر میلی‌لیتر تهیه شدند. به ازای هر تیمار مورد بررسی ۶ عدد بذر ضدعفونی شده درون محیط کشت‌های مایع تلقیح شده قرار داده شد در نهایت به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در دور rpm ۱۷۰ در دقیقه جهت تلقیح بذور با سوسپانسیون باکتریایی قرار داده شد. هریک از گلدان‌های پلاستیکی با خاک استریل شده پر شدند و درون هریک از گلدان ها ۶ عدد بذر قرار داده شد. آزمایش گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. جهت تخمین میزان آلودگی در ارقام از روش BBCH– Scale توسط Witzenberger *et al*., (1989) استفاده شد. شدت بیماری و میزان کنترل بیماری براساس ارزش گذاری هریک از گیاهان آلوده در تیمارها طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{شدت بیماری} = \frac{\Sigma(\text{تعداد گیاهان با آن شاخص} \times \text{شاخص بیماری})}{\text{بالاترین شاخص بیماری} \times \text{تعداد کل گیاهان مورد بررسی}} \times ۱۰۰$$

نتایج

تکثیر ژن *eps E* در *Bacillus amyloliquefaciens* با استفاده از تکنیک PCR

توالی تکثیر شده به طول تقریبی ۱۵۰۰جفت باز توسط آغازگرهای ژن *eps E* نشان داد این ژن در باکتری وجود دارد (شکل ۱). بنابراین باتوجه به اهمیت ژن در تولید اگزوپلی‌ساکارید، میزان بیان ژن در محیط کشت دارای بیشینه مقدار اگزوپلی‌ساکارید در مقایسه با محیط کشت NB دارای کمینه مقدار EPS با استفاده از تکنیک Real time PCR بررسی شد.

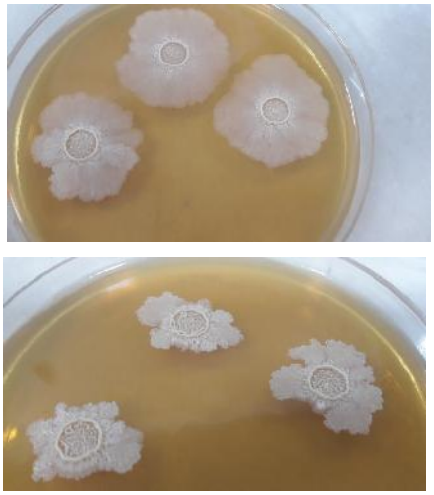


شکل ۱– باند مربوط به ژن *eps E* تکثیر شده به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز توسط تکنیک PCR

Fig. 1. A band amplified of *eps E* gene of 1500 bp by PCR

توان تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری *Bacillus amyloliquefaciens*

خاصیت کشسانی و حالت لعابی اطراف کلنی باکتریایی نشان داد این باکتری در محیط کشت حاوی مواد قندی و کربنی توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید را دارد (شکل ۲). هم‌چنین به صورت کمی نشان داده شد مقدار اگزوپلی‌ساکارید استخراج شده در محیط کشت حاوی قند ساکارز، گلوکز و محیط کشت NB به ترتیب ۱۱/۲، ۶ و ۰/۹ گرم بر لیتر بود.

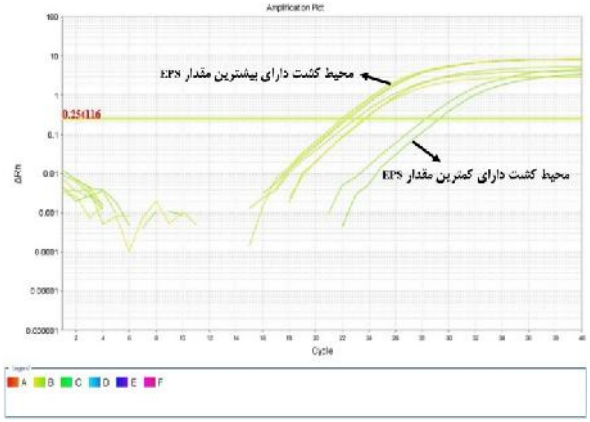


شکل ۲– تولید اگزوپلی‌ساکارید اطراف کلنی باکتریایی در محیط کشت جامد، به ترتیب عکس سمت پایین و بالا حاوی ۲۰ گرم گلوکز و ساکاروز به ازای یک لیتر محیط کشت

Fig. 2. Production of exopolysaccharide around bacterial colonies in solid culture medium. Lower and upper photo containing 20 g of glucose and sucrose per liter of culture medium, respectively.

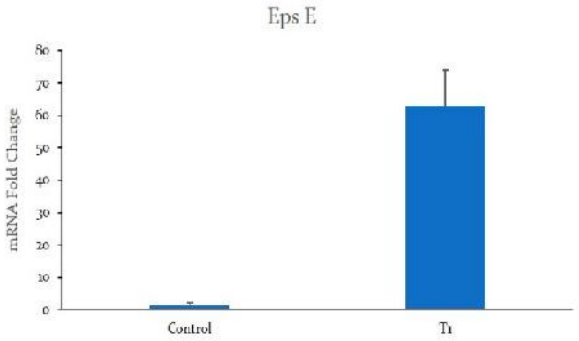
تعیین میزان بیان ژن *eps E* با تکنیک Real Time PCR

به منظور بررسی بیان ژن *epsE*، حد آستانه ژن مورد بررسی در هریک از تیمارهای محیط کشت تولید کننده پلیمر قندی و محیط کشت NB از طریق آنابیز داده‌های Real time PCR تعیین گردید (شکل ۳). سپس میزان افزایش چند برابری ژن *eps E* در محیط کشت حاوی قند ساکارز که دارای بیشترین مقدار کمی از اگزوپلی‌ساکارید بود در مقایسه با محیط کشت (NB) با کمترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید با نام Control به دست آمد (شکل ۲). نتایج این بررسی نشان می‌دهد بیان ژن *epsE* در محیط کشت حاوی قند ساکارز با هدف تولید بیشینه اگزوپلی‌ساکارید در مقایسه با محیط کشت شاهد (Control) افزایش ۶۰ برابری داشته است (شکل ۴).



شکل ۳– مقایسه میزان بیان ژن *eps E* در باکتری

Fig. 3. Comparative analysis of the *eps E* gene expression in bacterium

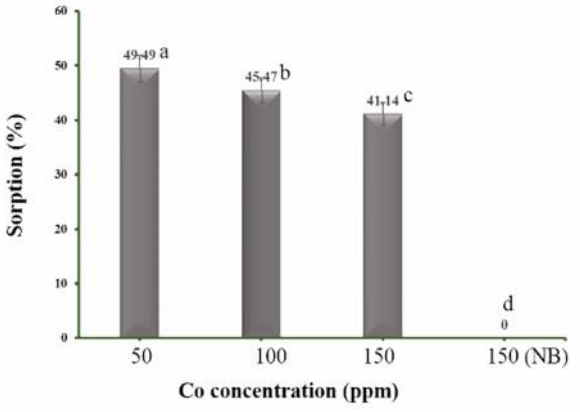


شکل ۴– تغییرات سطح بیان (Fold change) ژن *eps E* در تیمارهای محیط کشت مایع حاوی اگزوپلی ساکارید. T1 محیط کشت حاوی ۲۰ گرم ساکاروز در یک لیتر و control محیط کشت NB است.

Fig. 4. Relative expression of eps E gene in liquid culture medium containing exopolysaccharide. T1 medium containing 20 g of sucrose per liter. NB medium served as control.

اثر EPS در میزان جذب زیستی فلزات سنگین

تعیین مقدار فلز سنگین کبالت در محیط کشت بهینه حاوی منبع کربنی قند ساکارز و ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پی پی ام نشان داد باکتری همراه با تولید مقدار بالای اگزوپلی‌ساکارید به ترتیب در تیمارهای ذکر شده توانایی جذب ۴۹/۴۹، ۴۵/۴۷ و ۴۱/۱۴ درصد مقدار اولیه فلز سنگین را نشان داد. به طوری که در تیمار شاهد با کمترین تولید EPS نتایج آنالیز نشان داد باکتری توانایی جذب فلز سنگین اولیه اضافه شده به محیط کشت را نداشته است (شکل ۵).



شکل ۵–درصد جذب فلز سنگین کبالت توسط EPS. جذب مقدار اولیه فلز سنگین کبالت توسط EPS تولید شده در محیط کشت در مقایسه با تیمار شاهد حاوی سوسپانسیون باکتریایی بدون تولید EPS .

Fig. 5. Percentage of absorption of heavy metal cobalt by EPS. The initial amount of heavy metal cobalt absorbed by the EPS produced in comparison with control treatment containing bacterial suspension without producing EPS.

اثر EPS تولید شده به همراه باکتری بر جوانه‌زنی بذور گندم در شرایط آزمایشگاهی

نتایج به دست آمده با هدف بررسی اثر اگزوپلی‌ساکارید بر روی جوانه زنی بذور نشان داد پلیمر قندی تولید شده به مقدار بیشینه توسط باکتری اثر منفی بر روی قوه نامیه بذور نداشته است و پس از گذشت ۴۸ ساعت در دمای اتاق تقریباً همه بذور تیمار شده در مقایسه با تیمار شاهد جوانه زده بودند (جدول ۲).

جدول ۲– اثر EPS بر روی جوانه زنی بذور پس از ۴۸ ساعت

Table 2. Effect of EPS on seed germiation after 48 hours

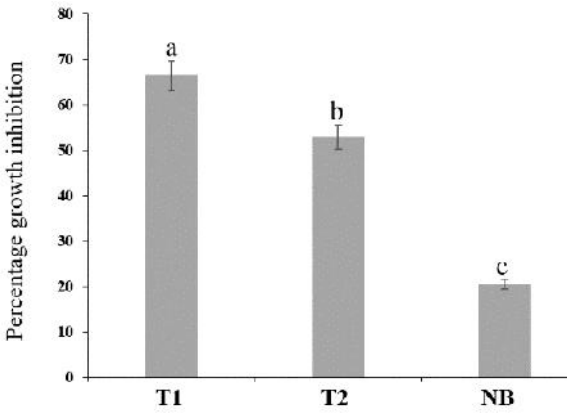
Treatment	Ohadi		Baran	
NB	8.66	Ab	8.33	Ab
20g Glucose	10	A	9.33	Ab
20g Sucrose	10.66	A	10.33	A
Distilled water (Control)	10	A	10	A

مقایسه میانگین با روش دانکن انجام شده است. حروف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است.

The mean comparison was performed with the Duncan method. Similar letters indicate no significant difference at the 1% level.

قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر توسط باکتری به همراه اگزوپلی‌ساکارید

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که اگزوپلی‌ساکارید تولید شده به مقدار بیشینه، در بازدارندگی از رشد قارچ اثر معنی‌داری داشته است. درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر قارچی در تیمار مربوط به مقدار بالایی از EPS، محیط کشت حاوی ۲۰ گرم ساکاروز ۶۶/۴۴ درصد و به ترتیب در سایر تیمارها مربوط به ۲۰ گرم گلوکز درصد بازدارندگی از رشد ۵۲/۸۸ می‌باشد. در تیمارهای مربوط به NB دارای کمترین مقدار پلیمر میزان بازدارندگی ۲۰/۶۶ بود (شکل ۶).

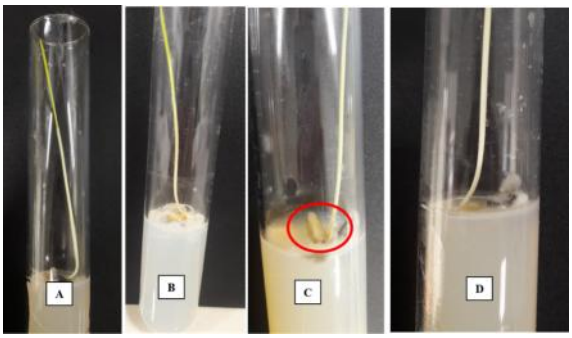


شکل ۶– درصد بازدارندگی از رشد بیمارگرقارچی توسط اگزوپلی ساکارید. به ترتیب تیمار T1، T2 و NB مربوط به محیط کشت حاوی ۲۰ گرم گلوگز، ۲۰ گرم ساکاروز با بیشترین مقدار EPS و NB به عنوان محیط کشت کمترین مقدار EPS. مقایسه میانگین با روش دانکن انجام شده است (هریک از تیمارهای دارای ۵ تکرار بودند). حروف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است.

Fig. 6. Percentage growth inhibition of fungal pathogen by exopolysaccharide. T1, T2 and NB treatments medium containing 20 g of glucose, 20 g of sucrose with high EPS and NB as culture medium with low EPS, respectively. The mean comparison was performed with Duncan method (Treatments with 2, 3, 4, and 5 replicates). Similar letters indicate no significant difference at the 1% level.

اثر باکتری به همراه اگزوپلی‌ساکارید در بازدارندگی از مرگ گیاهچه

بررسی مشاهدات نشان داد بذور تیمار شده با بیشترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید بدون هیچگونه علایم پوسیدگی در قسمت بذر و طوقه بودند. بذور تیمار شده در برابر بیمارگر قارچی حفاظت شده بودند. همچنین این بررسی نشان داد اگزوپلی‌ساکارید تولید شده اثر بازدارنده بر روی جوانه زنی بذور نداشته است. در این بررسی تیمار شاهد که بذور آب مقطر بذرمال شده بودند در برابر بیمارگر قارچی دچاری علایم پوسیدگی مانند لکه‌های قهوه‌ای بیضی شکل در قسمت طوقه شده بود (شکل ۷).



شکل ۷– بذور تلقیح شده با محیط کشت تولید کننده EPS A) حاوی ۲۰ گرم ساکاروز ، B) حاوی ۲۰ گرم گلوکز، C) آب مقطر، D) NB. عدم بروز علایم نکروتیک و سوختگی در قسمت طوقه در بذور تیمار شده با باکتری و اگزوپلی-ساکارید در مقایسه با شاهد (آب مقطر)، که لکه سوخته با کادر دایره‌ای مشخص شده است.

Fig. 7. Seeds inoculated with EPS producing medium A) containing 20 g of sucrose, B) containing 20 g of glucose, C) distilled water, D) NB. Absence of necrotic and burn symptoms in the crown part of the seedling treated with bacteria and exopolysaccharide in comparison with control (distilled water), where the necrotic and burn symptoms was idicated with a red circule.

اثر اگزوپلی‌ساکارید به همراه باکتری در کنترل بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه‌ای

تلقیح بذور با محیط کشت حاوی قند ساکارز و دارای بیشترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید به منظورکنترل بیماری پاخوره در شرایط گلخانه نشان داد بیشترین تعداد گیاه بدون علایم سیاه‌شدگی و تیرگی در محل طوقه مربوط به محیط کشت حاوی بالاترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید بوده است. اگزوپلی‌ساکارید تولید شده به همراه باکتری در محیط کشت حاوی قند ساکارز مقایسه با محیط کشت NB دارای کمترین مقدار اگزوپلی‌ساکارید توانایی بیوکنترلی باکتری را افزایش داده است. میزان بازدارندگی بیماری در تیمار بذور رقم باران به ترتیب ۸۸ و ۶۴ درصد و رقم اوحدی ۸۸ و ۵۶ درصد به ترتیب مربوط به محیط کشت حاوی بیشینه EPS و محیط کشت NB بوده است (جداول ۳ و ۴).

جدول ۳– درصد میزان بازدارندگی از بیماری در تیمار رقم باران

Table 3 . Percentage of disease inhibition in Baran cultivar

Scale	Disease severity in root and crown	Infected control	EPS treatment	NB medium
0	No symptoms	0	22	16
1	1 to 25 % of plant tissue darkening symptoms	2	2	4
2	26 to 50% of darkening symptoms	1	1	2
3	51 to 75% of infection in roots and crowns	3	0	3
4	76 to 100% of infection in roots and crowns	19	0	0
	Percentage of disease inhibition	0c	88a	64b
	Percentage of infection	100a	12c	24c
	Total number of plants studied	25	25	25

مقایسه میانگین با روش دانکن انجام شده است. حروف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است.

The mean comparison was performed with Duncan method. Similar letters indicate no significant difference at the 1% level.

جدول ۴– درصد میزان بازدارندگی از بیماری در تیمار رقم اوحدی

Table 4. Percentage of disease inhibition in Ohadi cultivar

Scale	Disease severity in root and crown	Infected control	EPS treatment	NB medium
0	No symptoms	0	20	14
1	1 to 25 % of plant tissue darkening symptoms	0	3	6
2	26 to 50% of darkening symptoms	1	2	4
3	51 to 75% of infection in roots and crowns	3	0	1
4	76 to 100% of infection in roots and crowns	21	0	0
	Percentage of disease inhibition	0c	80a	56b
	Percentage of infection	100a	20c	44b
	Total number of plants studied	25	25	25

مقایسه میانگین با روش دانکن انجام شده است. حروف مشابه نشانگر عدم وجود اختلاف آماری در سطح ۱ درصد است.

The mean comparison was performed with Duncan method. Similar letters indicate no significant difference at the 1% level.

بحث

پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌های باکتریایی از نظر تعامل با میزبان گیاهی به دو دسته تقسیم می‌شوند: پلی‌ساکاریدهای دخیل در بیماری‌زایی و پلی‌ساکاریدهای دخیل در پاسخ دفاعی میزبان. مطالعات زیادی نشان داده است که توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید در باکتری‌های جنس باسیلوس می‌تواند نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زنده و غیرزنده را داشته باشد (Marvasi *et al.*, 2010). این نتیجه در بررسی ما نیز اثبات شد که باکتری *B. amyloliquefaciens* وقتی در محیط کشت حاوی قند ساکارز و گلوکز کشت داده شد، اگزوپلی‌ساکارید اطراف کلنی باکتریایی با خاصیت کشسانی بالا تولید و به همراه

باکتری سبب حفاظت گیاه در برابر تنش زنده بیمارگر قارچی پاخوره گردید.

مطالعه ساختمان ژنومی مربوط به تولید اگزوپلی‌ساکارید در باکتری ها در سال ۲۰۱۰ نشان داده است از ۱۶ ژنی که در تولید اگزوپلی‌ساکارید باکتریایی نقش دارند که از این بین ژن *eps E* نقش مهمی در تولید EPS دارد به‌طوری‌که اهمیت بیان ژن *eps E* با انجام جهش حذفی و در نتیجه آن عدم تولید EPS در محیط کشت مربوطه گزارش شد (Guttenplan *et al*., 2010). بررسی اثر ترکیب محیط کشت دارای بیشنیه مقدار پلیمر بر روی میزان بیان ژن *eps E* در در مقایسه با محیط کشت NB با استفاده از تکنیک Real Time PCR اولین بار در این پژوهش انجام شده است.

جذب زیستی و به دنبال آن تجزیه زیستی، یکی دیگر از مکانیسم‌های باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد. این توانایی در باکتری *B. amyloliquefaciens* مطابق با نتایج گزارشات صورت گرفته است. در این بررسی‌ها نشان داده شد که *Baciluus firmus* توانایی بالایی در تولید پلیمر قندی دارد و این باکتری با تولید پلیمر زیستی از نوع اگزوپلی‌ساکارید فلز سنگین سرب را جذب کند (Salehizadeh and Shojaosadati, 2003). همچنین در مطالعه دیگر نشان داده شد که دو گونه از جنس باکتری باسیلوس مانند *B. cereus* و *B. pumilus* از طریق تولید پلیمر توانسته بودند فلز سنگین کروم را جذب و ۸۹ درصد از میزان اولیه فلز سنگین (۵۰ پی پی ام) را حذف نمایند (Sultan *et al*., 2013).

بررسی‌ها و مطالعات همچنین نشان داده است که از بین باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر گندم، باکتری‌هایی که توانایی بالایی در تولید اگزوپلی‌ساکارید داشته اند از قبیل *Aeromonas hydrophila/caviae, Bacillus insolitus* و *Bacillus* sp. سبب جوانه زنی تمام بذور نلقیح شده در مقایسه با بذور شاهد شده و اثر سویی در بازدارندگی از جوانه زنی بذور پس از ۴۸ ساعت نشده‌اند (Ashraf *et al*., 2004). این نتیجه ثبت شده مطابق با یافته‌های ما مبنی بر عدم اثر منفی اگزوپلی‌ساکارید به همراه باکتری بر روی جوانه‌زنی بذور گندم می‌باشد.

اگزوپلی‌ساکارید تولید شده توسط باکتری محرک رشد گیاهی در غلظت بالا می‌تواند یک ترکیب اسمولیت به منظور حفاظت باکتری در برابر تنش‌های غیر زنده باشد درحالی که در غلظت پایین می تواند سبب افزایش توانایی بیوکنترلی باکتری در برابر بیمارگرقارچی باشد. این توانایی در بررسی ما مطابق با گزارشات صورت گرفته همخوانی لازم را نشان داد، در حالی‌که در گزارشات صورت گرفته اثبات شد که گیاهچه‌های آفتابگردان وقتی در خاک آلوده به بیمارگر ریشه *Macrophomina phaseolina* رشد داده شده بودند باکتری *Pseudomonas aeruginosa* PF23 که بیشترین تولید EPS را داشت توانایی مقابله با بیماری را در شرایط گلخانه در مقایسه با تیمار شاهد داشت به طوری‌که درصد بیماری در گیاهان گلخانه‌ای در مقایسه با تیمار آلوده بسیار پایین تر بود. از طرفی، این باکتری به‌عنوان محرک رشد گیاهی سبب افزایش وزن اندام هوایی و دیگر فاکتورهای رشدی گیاه شده بود. در این گزارش نشادن داده شد اگزوپلی‌ساکارید علاوه حفاظت از باکتری در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده می‌تواند به سبب قدرت چسبندگی بالا و کلنیزاسیون قوی ریشه، توانایی بالقوه‌ای در کنترل بیمارگرهای خاکزاد ریشه به باکتری ببخشد (Tewari & Arora, 2014). در یک بررسی در سال ۲۰۱۶ نشان داده شد که تیمار بذورگندم با *Paenibacillus polymyxa* دارای توانایی بالا در تولید اگزوپلی‌ساکارید، در شرایط گلخانه سبب کاهش بیماری بلایت خوشه گندم و پوسیدگی فوزاریومی طوقه گندم *Fusarium graminearum, F. culmorum, F. verticillioides* و *Microdochium nivale* در مقایسه با تیمارهای آلوده همراه با افزایش وزن خشک ریشه در گیاه تیمار شده با باکتری شده است (Abd El–Daim *et al*., 2015). تیمار بذور گندم با *B. amyloliquenfacieans* و *B. subtilis* با توانایی تولید اگزوپلی‌ساکارید در کاهش علایم بیماری ناشی از قارچ *Fusarium graminearum* در گندم نان، شرایط گلخانه موثر گزارش شد (Zalila–Kolsi *et al*., 2016).

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد پلیمر زیستی می‌تواند یک راهکار در جذب زیستی فلزات سنگین در نظر گرفته شود. هم‌چنین نشان داده شد باکتری در صورت وجود منبع قندی مناسب با افزایش بیان ژن *eps E* سبب افزایش تولید اگزوپلی‌ساکارید می‌شود. بنابراین تولید اگزوپلی‌ساکارید توسط باکتری آنتاگونیست *B. amyloliquenfacieans* و مقدار آن در میزان قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگرقارچی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بدون آن‌که اثر سویی بر روی جوانه‌زنی بذور داشته باشد، می‌تواند نقش مهمی در افزایش توان بیوکنترل باکتری ایفا نماید. باتوجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، بهینه‌سازی محیط کشت باکتریایی باهدف تولید اگزوپلی‌ساکارید بیشتر به منظور افزایش توان بیوکنترل این باکتری آنتاگونیست پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه تهران و مدیرعامل محترم شرکت فن‌آوری زیستی طبیعت‌گرا (بایوران) جناب آقای دکتر همایون مرادی انجام گرفته است که موجب سپاسگزاری نگارندگان می‌باشد.

References

Abd El–Dai, I., Haggblom, P., Karlsson, M., Stenstrom, E. & Timmusk, S. 2015. *Paenibacillus polymyxa* A26 Sfp–type PPTase inactivation limits bacterial antagonism against *Fusarium graminearum* but not of *F. culmorum*. Frontiers in Plant Science, 1–8.

Ahmadzadeh, M. & Sharifi Tehrani, A. 2022. Biological control of plant diseases plant probiotic bacteria. University of Tehran Press. pp. 73–77. (In Persian with English summary)

Amellal, N., Burtin, G., Bartoli, F. & Heulin, T. 1998. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharides–producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. Applied and Environmental Microbiology, 64: 3740–3747.

Argianas, A. 2015. Characterization of Exopolysaccharide (EPS) Produced by *Bacillus subtilis* Mutants. pp. 38–47. Master's Theses, Loyola University Chicago.

Arianpour, A.M., Sadravi. M. & Taghavi, S.M. 2015. Biological control of wheat take–all disease with native isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* from Fars province. Applied Research in Plant Protection, 5(1): 159–168. (In Persian with English summary).

Ashraf, M. & Akram, N.A. 2009. Improving salinity tolerance of plants through conventional breeding and genetic engineering: an analytical comparison. Biotechnolology, 27: 744–52.

Bagheri, F., Rohani. H., Felahati Rastegar, M. & Saberi Riseh, R.A. 2011. Investigation on phase variation phenomenon in *Pseudomonads fluorescent* and their effect on control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* causal agent of take–all disease. Iranian Journal Plant Protection Science, 42(2):199–208. (In Persian with English summary)

Bagheri, N., Ahmadzadeh, M., Ghasemi, S., Vahidinasab, M. & Ghoreshi, S.A. 2018. *Bacillus amyloliquefaciens* UTB96, an effective biocontrol and aflatoxin– degrading bacterium. Biocontrol in Plant Protection, 6(1):1–17. (In Persian with English summary)

Cook, R.J. 2003. Take–all of wheat. Physiological and Molecular Plant Pathology. 62:73−86.

Gutpa, P. & Diwan, B. 2017. Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. Biotechnology Reports, 13:58–71.

Guttenplan, S.B., Blair, K.M. & Kearns, D.B. 2010. The *EpsE* flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to promote *Bacillus subtilis* biofilm formation. PLoS Genetics, 6(12):1–12.

Haggag, H. & Wafaa, M. 2014. Bacteria Polysaccharides Elicit Resistance of Wheat Against Some Biotic and Abiotic Stress. Pharmaceutical Sciences Review and Research, 29(2): 292–298.

Hornby, D. 1998. Take–All of Cereals. A Regional Perspective. CAB International, Wallingford, UK.

Keshavarzi, S., Ahmadzadeh, M., Mirzaei, S., Behboud, K. & Bandehpour, M. 2018. Enhancing surfactant production in *Bacillus subtilis* UTB96 by fermentation optimization. Biocontrol in Plant Protection, 5(2):13–26. (In Persian with English summary)

Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real–time quantitative PCR and the 2(–Delta Delta C (T)) method. Methods, 25: 402–408.

Malick, A. 2016. Exploring biodiversity for the produvtion of expolysaccharides from selected *Bacillus* species and characterization of their structural properties. The Thesis of the Post–Doctoral Studies. McGill University.

Manca, M.C., Lama, L., Improta, R., Esposito, E., Gambacorta, A. & Nicolaus, B. 1996. Chemical composition of two exopolysaccharides from *Bacillus thermoantarcticus*. Applied and Environmental Microbiology, 62: 3265–3269.

Marvasi, M., Visscher, P.T. & Martinez, L.C. 2010. Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. FEMS Microbiology Letters, 313(1): 1–9.

Merikhi, P., Abbasi, S. & Sharifi, R. 2015. Biological control of wheat take–all, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Bacillus* isolated from wheat rhizosphere. Paper presented at the First Symposium on Agriculture, Environment and Food Security, Jiroft, Iran. (In Persian with English summary)

Mohammad Abadi, M.G., Khodakaramian, G. & Zafari, D. 2020. The role of wheat endophytic bacteria in the induction of resistance against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* under greenhouse conditions. Biocontrol in Plant Protection, 7(2): 63–76. (In Persian with English summary)

Mohammadi Kohnehshahri, S., Abbasi, S., Sheikholeslami, M., Bahraminejad, S. & Safaei, D. 2019. Evaluation of resistance of some wheat cultivars to the take–all disease. Iranian Journal of Plant Protection Science, 50(1): 75–85. (In Persian with English summary)

Saechow. S. Thammasittirong. A. Kittakoop. P. Prachya. S. & Na–Ranong Thammasittirong. S. 2018. Antagonistic Activity against Dirty Panicle Rice Fungal Pathogens and Plant Growth–Promoting Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. Journal of Microbiology and Biotechnology. 28(9): 1527–1535.

Salehizadeh, H. & Shojaosadati, S. 2003. Removal of metalions from aqueous solution by polysaccharide produced from *Bacillus firmus*. Water Reseasrch, 37: 4231–4235.

Sirajunnisa, A.R., Vijayagopal, V. & Viruthagiri, T. 2013. Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. Turkish Journal of Biology, 37: 280–288.

Smiley, R.W. & Yan, H. 2009. Variability of *Fusarium* crown rot tolerances among cultivars and lines of spring and winter wheat. Plant Disease, 93: 945–961.

Sultan, S. Mubashar, K. & Faisal, M. 2012. Uptake of toxic Cr (VI) by biomass of exo–polysaccharides producing bacterial strains. African Journal of Microbiology Research, 6: 3329–3336.

Tewari, S. & Arora, N.K. 2014. Multi–functional exopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa* PF23 involved in plant growth stimulation, biocontrol and stress amelioration in sunflower under saline conditions. Current Microbiology, 69: 484–494.

Vahidinasab, M., Ahmadzadeh, M., Henkel, M., Hausmann, R. & Heravia, K.M. 2019. *Bacillus velezensis* UTB96 Is an Antifungal Soil Isolate with a Reduced Genome Size Compared to That of *Bacillus velezensis* FZB42. Microbiology Resource Announcements, 8(38): e00667–19.

Weimin, G., Weiwen, Z. & Deirdre, R. M. 2011. RT–qPCR based quantitative analysis of gene expression in single bacterial cells. Journal of Microbiological Methods, 85: 221–227.

Witzenberger, A., Hack, H. & Van den Boom, T. 1989. Erlauterungen zum BBCH–Dezimal–Code fur die Entwicklungsstadien des Getreides –mit Abbildungen. Gesunde Pflanzen, 41: 384–388 (In German)

Yang, L., Han, X., Zhang, F., Goodwin, P.H., Yang, Y., Li., J. & *et al*. 2018. ScreeningBacillus species as biological control agents of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat. Biology Control, 118: 1–9.

Zalila–Kolsi, I., Afif Ben, M., Hacina, A., Sellami, S., Zina, N., Tounsi, S. & Kais, J. 2016. Antagonist effects of *Bacillus* spp. strains against *Fusarium graminearum* for protection of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). Microbiological Research, 192: 148–158.

Evaluation of *eps E* gene expression and the role of the exopolysaccharide of *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of wheat take-all

Saeedeh Ranjbar, Masoud Ahmadzadeh, Amir Mirzadi Gohari

Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
Corresponding author: Ahmadzadeh, email: ahmadz@ut.ac.ir

Received: Sept., 02, 2021 8(2) 119–133 Accepted: Dec., 10, 2021

Abstract

Plant growth–promoting rhizobacteria (PGPR) release polysaccharides extracellularly into the environment called exopolysaccharides in the form of capsules or slime, protecting them from biotic and abiotic stress conditions and enabling them to survive in the rhizosphere. *Bacillus amyloliquefaciens* is well known for producing wide spectrum of biopolymers and antimicrobial compounds. On the other hand, take–all is one of the most important diseases of wheat caused by the fungus *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Biological control of this disease depends on the colonization of bacterial population in rhizosphere under stress conditions. In present study we targeted one of the most important genes in the production of exopolysaccharide polymer called *eps E* gene showed that bacterium has. The *eps E* gene expression analysis by Real Time PCR technique showed that bacteria in the treatment of culture medium prepared with sucrose and glucose compared with the control treatment had a 60–fold increase in *eps E* expression. The results of disease control showed that there was a significant difference in the disease incidence when seeds were treated with bacterium plus the maximum exopolysaccharide and bacterium with minimum exopolysaccharide, in comparison with a control treatment. The percentage disease inhibition recorded for the treatments of Baran cultivar 88 and 64% and Ouhadi cultivar 88 and 56% related to culture medium containing EPS with maximum amount and nutrient broth culture medium with minimum amount of EPS, respectively. The overall results of this study demonstrated that the *B. amyloliquefaciens* with high production of exopolysaccharide had a strong ability to control take–all disease in comparison with treatment of NB culture medium.

Keywords: wheat, take–all, *Gaeumannomyces graminis*, biocontrol, *Bacillus amyloliquefaciens*