University of Tehran Press

Journal of Crops Improvement

Online ISSN: 2345-6957

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

The Effect of PGPR on Biological Inhibition and the Activity of Some Antioxidant Enzymes of Two Resistant and Sensitive Genotypes of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Infected with *Fusarium graminearum* Fungus

Ehsan Hasanvand[1] | Mostafa Darvishnia[2]✉ | Hosein Mirzaei Najafgholi[3] | Samira Pakbaz[4]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: hasanvand.ehs@fa.lu.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: darvishnia.m@lu.ac.ir
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: mirzaei.h@lu.ac.ir
4. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran. E-mail: pakbaz.s@lu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received 13 July 2023
Received in revised form
2 May 2024
Accepted 27 July 2024
Published online 30 September 2024

Keywords:
Biological control
Enzyme
Growth promoting bacteria
Wheat blight disease

ABSTRACT

Objective: Every year, wheat is affected by various fungal diseases, including Fusarium blight. Seed inoculation with native PGPR is a suitable approach in health management, improving productions and their quality.
Methods: To evaluate the bioinhibition ability and activity of antioxidant enzymes peroxidase and catalase by endophytic bacteria in resistant and sensitive genotypes of wheat infected with FHB, a factorial experiment in the form of a completely randomized design was conducted in spring, 2022 at the Faculty of Agriculture of Lorestan University. The experimental treatments included four strains of *Pseudomonas brassicacearum*, *Pseudomonas* sp., *Exiguobacterium* sp., *Acinetobacter calcoaceticus* and their combination.
Results: Results showed that among the four isolates the highest percentage of growth inhibition of fungi was related to the *P. brassicacearum* isolate with a value of 49.33%. The activity of antioxidant enzymes both in the infected resistant and susceptible cultivars at different times after inoculation with fungus increased significantly compared to the control. The combined treatment of bacteria+ resistant cultivar+ infected showed the highest average activity of catalase with an average of 12.41 and the treatment B3+ sensitive cultivar+ control showed the lowest average catalase activity with an average of 3.59. Also, the combined treatment of bacteria+ resistant cultivar+ infected showed the highest average of 1.93 and the B3+ sensitive cultivar+ control treatment showed the lowest average of peroxidase enzyme activity with an average of 0.58.
Conclusion: Considering the high efficiency of the bacterial strains used in increasing the activity antioxidant enzymes and also their antifungal activity, they can be considered as a suitable option in producing healthy plants.

Cite this article: Hasanvand, E., Darvishnia, M., Mirzaei Najafgholi, H., & Pakbaz, S. (2024). The Effect of PGPR on Biological Inhibition and the Activity of Some Antioxidant Enzymes of Two Resistant and Sensitive Genotypes of Wheat (*Triticum aestivum* L.) Infected with Fusarium graminearum Fungus. *Journal of Crops Improvement*, 26 (3), 563-579. DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2024.362222.2833

© The Authors.
Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2024.362222.2833

انتشارات دانشگاه تهران

به زراعی کشاورزی

شاپا الکترونیکی: ۶۹۵۷-۲۳۴۵

Homepage: https://jci.ut.ac.ir/

تأثیر ریزوباکتری‌های محرک رشد بر مهار زیستی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دو ژنوتیپ مقاوم و حساس گندم (*Triticum aestivum* L.) آلوده به قارچ *Fusarium graminearum*

احسان حسنوند[۱] | مصطفی درویش‌نیا[۲]✉ | حسین میرزایی نجفقلی[۳] | سمیرا پاکباز[۴]

۱. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: hasanvand.ehs@fa.lu.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: darvishnia.m@lu.ac.ir
۳. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: mirzaei.h@lu.ac.ir
۴. گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران. رایانامه: pakbaz.s@lu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۶
تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۷/۰۹

کلیدواژه‌ها:
آنزیم
باکتری‌های محرک رشد
کنترل بیولوژیک
بیماری بلایت گندم

چکیده

هدف: گیاه گندم هر ساله تحت تأثیر بیماری‌های قارچی مختلف از جمله بلایت فوزاریومی سنبله گندم قرار می گیرد. تلقیح بذور با ریزوباکتری‌های بومی افزاینده رشد گیاه (PGPR)، رویکردی مناسب در مدیریت سلامت، بهبود تولید و کیفیت محصولات کشاورزی می‌باشد.

روش پژوهش: برای ارزیابی توانایی مهار زیستی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی پراکسیداز و کاتالاز توسط باکتری‌های اندوفیت در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس گندم آلوده به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در بهار ۱۴۰۱ در دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل چهار جدایه باکتری *Pseudomonas brassicacearum*، *Pseudomonas* sp.، *Exiguobacterium* sp.، *Acinetobacter calcoaceticus* و مخلوط آن‌ها بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که در توانایی مهار زیستی بین چهار جدایه، بیش‌ترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر مربوط به جدایهٔ *P. brassicacearum* با مقدار ۴۹/۳۳ درصد بود. فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (پراکسیداز و کاتالاز) هم در رقم مقاوم آلوده و هم در رقم حساس آلوده در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی با قارچ، نسبت به شاهد افزایش چشم‌گیری داشت. تیمار مخلوط باکتری+رقم مقاوم+ آلوده با میانگین ۱۲/۴۱ بیش‌ترین و تیمار B3+ حساس+ شاهد با میانگین ۳/۵۹ کم‌ترین میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان دادند. هم‌چنین تیمار مخلوط باکتری+رقم مقاوم+ آلوده با میانگین ۱/۹۳ بیش‌ترین و تیمار B3+ حساس+ شاهد با میانگین ۰/۵۸ کم‌ترین میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با توجه به کارایی بالای سویه‌های باکتریایی مورداستفاده در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و هم‌چنین توانایی فعالیت ضدقارچی آن‌ها می‌توانند به‌عنوان یک گزینه مناسب در تولید گیاهان سالم موردبررسی قرار گیرند.

استناد: حسنوند، احسان؛ درویش‌نیا، مصطفی؛ میرزایی نجفقلی، حسین و پاکباز، سمیرا (۱۴۰۳). تأثیر ریزوباکتری‌های محرک رشد بر مهار زیستی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی دو ژنوتیپ مقاوم و حساس گندم (*Triticum aestivum* L.) آلوده به قارچ *Fusarium graminearum*. *به‌زراعی کشاورزی*، ۲۶ (۳)، ۵۶۳-۵۷۹. DOI: https://doi.org/10.22059/jci.2024.362222.2833

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

۱. مقدمه

گندم از میان محصولات کشاورزی به‌دلیل نقش مهمی که در عرصهٔ سیاسی و اقتصادی کشورها به‌ویژه کشورهای در حال توسعه ایفا می‌کند، یک محصول استراتژیک در تمام دنیا به‌حساب می‌آید. در دنیای امروز، گندم نه‌تنها یک ماده غذایی اساسی و مهم است، بلکه از لحاظ سیاسی نیز اهمیتی هم‌پایه نفت و حتی برتر از آن دارد، در واقع باید گفت سلاح گندم از سلاح نظامی قدرتمندتر است (ایگرجاس[1] و برانلارد[2]، ۲۰۲۰). اهمیت گندم بیش‌تر مربوط به خواص فیزیکی و شیمیایی موادی است که دانه آن را تشکیل می‌دهد. اگرچه گندم را به‌عنوان یک منبع غذایی نشاسته‌ای در نظر می‌گیرند، اما حاوی سایر مواد غذایی با ارزش، مثل پروتئین‌ها، مواد معدنی و ویتامین‌ها نیز می‌باشد، به‌ویژه سبوس آن که دارای پروتئین و ویتامین‌های مختلفی از جمله ویتامین‌های گروه‌های (A, C, E, B) می‌باشد (لوی[3] و فلدمن[4]، ۲۰۲۲). سطح زیر کشت گندم بیش از ۲۱۵ میلیون هکتار و تولید بیش از ۷۵۰ میلیون تن در سال در سطح وسیعی از زمین‌های کشاورزی دنیا کشت می‌شود (فائو[5]، ۲۰۲۲). در ایران نیز این گیاه به‌عنوان مهم‌ترین و راهبردی‌ترین محصول کشاورزی شناخته می‌شود. سطح زیر کشت گندم در ایران در سال زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹ حدود ۸/۷ میلیون هکتار با تولید سالانه حدود ۲۳ میلیون تن می‌باشد (احمدی و همکاران، ۱۴۰۰).

گندم هر ساله در نتیجهٔ ابتلا به بیماری‌های مختلف به‌ویژه بیماری‌های قارچی متحمل آسیب زیادی می‌شود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم که در مناطق مختلف جهان به‌ویژه در اقلیم گرم و مرطوب باعث آسیب به این محصول می‌شود بلایت فوزاریومی سنبله[6] است که به نام اسکب[7] شناخته می‌شود. حدود ۱۷ گونه از قارچ فوزاریوم عامل این بیماری شناخته شده است که در این بین *Fusarium graminearum* Schwabe با شکل جنسی *Gibberella zea* (Schwein) Petch به‌عنوان عامل اصلی این بیماری، اغلب عملکرد و کیفیت گندم را به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (بلانوس کریل[8] و همکاران، ۲۰۱۶). با این‌که این بیماری از زمان‌های دور به‌طور پراکنده در ایران وجود داشته است، اما از اوایل دههٔ ۱۳۶۰ آلودگی زیادی از آن به‌ویژه در استان‌های گلستان و مازندران مشاهده شده است (ملی‌هاپیور[9] و همکاران، ۲۰۱۸). در سال زراعی ۱۳۷۲-۱۳۷۱ میزان خسارت این بیماری در بعضی مزارع استان گلستان بیش از ۸۰ درصد محصول گزارش شد (آقاجانی و همکاران، ۱۳۹۵). این بیماری به‌طور غیرمعمول در سال ۱۳۷۵ در برخی مناطق استان هرمزگان و در سال ۱۳۷۶ در برخی مزارع گندم جیرفت واقع در استان کرمان خسارت وارد کرد. هم‌چنین این بیماری در سال ۱۳۸۲ از استان خوزستان گزارش شد و در سال زراعی ۱۳۹۳-۱۳۹۲ به‌طور محدود در مناطق شوش و دزفول از این استان روی گندم دوروم رقم بهرنگ ظاهر شد هم‌چنین در صورت مساعدبودن شرایط جوی می‌تواند در هر منطقهٔ دیگر از کشور نیز خسارت وارد کند. آخرین گزارش از همه‌گیری بیماری بلایت فوزاریومی خوشه در ایران به سال ۱۳۹۰ در منطقه مغان برمی‌گردد که در آن خسارت قابل‌توجهی به رقم‌های حساس گندم وارد شد (دهقانپور[10]، ۲۰۲۱). به‌طور کلی در سال‌هایی که شدت بیماری زیاد بوده، در صورت عدم کنترل منجر به از دست‌دادن قوه نامیه، افت عملکرد به بیش از ۴۵ درصد و کاهش کیفیت دانه می‌شود (سبزعلی و همکاران، ۱۴۰۰). بلایت فوزاریومی سنبله (FHB) یک

1. Igrejas
2. Branlard
3. Levy
4. Feldman
5. Fao
6. Fusarium head blight
7. Scab
8. Bolanos-Carriel
9. Malihipour
10. Dehghanpour

تهدید بزرگ برای تولید گندم در سراسر جهان است. بروز اپیدمی‌های بلایت فوزاریومی سنبله با شرایط آب‌وهوایی به‌ویژه روزهای بارانی با دمای بالا در زمان گلدهی و فراوانی اینوکلوم اولیه ارتباط زیادی دارد که سبب کاهش عملکرد محصول تا ۸۰ درصد می‌شود (الیساک[1] و ماهلین[2]، ۲۰۲۳). کاهش عملکرد گندم با کوچک‌شدن دانه و کاهش وزن آن و هم‌چنین کاهش کیفیت با تولید مایکوتوکسین‌های مضر برای تغذیه انسان و حیوانات، همراه است. در پژوهشی طی سال‌های ۲۰۱۹-۲۰۱۰، افزایش آلودگی به مایکوتوکسین فوزاریوم گندم اروپایی دیده شد، با این‌حال کمبود داده در مورد بروز بلایت فوزاریومی سنبله در اروپا وجود دارد (جونز[3] و همکاران، ۲۰۲۲). در حقیقت هر ساله آلودگی گندم به بلایت فوزاریومی سنبله منجر به خسارت حدود ۲۸ میلیون تنی گندم به ارزش ۵/۶ میلیارد دلار می‌شود (پاول[4] و وجنویک[5]، ۲۰۲۱). قارچ عامل از طریق بساک وارد بافت سنبله می‌شود. آلودگی‌های اولیه به‌صورت لکه‌های کوچک آب سوخته مایل به قهوه‌ای در قاعده یا میانه پوشینک‌ها، سفید و قهوه‌ای‌شدن تک گلچه‌های آلوده بر روی سنبله‌ها در مزرعه و سبزماندن گلچه‌های سالم و متعاقب آن قهوه‌ای‌شدن محور راکیلا و راکیس در محل‌های آلودگی سنبله، سپس سفیدشدن کل سنبله و عقیمی و پوکی دانه‌ها از جمله علایم بارز بیماری می‌باشد (حسنوند[6] و همکاران، ۲۰۲۳). روش‌های توسعه‌یافته برای کنترل آلودگی‌های فوزاریومی غلات شامل روش‌های به‌زراعی، استفاده از ارقام مقاوم و قارچ‌کش‌هاست. استفاده از قارچ‌کش‌ها منجر به آلودگی محیط زیست و به‌خطر افتادن سلامت انسان و سایر موجودات شده و از طرفی به‌طور عمده دارای کارایی پایینی در کنترل این عوامل بیمارگر هستند. بنابراین پژوهش‌گران به سمت توسعه و استفاده از روش‌های محیط زیست دوستانه و مؤثر دیگر به‌عنوان مدیریت تلفیقی فوزاریوم‌ها سوق داده شده‌اند. استفاده از مهارگرهای زیستی یکی از مهم‌ترین روش‌های مورداستفاده در مدیریت تلفیقی بیماری‌های قارچی می‌باشد (گروسو[7] و همکاران، ۲۰۱۵). پتانسیل زیستی خاک یا جامعه میکروبی مفید خاک اعم از باکتری‌ها و قارچ‌ها به‌عنوان یک راه‌کار امیدبخش در کشاورزی پایدار مطرح است. کشاورزی پایدار شامل مدیریت موفق منابع طبیعی کشاورزی در جهت تأمین نیازهای بشر می‌باشد، در حالی‌که کیفیت محیط حفظ شده یا ارتقا پیدا می‌کند و منابع طبیعی حفظ می‌شوند. این رویکرد بایستی از نظر بیولوژیکی امکان‌پذیر، از نظر اکولوژیکی پایدار، از نظر اقتصادی بادوام و از نظر اجتماعی قابل‌پذیرش باشد (زورتی[8] و همکاران، ۲۰۱۸). پایداری با راه‌کارهایی مثل به حداقل‌رساندن کاربرد نهاده‌های خارجی، استفاده حداکثر از مزایای فرایندهای طبیعی و استفاده بهینه از منابع داخلی حاصل می‌شود (نایاک[9] و پتنگری[10]، ۲۰۱۵).

ریزوباکتری‌های افزایش‌دهندهٔ رشد گیاه (PGPR)[11] با تولید ترکیبات ضدقارچی، تولید سیدروفور، فراهم‌ساختن فسفر قابل جذب برای گیاه، تثبیت نیتروژن اتمسفری، تولید هورمون‌های گیاهی، رقابت برای مواد غذایی، محدودکردن نیچ اکولوژیکی و مقاومت القایی گیاه نقش مهمی را در کنترل بیولوژیکی آفات و ارگانیسم‌های مزاحم و بیماری‌زا ایفا می‌کنند (برادر[12] و همکاران، ۲۰۱۴). حملهٔ بیمارگرها، تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS)[13] مانند رادیکال سوپراکسید (O_2-)،

1. Alisaac
2. Mahlein
3. Johns
4. Powell
5. Vujanovic
6. Hasanvand
7. Grosu
8. Zortea
9. Nayak
10. Patangray
11. Plant growth promoting rhizobacteria
12. Brader
13. Reactive oxygen species

پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و رادیکال هیدروکسیل (OH) را در طول انفجارات اکسیداتیو را القا می‌کنند. افزایش تولید ROS در مدت تنش می‌تواند موجب ایجاد خطر در سلول شود، اما به‌نظر می‌رسد که ROS به‌عنوان سیگنال‌هایی برای فعال‌شدن پاسخ به تنش و مسیرهای دفاعی باشند. بنابراین ROS به‌عنوان نشانگرهای سلولی تنش و به‌عنوان فرستاده ثانویه درگیر در مسیر هدایت پاسخ به تنش به‌حساب می‌آیند (بلوخینا[1] و همکاران، ۲۰۰۳).

گیاهان با دارابودن سیستم دفاعی شامل ترکیبات آنزیمی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، گلوتاتیون پراکسیداز، آسکوربیت پراکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز) و غیرآنزیمی (اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، کاروتنوئیدها و توکوفرول) معمولاً سطوح ROS را در سلول در حد متعادل نگه می‌دارد (وجتازک[2]، ۱۹۹۷). کاتالاز یکی از آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر در سیستم دفاعی اکثر گیاهان در مقابله با تنش‌های غیرزیستی است. این آنزیم می‌تواند به‌طور مستقیم پراکسید هیدروژن را به آب و اکسیژن تبدیل کند و سمیت این رادیکال آزاد اکسیژن را به‌طور کامل حذف نماید (ازپیلیکوتا[3] و همکاران، ۲۰۰۷). آنتی‌اکسیدان دیگر پراکسیداز نام دارد که دارای فرم‌های متنوعی است و مسئول حذف پراکسید هیدروژن از سیستم‌های بیولوژی می‌باشد. به‌دلیل توانایی این آنتی اکسیدان در اکسیداسیون گوایکول آن را گوایکل پراکسیداز (GPX) نیز می‌نامند (آسادا[4]، ۱۹۹۹). پراکسیداز دارای توالی نوکلئوتیدی و نقش فیزیولوژیک متفاوتی نسبت به سایر آنتی‌اکسیدان‌های شناخته شده می‌باشد. این آنزیم با تجزیه ایندول‌تری استیک اسید (IAA)، نقشی مؤثر در تولید لیگنین و مصرف پراکسید هیدروژن و درنهایت مقاومت گیاهان در برابر بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارد (میلون[5] و همکاران، ۲۰۰۳).

هدف از پژوهش حاضر، ارزیابی توانایی کنترل زیستی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی پراکسیداز و کاتالاز توسط باکتری‌های اندوفیت در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس گندم آلوده به بیماری بلایت فوزاریومی سنبله است.

۲. پیشینه پژوهش

در قرن بیست و یکم تأمین غذای جمعیت کره زمین چالش بزرگی برای بخش کشاورزی به‌حساب می‌آید. افزون بر این تنش‌های غیرزیستی و زیستی تهدیدی بر تولیدات کشاورزی است. شور و سدیمی‌شدن خاک‌ها، فرسایش و تخریب اراضی، خشکسالی و گرمایش جهانی، بیماری‌ها و عوامل بیماری‌زا از جمله استرس‌های تهدیدکننده تولید به‌شمار می‌روند. به گونه‌ای که آمارها نشان می‌دهد، ۱۱ درصد از اراضی آسیا و اقیانوسیه به‌دلیل مواجه با شوری، سدیمی‌شدن و خشکسالی تخریب شده‌اند یا عوامل بیماری‌زای قارچی که به‌تنهایی حدود دو سوم کل بیماری‌های گیاهی را شامل می‌شود، می‌توانند میزان تولیدات کشاورزی را تا ۱۰ درصد کاهش دهد (گلیک[6]، ۲۰۱۲). در مواجه با مشکلات فوق ضروری است به گزینه‌هایی پرداخته شود که ضمن حفظ سلامت خاک‌ها و اراضی کشاورزی و کاهش مسائل زیست‌محیطی، تولیدات کشاورزی را نیز افزایش دهد. مطالعات زیادی بر روی امکان استفاده از کودهای زیستی بر روی محصولات متعدد به‌عمل آمده است. پژوهش‌های انجام‌شده نشان داده است که تغییرات صورت‌گرفته در کودهای زیستی از جمله وجود میکروب‌های حل‌کننده فسفات سبب کاهش اثرات سوء کودهای شیمیایی و حفظ محیط زیست می‌گردد (مرشدی و همکاران، ۱۴۰۲). گیاهان در چرخهٔ زندگی خود به تهدیدات مختلف محیط بیرونی واکنش نشان می دهند.

1. Blokhina
2. Wojtaszek
3. Azpilicueta
4. Asada
5. Milone
6. Glick

آن‌ها طیف وسیعی از استراتژی‌ها را توسعه داده‌اند که به‌عنوان دفاع یا پاسخ در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی شناخته می‌شوند (وجتازک[1]، ۱۹۹۷). پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی هستند که غلظت H_2O_2 را تنظیم می‌کنند (بارسلو[2]، ۱۹۹۷). H_2O_2 می‌تواند از ورود بیمارگر به داخل بافت گیاهی جلوگیری کند و به سلول‌های گیاه فرصت داده می‌شود که واکنش‌های دفاعی خود را که برای فعال‌شدن به زمان بیش‌تری نیاز دارد، تنظیم کند (درنر[3] و همکاران، ۱۹۹۷).

سویه[4] CHA0 باکتری *Pseudomonas fluorescens* به‌خوبی به‌عنوان یک باکتری افزایش‌دهنده رشد گیاه شناخته شده است و این سویه به‌عنوان یک باکتری مدل برای بررسی‌های مهار زیستی نیز به‌کار می‌رود (والر[5] و همکاران، ۲۰۰۷). بسیاری از رویدادهای درون‌سلولی در گیاهان به‌وسیله الگوهای متفاوت بیان ژن‌ها اتفاق می‌افتد، اما مقاومت القایی در اثر تحریک ریشه میزبان و انجام یک سری تغییرات بسیار کم در میزان رونوشت برخی ژن‌های دخیل در ایجاد مقاومت قبل از حمله بیمارگر به گیاه میزبان با گیاهان شاهد تفاوت زیادی ندارد. درحالی‌که پس از حمله و رخنه بیمارگر به گیاه میزبان، بیان برخی از ژن‌ها و پروتئین‌ها به میزان زیادی افزایش می‌یابد (مولیتر[6] و کوگل[7]، ۲۰۰۹).

حبیبی و همکاران (۱۳۹۱) در پژوهشی ، الگوی بیان پنج ژن مرتبط با دفاع شامل PR1، کیتیناز، پراکسیداز، PR5 و پروتئین‌های بازدارنده آنزیم پروتئاز بررسی و سطح بیان این پنج ژن در هشت زمان (صفر تا شش روز) بعد از آلودگی در رقم مقاوم ونگشوبای و رقم حساس فلات با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی اندازه‌گیری شد. نتایج این پژوهش نشان داد که بیان ژن‌های موردبررسی در اثر آلودگی با بیمارگرهای گندم، فوزاریوم، بادزدگی و زنگ نواری گندم در هر دو رقم حساس و مقاوم تغییر پیدا می‌کند. بررسی روند تغییرات بیان این ژن‌ها در طی دورهٔ شش روزه پس از آلودگی نشان‌دهنده افزایش سریع‌تر بیان آن‌ها در رقم مقاوم ونگشوبای نسبت به رقم فلات بود. در پژوهشی سوراهینوبر[8] و همکاران (۲۰۲۲) به‌منظور تعیین اثر پرایمینگ بذر[9] با سالیسیلیک‌اسید بر حساسیت و مقاومت دو رقم گندم (فلات و سومای۳) به *F. graminearum* در مرحله گیاهچه‌ای انجام شد. هردو رقم سطح مقاومت بالاتری را در برابر *F. graminearum* نشان دادند. همراه با افزایش مقاومت ناشی از پرایمینگ بذر، افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)، کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) و فنیل‌آلانین‌آمونیاک‌لیاز (PAL) مشاهده شد.

۳. روش‌شناسی پژوهش

۳. ۱. آزمون بیوکنترل جهت بررسی کارایی جدایه‌های باکتریایی علیه F. graminearum در آزمایشگاه

جهت ارزیابی قدرت بازداری از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی از روش تاماسیتیرنگ[10] (۲۰۱۶) استفاده شد. به این ترتیب که یک قرص پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ *F. graminearum* به فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از لبهٔ تشتک پتری حاوی محیط نوترینت آگار+ سیب‌زمینی دکستروز آگار (NA+PDA)[11] قرار داده شد. سپس یک لوپ از باکتری به‌صورت خطی و با فاصله ۴/۵ سانتی‌متر از قارچ بیمارگر کشت شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار

1. Wojtaszek
2. Barceló
3. Durner
4. Strain
5. Waller
6. Molitor
7. Kogel
8. Sorahinobar
9. Seed Priming
10. Thammasittirong
11. Nutrient agar+ Potato Dextrose Agar

گرفتند. پس از هفت روز، شعاع رشد پرگنه قارچ در حضور باکتری و تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی از رشد قارچ توسط باکتری با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد.

رابطه ۱) درصد بازدارندگی از رشد قارچ = (شعاع رشد قارچ در شاهد − شعاع رشد قارچ در حضور باکتری / شعاع رشد قارچ در شاهد) ×۱۰۰

۳. ۲. بررسی برخی مکانیسم‌های دفاعی بیوشیمیایی گیاه

به‌منظور بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز همانند جدول (۱) دو رقم حساس (باژ) و مقاوم (Irana) در شرایط بدون تنش و تنش با بیمارگر *F. graminearum* قرار گرفتند. دو رقم مذکور ابتدا با باکتری‌ها تیمارشده و سپس تحت تأثیر اسپورهای قارچ بیمارگر قرار گرفتند. بعد از این‌که گیاهان در گلخانه تحت تنش بیمارگر قرار گرفتند، در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی بیمارگر، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه گندم انجام گرفت و بلافاصله برگ‌ها در محل نمونه‌برداری به ظرف نیتروژن مایع منتقل و سپس در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد آزمایشگاه ذخیره شدند. لازم به ذکر است که در مطالعات مربوط به اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیمی از دو رقم حساس باژ و متحمل ایرانا و باکتری‌های (*Pseudomonas* sp.، *P. brassicacearum*، *Exiguobacterium* sp.، *A. calcoaceticus* و مخلوطی از چهار باکتری) استفاده شد و همه نمونه‌برداری‌ها در سه بازهٔ زمانی انجام گرفت (افریدی[1] و همکاران، ۲۰۱۹) و به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرم‌افزار SAS ver.9.4 تجزیه و تحلیل آماری شد.

جدول ۱. ترکیب تیمارهای مورداستفاده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی

رقم	زمان	B1 +F			B2 +F			B3 +F			B4 +F			BM +F			NF		
I	۲۴	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	۴۸	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	۷۲	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
B	۲۴	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	۴۸	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
	۷۲	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3

B1+F: قارچ بیمارگر+ باکتری *Pseudomonas* sp.؛ B2+F: قارچ بیمارگر+ باکتری *Pseudomonas brassicacearum*؛ B3+F: قارچ بیمارگر+ باکتری *Exiguobacterium* sp.؛ B4+F: قارچ بیمارگر+ باکتری *Acinetobacter calcoaceticus*؛ BM+F: قارچ بیمارگر+ مخلوط چهار باکتری؛ NF: عدم وجود قارچ بیمارگر (شاهد)؛ R1, R2, R3: تکرار ۱، ۲ و ۳؛ I: رقم مقاوم ایرانا؛ B: رقم حساس باژ.

۳. ۲. ۱. ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره (روش برادفورد[2]، ۱۹۷۶)

برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی‌گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها به‌روش برادفورد تعیین شد (برادفورد، ۱۹۷۶). این روش بر مبنای اتصال رنگ کوماسی بریلیانت‌بلو[3] موجود در معرف بردفورد به ملکول پروتئین استوار است.

۳. ۲. ۲. تهیه معرف برادفورد

به‌منظور تهیهٔ این معرف، ۱۰۰ میلی‌گرم پودر کوماسی بریلیانت بلو (G 250) در ۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد،

1. Afridi
2. Bradford
3. Coomassie brilliant blue G-250

سپس این محلول روی شیکر قرار گرفت و قطره قطره ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول فسفریک‌اسید ۸۵ درصد (شرکت مرک) به آن اضافه شد. سپس با آب مقطر حجم محلول به یک لیتر رسانده شد و پس از آن محلول صاف شد. رنگ محلول به‌تدریج تغییر نمود و درنهایت زرد پر رنگ تا قهوه‌ای روشن شد. این معرف باید دور از نور و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شود، با این شرایط می‌توان آن را تا یک ماه نگهداری کرد (برادفورد، ۱۹۷۶).

۳. ۲. ۳. تهیه محلول پایه پروتئین استاندارد

برای تهیهٔ منحنی استاندارد ابتدا محلول پایه‌ی پروتئین تهیه شد. پنج میلی‌گرم از پروتئین استاندارد در پنج میلی‌لیتر بافر فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار و pH، ۷، حل و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پروتئین استاندارد مورداستفاده، آلبومین سرم گاوی BSA[1] فراکسیون پنج بود (سلوت[2] و خاناچوپرا[3]، ۲۰۱۰).

۳. ۲. ۴. تهیهٔ منحنی پروتئین استاندارد

مقادیر ۱۰۰، ۲۵۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۸۵۰، ۱۰۰۰ میکروگرم از محلول BSA در آب مقطر سترون به‌طور جداگانه به ۳ میلی‌لیتر معرف برادفورد در لوله آزمایش (۵ میلی‌لیتری) اضافه شد. پس از مخلوط‌کردن کامل بلافاصله میزان جذب نور در طول موج λ max= 595nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CECIL 9500، ساخت انگلیس) اندازه‌گیری شد. لوله‌های حاوی صفر میکرولیتر پروتئین استاندارد جهت صفرکردن دستگاه استفاده شد. هرکدام از تیمارها در سه تکرار تست شد و میانگین آن‌ها جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده شد (برادفورد، ۱۹۷۶). منحنی استاندارد براساس جذب نور هر کدام از غلظت‌ها محاسبه و ترسیم شد. برای تعیین میزان پروتئین کل عصاره مورد آزمایش، مقدار پنج میکرولیتر از عصاره هر نمونه با ۳ میلی‌لیتر محلول برادفورد کاملاً مخلوط شد و تغییرات جذب نور در طول موج λ max= 515nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد (برادفورد، ۱۹۷۶).

۳. ۲. ۵. استخراج پروتئین از بافت گیاه (روش ریونی[4] و همکاران، ۱۹۹۵)

به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاه گندم نمونه‌برداری‌شده در یک ویال دو میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات‌سدیم ۰/۱ مولار با pH، ۶، اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و توسط سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۲۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی برای انجام آزمایش‌ها جداسازی و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (ریونی، ۱۹۹۵). از این عصاره استخراج‌شده جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد.

۳. ۲. ۶. ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (روش گنگ[5] و همکاران، ۱۹۹۷)

فعالیت آنزیم کاتالاز براساس روش ارائه‌شده توسط گنگ و همکاران (۱۹۹۷) به شرح زیر ارزیابی شد. مقداری از عصاره که دارای ۴۰۰ میکروگرم پروتئین می‌باشد (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، با مقداری از بافر

1. Bovine Serum Albumin
2. Selote
3. Khanna-Chopra
4. Reuveni
5. Gong

فسفات‌سدیم ۵۰ میلی‌مولار با pH، ۷، به حجم دو میلی‌لیتر رسانده و سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و دستگاه توسط آن کالیبره شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از H_2O_2، سه درصد به مخلوط واکنش اضافه و میزان جذب نور به‌مدت ۲ دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم براساس مقدار تجزیه‌شدن H_2O_2 اندازه‌گیری می‌شود. جذب محلول‌ها در ۲۴۰ نانومتر نسبت به آب با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد. فعالیت کاتالاز براساس میلی‌مولار پراکسیدهیدروژن در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین (ΔOD /Min./mg. protein) در سه تکرار اندازه‌گیری شد.

۳. ۲. ۷. ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (روش ریونی و همکاران، ۱۹۹۵)

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ۵۰۰ میلی‌گرم پروتئین باشد (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، به‌همراه پنج میلی‌مولار گوئیکول و مقدار کافی بافر فسفات ۲۵ میلی‌مول pH، ۷، طوری‌که به حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر برسد، در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر گردید. سپس پنج میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) سه درصد به این مخلوط اضافه شد و به‌سرعت تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به‌مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم برحسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین بیان شد (ΔOD /Min./mg. protein) (ریونی، ۱۹۹۵).

۴. یافته‌های پژوهش

بررسی توانایی جدایه‌های باکتریایی در آزمون کشت متقابل حاکی از آن است که هر چهار جدایه باکتریایی قادر به جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بوده و تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان دادند. میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر به‌ترتیب در جدایه *P. brassicacearum* با مقدار ۴۹/۳۳ درصد و کم‌ترین متعلق به جدایه *A. calcoaceticus* با مقدار ۳۲/۳۳ درصد ارزیابی شد (شکل ۱، جدول‌های ۲ و ۳).

جدول ۲. تجزیه واریانس ساده عامل‌های بازدارندگی از رشد عامل بیمارگر قارچی

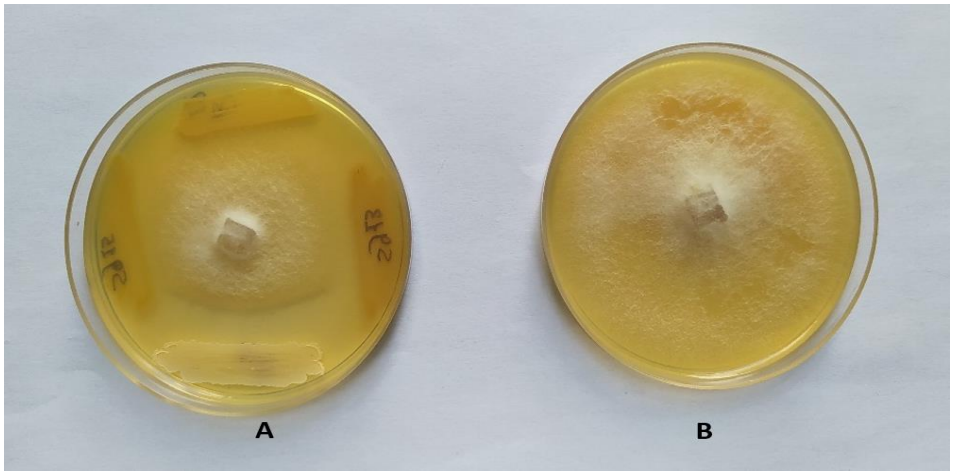
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		رشد کلونی	بازدارندگی از رشد
تیمار	۴	۲/۱۵**	۱۱۱۲/۱۶**
تکرار	۲	۰/۰۰۸^{ns}	۸/۲۶^{ns}
ضریب تغییرات (درصد)	***	۴/۴۵	۱۳/۴۳

ns و **: سطوح غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۳. مقایسه میانگین عامل‌های بازدارندگی از رشد عامل بیمارگر قارچی

منابع تغییرات	رشد کلونی (cm)	بازدارندگی از رشد (درصد)
Pseudomonas sp.	۲/۳۶c	۴۲/۳۳ab
P. brassicacearum	۱/۸۳d	۴۹/۳۳a
A. calcoaceticus	۲/۳۰c	۳۹/۳۳bc
Exiguobacterium sp.	۲/۸۰b	۳۲/۳۳c
Control	۴/۱۰a	۰d

میانگین‌های با حروف مشترک در یک ستون در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

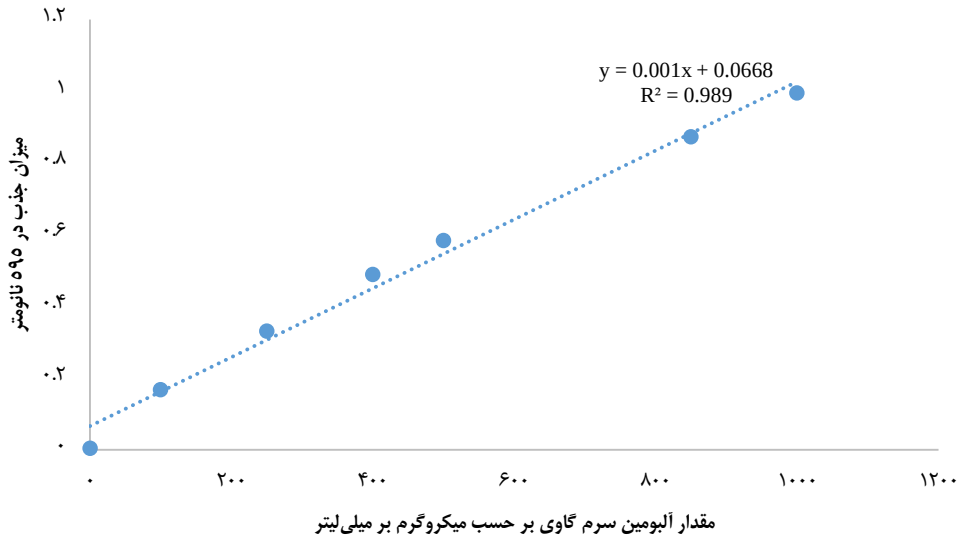


شکل ۱. توانایی جدایه‌های باکتری در جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر. A) اثر متقابل چهار جدایه باکتری بر قارچ بیمارگر، B) شاهد.

۴. ۱. بررسی تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در دو رقم مقاوم و حساس

۴. ۱. ۱. منحنی استاندارد و غلظت پروتئین

میزان جذب نوری پروتئین استاندارد (آلبومین سرم گاوی–BSA) در طول موج ۵۹۵ نانومتر در غلظت‌های مختلف ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم، با سه تکرار در هر غلظت ثبت شد و میانگین سه تکرار به‌عنوان میزان جذب آن غلظت در نظر گرفته شد و منحنی استاندارد با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شد (شکل ۲).



شکل ۲. منحنی استاندارد به‌دست‌آمده برای تعیین غلظت کل عصاره پروتئینی گیاه

برای تعیین غلظت کل هر نمونه، میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر دو بار اندازه‌گیری شد و میانگین آن‌ها به‌عنوان جذب آن نمونه (میزان y) در نظر گرفته شد. با قراردادن میزان y در فرمول به‌دست‌آمده از منحنی استاندارد، مقدار x (غلظت هر نمونه) به‌دست آمد.

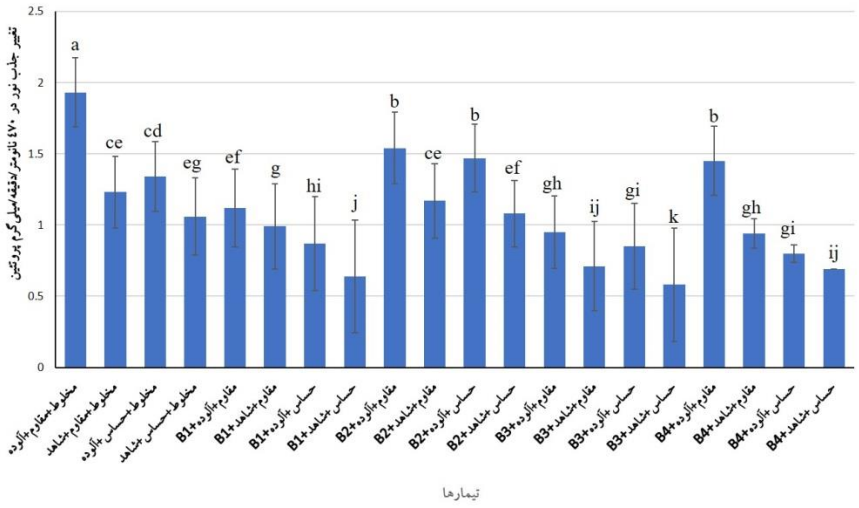
۴. ۲. فعالیت آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز هم در رقم مقاوم آلوده و هم در رقم حساس آلوده در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی با قارچ، نسبت به شاهد افزایش چشم‌گیری داشت. تیمار مخلوط باکتری+رقم مقاوم+ آلوده با میانگین ۱/۹۳ بیش‌ترین و تیمار B3+ حساس+ شاهد با میانگین ۰/۵۸ کم‌ترین میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز را نشان دادند (جدول ۴ و شکل ۳). از نظر آماری بین حضور و عدم حضور بیمارگر در هر دو رقم مقاوم و حساس از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به بیان دیگر، وجود بیمارگر در هر دو رقم باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است. باتوجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۵) مربوط به اثر باکتری‌های (B1، B2، B3، B4 و مخلوط) بر روی فعالیت آنزیم پراکسیداز در حضور و عدم حضور بیمارگر در نقاط زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲) نمونه‌برداری نشان داد که بین تیمارهای (مخلوط آلوده، B1 آلوده، B2 آلوده، B3 آلوده و B4 آلوده) با شاهد در دو رقم مقاوم و حساس و در سه نقطه زمانی نمونه‌برداری مختلف و هم‌چنین اثرات متقابل تیمار× رقم، تیمار× زمان و تیمار× رقم× زمان، تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ($P\leq ۰/۰۱$) وجود دارد.

جدول ٤. تجزیهٔ واریانس مربوط به میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز (تغییرات جذب در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین) در رقم مقاوم و حساس گیاه گندم، مایه‌کوبی شده با قارچ عامل بیماری *Fusarium graminearum*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		کاتالاز	پراکسیداز
تیمار	۴	۶۷۲/۶۰**	۳۸۲/۷۸**
رقم	۱	۲۴۲/۵۰**	۱۹۶۳**
زمان	۲	۱۴/۴**	۷۴/۷۶**
تکرار	۲	۱۰/۴۵^{ns}	۱۵۶۴/۷۸^{ns}
تیمار× رقم	۴	۳۷۸/۰۶**	۹۴۹/۲۳**
تیمار× زمان	۸	۴/۰۳**	۲۰/۶۵**
تیمار× رقم× زمان	۱۰	۳/۶۳**	۳۸/۱**
ضریب تغییرات (درصد)	--	۲۵/۹۸	۱۸/۱۴

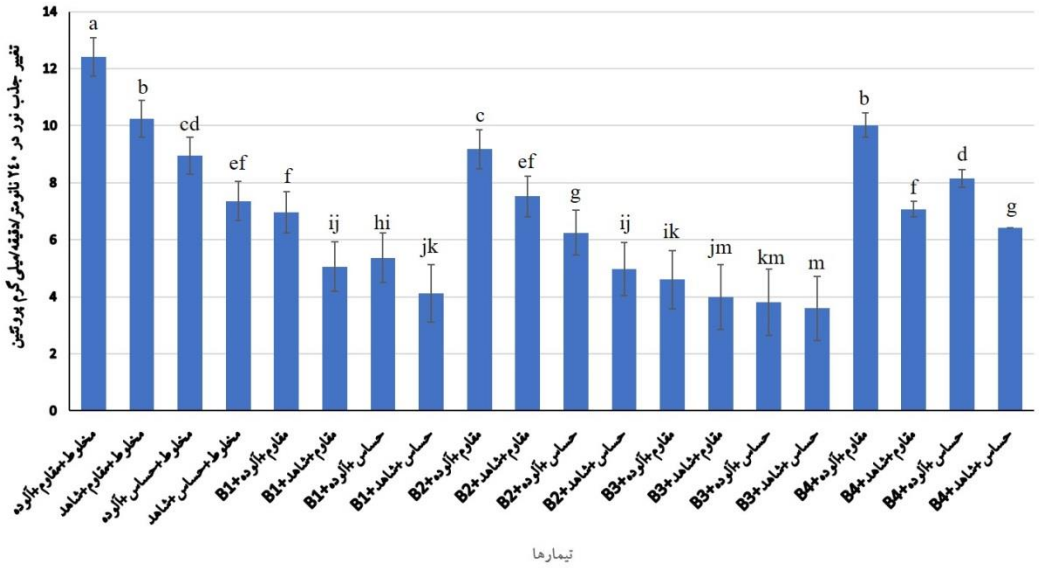
ns و **: سطوح غیرمعنی‌دار و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد.



شکل ۳. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمارهای مختلف

۴. ۳. ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز هم در رقم مقاوم آلوده و هم در رقم حساس آلوده در زمان‌های مختلف بعد از مایه‌زنی با قارچ، نسبت به شاهد افزایش چشم‌گیری داشت. تیمار مخلوط باکتری+ رقم مقاوم+ آلوده با میانگین ۱۲/۴۱ بیش‌ترین و تیمار B3+ حساس+ شاهد با میانگین ۳/۵۹ کم‌ترین میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز را نشان دادند (شکل ۴). از نظر آماری بین حضور و عدم حضور بیمارگر در هر دو رقم مقاوم و حساس از نظر فعالیت آنزیم کاتالاز اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به بیان دیگر، وجود بیمارگر در هر دو رقم باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است. با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۴) مربوط به اثر باکتری‌های (B1، B2، B3، B4 و مخلوط) بر روی فعالیت آنزیم کاتالاز در حضور و عدم حضور بیمارگر در نقاط زمانی مختلف (۲۴، ۴۸ و ۷۲) نمونه‌برداری نشان داد که بین تیمارهای (مخلوط آلوده، B1 آلوده، B2 آلوده، B3 آلوده و B4 آلوده) با شاهد در دو رقم مقاوم و حساس و در سه نقطه زمانی نمونه‌برداری مختلف و هم‌چنین اثرات متقابل تیمار× رقم، تیمار× زمان و تیمار× رقم× زمان، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ درصد ($P\leq ۰/۰۱$) وجود دارد.



شکل ٤. مقایسه میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای مختلف

۵. بحث

امروزه با توجه به کاربرد بیش از اندازه کودهای شیمیایی و آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه نهاده‌ها در مدیریت مزارع، هدف اصلی پژوهش‌های صورت‌گرفته مبتنی بر یافتن روش‌های جایگزین مناسب کارآمد و سازگار با محیط‌زیست می‌باشد. کاربرد روش‌های کنترل زیستی نسبت به سایر روش‌ها در درازمدت، مقرون‌به‌صرفه و ارزان‌تر است. عوامل بیوکنترل در برابر بیماری‌های گیاهی بسیار مؤثر بوده و روی گیاه میزبان ایجاد مسمومیت نمی‌کنند. این عوامل برای محیط زیست مفید بوده و باعث آلودگی زیست‌محیطی نمی‌شوند. هم‌چنین به آسانی در خاک تکثیر و سبب حذف عامل بیمارگر در محل آلودگی می‌شوند (حسنوند[1] و همکاران، ۲۰۲۲). از این‌رو، کاربرد ریزوباکتری‌های

1. Hasanvand

افزایش‌دهندهٔ رشد گیاه در افزایش رشد کمی و کیفی محصول و مبارزه با عوامل بیمارگر از طریق در دسترس قراردادن عناصر غذایی مانند فسفر، آهن، نیتروژن و گوگرد، تولید هورمون‌های گیاهی، رقابت بر سر غذا و مکان، کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، ترشح ترکیبات ضدقارچی و القای مقاومت سیستمیک به‌عنوان روش جایگزین و مؤثر، مطرح می‌باشد (اشرفی[1] و همکاران، ۲۰۲۱). حضور باکتری‌های بیوکنترل خاصی روی ریشه باعث پاسخ مقاومت در گندم می‌شوند. لذا مقاومت القایی یکی از سازوکارهای عمل ریزوباکترهای افزایش‌دهنده رشد گیاه به‌ویژه سودوموناس در کاهش بیماری است که در نتیجهٔ این تحریک‌ها، پیام‌های مقاومت تولید شده و در ساختار گیاه پخش می‌شود (وانیسا[2] و همکاران، ۲۰۲۰). باکتری *Pseudomonas fluorescens* به‌خوبی به‌عنوان یک باکتری افزایش‌دهنده رشد گیاه شناخته شده است و این سویه به‌عنوان یک باکتری مدل برای بررسی‌های مهار زیستی نیز به‌کار می‌رود (اشرفی[3] و همکاران، ۲۰۲۰). در پژوهشی دو سویه باکتریایی *Bacillus amyloliquefaciens* و *Azospirillum oryzae* در تحریک رشد گندم و بازدارندگی قارچ *Fusarium graminearum* در دو حالت کشت منفرد و هم‌کشتی پرداخته شد. نتایج نشان داد که باکتری‌ها در کشت منفرد و هم‌کشتی به‌خوبی از رشد قارچ بیماری‌زا به‌صورت مستقیم و با ترکیبات فرار جلوگیری می‌کنند (باقری[4] و همکاران، ۲۰۱۹).

کاتالاز یک آنزیم آنتی‌اکسیدانت است که تقریباً در تمام موجودات زنده از قبیل مخمرها، قارچ‌ها، گیاهان و حیوانات وجود دارد. آنزیم کاتالاز مؤثرترین آنزیم آنتی‌اکسیدانت در گیاه است (گومز[5] و همکاران، ۲۰۲۲). آنزیم کاتالاز H_2O_2 را به H_2O و O_2 تجزیه می‌کند و پراکسیداز با اکسیداسیون، ترکیبات فنلی H_2O_2 را تجزیه می‌کند. این آنزیم‌ها به‌همراه آنزیم سوپراکسیددیسموتاز سیستم‌های اصلی آنزیمی سلول در برابر صدمات اکسیداتیو هستند (وانگ[6] و همکاران، ۲۰۰۶) و (توماسی[7] و همکاران، ۲۰۰۸). کاتالاز در گیاهان، H_2O_2 تولیدشده در طی فرایند انتقال الکترون میتوکندریایی، بتا اکسیداسیون اسیدهای چرب و از همه مهم‌تر تنفس نوری را تخریب می‌کند. کاتالاز در پاسخ‌های دفاعی گیاه نقش مهمی را بازی می‌کند. در حیوانات فقط یک ایزوفرم کاتالاز وجود دارد که به‌وسیله یک ژن کد می‌شود، اما در گیاهان چند ایزوفرم کاتالاز وجود دارد که به‌وسیله یک خانواده کوچک از ژن‌ها کد می‌شوند. در شروع فرایند پیری در گیاه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مثل کاتالاز کاهش می‌یابد و سوپراکسید یا پراکسید هیدروژن تا سطح سمیت افزایش می‌یابند (بولر و همکاران، ۱۹۹۲).

پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی هستند که غلظت H_2O_2 را تنظیم می‌کنند (بارسلو[8]، ۱۹۹۷). H_2O_2 می‌تواند از ورود بیمارگر به داخل بافت گیاهی جلوگیری کند و به سلول‌های گیاه فرصت داده می‌شود که واکنش‌های دفاعی خود را که برای فعال‌شدن به زمان بیش‌تری نیاز دارد، تنظیم کند (دارنر[9] و همکاران، ۱۹۹۷). با این‌حال، گونه‌های اکسیژن فعال (AOS) وقتی در طی فرایند بیماری‌زایی در غلظت‌های بالا تولید شوند، موجب انجام واکنش‌های تجزیه، پراکسیداسیون لیپیدها، تخریب غشای سلولی، تجزیه پروتئین و تخریب کلروفیل می‌شوند (بولر و همکاران، ۱۹۹۲). بنابراین میزان موردنیاز فعالیت آنتی‌اکسیدانتی برای نگه‌داشتن غلظت اکسیژن فعال در سطوح نسبتاً پایین

1. Ashrafi
2. Vanissa
3. Ashrafi
4. Bagheri
5. Gomes
6. Wang
7. Tommasi
8. Barceló
9. Durner

ضروری می‌باشد (لاریگودیر[1] و همکاران، ۲۰۰۴). گونه‌های اکسیژن دوبار–فعال (ROS) شامل همه مشتقات اکسیژن مولکولی هستند که از اکسیژن فعال‌ترند. این ROSها قابلیت تأثیرگذاری بر روی تعدادی از فرایندهای سلولی که در واکنش میزبان– بیمارگر درگیر هستند را دارند (وجتازک[2]، ۱۹۹۷). در صورتی‌که انفجار اکسیداسیونی در سلول‌های گیاه مهار نشود، منجر به خسارت شدید به گیاه در واکنش ناسازگار می‌گردد و این انفجار به‌وسیلهٔ یک سیستم آنتی‌اکسیدانتی در گیاه راهبری می‌شود. زمانی‌که یک بیمارگر تعامل ناسازگاز با گیاه ایجاد می‌کند، ابتدا میزان H_2O_2 در گیاه بالا می‌رود، اما در ادامه با فعال‌شدن این آنزیم‌ها، میزان پراکسیداز و کاتالاز در گیاه بالا رفته و سطح H_2O_2 را در گیاه پایین می‌آورد (جان محمدی[3] و همکاران، ۲۰۱۲). نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نیز مؤید همین مطالب است.

براساس شکل‌های (۳) و (۴) میزان فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز در تیمارهای با باکتری و قارچ افزایش یافته است. تیمار مخلوط باکتری+ رقم مقاوم+ آلوده بیش‌ترین و تیمار B3+ حساس+ شاهد کم‌ترین میانگین فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاتالاز را نشان دادند. از نظر آماری بین حضور و عدم حضور بیمارگر در هر دو رقم مقاوم و حساس از نظر فعالیت آنزیم پراکسیداز اختلاف معنی‌دار وجود داشت. به بیان دیگر، وجود بیمارگر در هر دو رقم باعث افزایش فعالیت این آنزیم شده است. با توجه به این نکته و بالارفتن این آنزیم‌ها در گیاه بعد از تنش، بر این نکته تأکید می‌شود که اولاً میزان اکسیژن‌های فعال در گیاه باید افزایش یابد تا میزان پراکسیداز و کاتالاز هم بالا رود و ثانیاً میزان القا بسیار زیاد این آنزیم‌ها نشان‌دهندهٔ نقش مؤثر آن‌ها در مکانیسم‌های دفاعی علیه بیمارگرهاست. فعالیت‌های دو آنزیم پراکسیداز و کاتالاز در ارقام مختلف گندم (مقاوم و حساس) در پاسخ به بیمارگر قارچی *F. graminearum* به‌صورت متفاوت بروز پیدا می‌کند. بعد از آلوده‌سازی ارقام گندم (مقاوم و حساس) به‌وسیله یک جدایه از قارچ بیمارگر، فعالیت آنزیم‌های دفاعی زمانی‌که با گیاهان شاهد (بدون مایه‌زنی قارچ) مقایسه می‌شود تغییرات محسوسی داشته است. میزان فعالیت این دو آنزیم آنتی‌اکسیدانت در رقم مقاوم به این بیمارگر (ایرانا) در واکنش ناسازگار به میزان قابل‌توجهی افزایش پیدا می‌کند، ولی در رقم حساس (باژ) میزان این افزایش بسیار پایین‌تر است یا ممکن است اصلاً افزایشی نداشته باشند. نتایج دیگر مطالعات هم نشان‌دهندهٔ نقش کلیدی این آنزیم در تنش‌های زنده و غیرزنده است (آناهید[4] و همکاران، ۲۰۱۳).

۶. نتیجه‌گیری و پیشنهادها

امروزه با توجه به کاربرد بیش از اندازه سموم و کودهای شیمیایی و آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه نهاده‌ها در مدیریت مزارع، هدف اصلی پژوهش‌های صورت‌گرفته مبتنی بر یافتن روش‌های جایگزین مناسب کارآمد و سازگار با محیط‌زیست می‌باشد. کاربرد روش‌های کنترل زیستی نسبت به سایر روش‌ها در درازمدت، مقرون‌به‌صرفه و ارزان‌تر است. عوامل بیوکنترل در برابر بیماری‌های گیاهی بسیار مؤثر بوده و روی گیاه میزبان ایجاد مسمومیت نمی‌کنند. این عوامل برای محیط زیست مفید بوده و باعث آلودگی زیست‌محیطی نمی‌شوند. هم‌چنین به‌آسانی در خاک تکثیر و سبب حذف عامل بیمارگر در محل آلودگی می‌شوند. از این‌رو، کاربرد ریزوباکتری‌های افزایش‌دهندهٔ رشد گیاه در افزایش رشد کمی و کیفی محصول و مبارزه با عوامل بیمارگر به‌عنوان روش جایگزین و مؤثر مطرح می‌باشد. با توجه به کارایی بالای سویه‌های باکتریایی *Pseudomonas* sp.، *P. brassicacearum*، *Exiguobacterium* sp.، *A. calcoaceticus* مورداستفادهٔ این پژوهش در افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی و هم‌چنین توانایی فعالیت ضدقارچی، آن‌ها

1. Larrigaudière
2. Wojtaszek
3. Janmohammadi
4. Anahid

می‌توانند به‌عنوان یک گزینه مناسب در تولید گیاهان سالم و مقاوم مورداستفاده قرار گیرند. با این وجود، انجام پژوهش بیش‌تر در زمینه تأثیر باکتری‌های مذکور بر سایر گیاهان زراعی و نیز شرایط مزرعه قبل از استفاده عملی از آن‌ها لازم و ضروری است. بررسی تأثیر باکتری‌های مذکور بر عملکرد محصولات گلخانه‌ای، به‌ویژه در شرایط بدون خاک یا هیدروپونیک به‌منظور کاهش مصرف سموم و مواد شیمیایی نیز توصیه می‌شود.

امروزه بررسی پدیدهٔ مقاومت و فعال‌شدن مکانیسم‌های دفاعی گیاه به‌کمک روش‌های بیوشیمیایی، سلولی و مولکولی و بررسی جنبه‌های مختلف ماهیت مقاومت، موردتوجه پژوهش‌گران قرار گرفته است. بررسی دقیق مسیرهای انتقال سیگنال دخیل در بروز مقاومت می‌تواند در روشن‌شدن هرچه بیش‌تر مکانیسم‌های القای مقاومت و در نتیجه بهینه‌سازی استفاده از این مکانیسم‌ها در کنترل بیماری‌های گیاهی دارای اهمیت باشد.

۷. تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان برای حمایت‌های لازم از این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

۸. تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

۹. منابع

احمدی، کریم؛ عبادزاده، حمیدرضا؛ حاتمی، فرشاد؛ محمدنیا، شهریار؛ اسفندیاری‌پور، الهام و عباس‌طاقانی، رضا (۱۴۰۰). *آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۱۳۹۹-۱۳۹۸*. تهران: انتشارات وزارت جهاد کشاورزی.

آقاجانی، محمدعلی؛ فروتن، عبدالرضا و کاظمی، همایون (۱۳۹۵). *دستورالعمل اجرایی مدیریت بیماری بادزردگی فوزاریومی سنبله گندم*. تهران: مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور.

حبیبی، معصومه؛ میرآخورلی، ندا و مردی، محسن (۱۳۹۲). بررسی الگوی بیان ژن کدکننده آنزیم S-Like RNase در مقابله با برخی بیماری‌های قارچی در گندم نان. *فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی*، ۵ (۳)، ۸۵-۹۳.

سبزعلی، فهیمه؛ کاظمی، همایون و عسکری، امید (۱۴۰۰). *دستورالعمل اجرایی مدیریت بیماری فوزاریومی سنبله گندم*. تهران: سازمان حفظ نباتات کشور، دفتر پیش‌آگاهی و کنترل عوامل خسارت‌زا.

مرشدی، ابراهیم؛ قرینه، محمدحسین؛ کوچک زاده، احمد و بخشنده، عبدالمهدی (۱۴۰۲). تأثیر باکتری‌های باسیلوس و سودوموناس بر عملکرد کمی و کیفی و راندمان مالت‌سازی ارقام مختلف جو در شرایط دیم. *به زراعی کشاورزی*، ۲۵ (۲)، ۳۱۳-۳۳۰. doi: 10.22059/jci.2022.333633.2638

References

Afridi, M. S., Mahmood, T., Salam, A., Mukhtar, T., Mehmood, S., Ali, J., Khatoon, Z., Bibi, M., Javed, M. T., & Sultan, T. (2019). Induction of tolerance to salinity in wheat genotypes by plant growth promoting endophytes: Involvement of ACC deaminase and antioxidant enzymes. *Plant Physiology and Biochemistry, 139*, 569-577.

Aghajani, M. A., Forotan, A. R., & Kazemi, H. (2016). *Executive guidelines for the management of Fusarium head blight disease of wheat.* Tehran: The country's herbal medicine research institute. (In Persian).

Ahmadi, K., Qolizadeh, H., Ebadzadeh, H., Hosseinpour, R., Abdshah, H., Kazemian, A., & Rafiee, M. (2021). *Agricultural products statistics*. Tehran: Publications of the Ministry of Agricultural Jihad. (In Persian).

Alisaac, E., & Mahlein, A. K. (2023). Fusarium head blight on wheat: Biology, modern detection and diagnosis and integrated disease management. *Toxins*, *15*(3), 192.

Anahid, F., Zaeifizadeh, M., Shahbazi, H., & Ghasemi, M. (2013). Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat cultivars seedling against stripe rust. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, *4*(10), 2606-2611.

Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, *50*(1), 601-639.

Ashrafi, J., Rahnama, K., Babaeizad, V., Ramezanpour, S. S., & Keel, C. (2020). The effect of Pseudomonas protegens CHA0 and an endophyte fungus Serendipita indica on resistance induction with defense genes expression of wheat against Septoria leaf blotch disease. *Iranian Journal of Plant Pathology*, *56*(3), 275-301.

Ashrafi, J., Rahnama, K., Babaeizad, V., Ramezanpour, S. S., & Keel, C. (2021). Induction of Wheat Resistance to STB by the Endophytic Fungus Serendipita indica and Pseudomonas protegens. *Iranian Journal of Biotechnology*, *19*(2), e2762.

Azpilicueta, C. E., Benavides, M. P., Tomaro, M. L., & Gallego, S. M. (2007). Mechanism of CATA3 induction by cadmium in sunflower leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(8), 589-595.

Bagheri, N., Ahmadzadeh, M., & Salehi Jouzani, G. (2019). Interaction of Bacillus amyloliquefaciens and *Azospirillum oryzae* on wheat growth promotion and *Fusarium graminearum* disease inhibition. *Crop Biotechnology*, *9*(25), 19-33.

Barceló, A. R. (1997). Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology*, *176*, 87-132.

Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany*, *91*(2), 179-194.

Bolanos-Carriel, C., Wegulo, S. N., Hallen-Adams, H. E., Funnell-Harris, D. L., & Baenziger, P. S. (2016). *Effects of fungicide application timing and cultivar resistance on Fusarium head blight and deoxynivalenol in winter wheat*. United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service, University of Nebraska, Lincoln: Faculty Publications.

Bowler, C., Montagu, M. van, & Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *43*(1), 83-116.

Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2014). Metabolic potential of endophytic bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, *27*, 30-37.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248-254.

Dehghanpour Farashah, S., & Salehzadeh, M. (2021). Situation of Fusarium root and crown rot disease of wheat in Iran. *University of Yasouj Plant Pathology Science*, *10*(1), 97-106.

Durner, J., Shah, J., & Klessig, D. F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends in Plant Science*, *2*(7), 266-274.

Food and Agriculture Organization. (2021). *STATISTICS STATISTICAL YEARBOOK*.

Glick B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, *2012*, 963401. https://doi.org/10.6064/2012/963401.

Gomes, M. P., Kitamura, R. S. A., Marques, R. Z., Barbato, M. L., & Zámocký, M. (2022). The role of H2O2-scavenging enzymes (ascorbate peroxidase and catalase) in the tolerance of Lemna minor to antibiotics: implications for phytoremediation. *Antioxidants*, *11*(1), 151.

Gong, M., Li, Y. J., Dai, X., Tian, M., & Li, Z. G. (1997). Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of heat-shock induced thermotolerance in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology*, *150*(5), 615-621.

Grosu, A. I., Sicuia, O.-A., Dobre, A., Voaideş, C., & Cornea, C. P. (2015). Evaluation of some *Bacillus* spp. strains for the biocontrol of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* in wheat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, *6*, 559-566.

Habibi, M., Mirakhorlo, N., & Mardi, M. (2014). Study of Expression Pattern of S-Like RNase Gene to Several Fungal Diseases in Bread Wheat. *Scientific Quarterly Journal of Crop Plant Biotechnology*, *5*(3), 85-93. (In Persian).

Hasanvand, E., Darvishnia, M., Mirzaei Najafgholi, H., & Pakbaz, S. (2022). Isolation and identification of plant growth-promoting bacteria from the rhizosphere of wheat and evaluation of their growth-promoting and biocontrol properties. *Genetic Engineering and Biosafety Journal*, *11*(2), 230-242.

Hasanvand, E., Darvishnia, M., Mirzaei Najafgholi, H., & Pakbaz, S. (2023). Evaluation of the response of 25 commonly cultivated wheat genotypes to Fusarium head blight disease under greenhouse conditions. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *12*(2), 213-224.

Igrejas, G., & Branlard, G. (2020). The importance of wheat. *Wheat Quality for Improving Processing and Human Health*. Switzerland: Springer Cham.

Janmohammadi, M., Abbasi, A., & Sabaghnia, N. (2012). Influence of NaCl treatments on growth and biochemical parameters of castor bean (*Ricinus communis* L.). *Acta Agriculturae Slovenica*, *99*(1), 31-40.

Johns, L. E., Bebber, D. P., Gurr, S. J., & Brown, N. A. (2022). Emerging health threat and cost of *Fusarium* mycotoxins in European wheat. *Nature Food*, *3*(12), 1014-1019.

Larrigaudière, C., Vilaplana, R., Soria, Y., & Recasens, I. (2004). Oxidative behaviour of *Blanquilla pears* treated with 1-methylcyclopropene during cold storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *84*(14), 1871-1877.

Levy, A. A., & Feldman, M. (2022). Evolution and origin of bread wheat. *The Plant Cell*, *34*(7), 2549-2567.

Malihipour, A., Dehgan, M. A., Shahbazi, K., & Barati, A. (2018). Reaction of Iranian wheat landraces to Fusarium head blight (FHB) under field and greenhouse conditions. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *6*(4), 53-66.

Milone, M. T., Sgherri, C., Clijsters, H., & Navari-Izzo, F. (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, *50*(3), 265-276.

Molitor, A., & Kogel, K.-H. (2009). Induced resistance triggered by *Piriformospora indica*. *Plant Signaling & Behavior*, *4*(3), 215-216.

Morshedi, E., Qareineh, M. H., Kouchakizadeh, A., & Bakhshandeh, A. (2022). Effect of *Bacillus* and *Pseudomonas* Bacteria on Quantitative and Qualitative Yield and Malting Efficiency of Different Barley Cultivars in Rainfed Conditions. *Journal of Crops Improvement*, *25*(2), 313-330. (In Persian).

Nayak, T., & Patangray, A. J. (2015). Asian Journal of Multidisciplinary Studies. *Asian Journal of Multidisciplinary Studies*, *3*(2), 190.

Powell, A. J., & Vujanovic, V. (2021). Evolution of fusarium head blight management in wheat: scientific perspectives on biological control agents and crop genotypes protocooperation. *Applied Sciences*, *11*(19), 8960.

Reuveni, R. (1995). Biochemical marker of disease resistance. In *Molecular Methods in Plant Pathology*. United States: CRC Press.

Sabzali, F., Kazemi, H., & Askari, H. (2021). *Executive guidelines for the management of Fusarium head of wheat*. Tehran: The country's plant protection organization, Office of early awareness and control of damaging factors. (In Persian).

Selote, D. S., & Khanna-Chopra, R. (2010). Antioxidant response of wheat roots to drought acclimation. *Protoplasma*, *245*, 153-163.

Sorahinobar, M., Safaie, N., & Moradi, B. (2022). Salicylic Acid Seed Priming Enhanced Resistance in Wheat Against Fusarium graminearum Seedling Blight. *Journal of Plant Biology*, *15*, 1-12.

Thammasittirong, S. N.-R. (2016). In vitro inhibitory effect of *Bacillus subtilis* BAS114 against *Curvularia lunata*. *Advances in Environmental Biology*, *10*(1), 176-183.

Tommasi, S., Pilato, B., Pinto, R., Monaco, A., Bruno, M., Campana, M., Digennaro, M., Schittulli, F., Lacalamita, R., & Paradiso, A. (2008). Molecular and in silico analysis of BRCA1 and BRCA2 variants. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *644*(1-2), 64-70.

Vanissa, T. T. G., Berger, B., Patz, S., Becker, M., Turečková, V., Novák, O., Tarkowská, D., Henri, F., & Ruppel, S. (2020). The response of maize to inoculation with Arthrobacter sp. and Bacillus sp. in phosphorus-deficient, salinity-affected soil. *Microorganisms*, *8*(7), 1005.

Waller, F., Achatz, B., & Kogel, K.-H. (2007). Analysis of the plant protective potential of the root endophytic fungus *Piriformospora indica* in cereals. *Advanced Techniques in Soil Microbiology*, *25*, 343-354.

Wang, J. W., Zheng, L. P., Wu, J. Y., & Tan, R. X. (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in Taxus yunnanensis cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, *15*(4), 351-358.

Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, *322*(3), 681-692.

Zortea, R. B., Maciel, V. G., & Passuello, A. (2018). Sustainability assessment of soybean production in Southern Brazil: A life cycle approach. *Sustainable Production and Consumption*, *13*, 102-112.