The University of Tehran Press

Biological Control of Pests and Plant Diseases

Online ISNN: 2322-2883

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

Optimization of gamma polyglutamic acid (γ-PGA) production by *Bacillus velezensis* and its effect on increasing wheat growth and biocontrol of *Bipolaris sorokiniana* causal agent of common root rot of wheat

Mohsen Sasani[1], Masoud Ahmadzadeh[2]✉, Hossein Besharati[3], Amir Mirzadi Gohari[4]

1. Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mohsen7sasani@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: ahmadz@ut.ac.ir
3. Department of Biology, Soil and Water Institute, Karaj, Iran. E-mail: besharati1350@yahoo.com
4. Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mirzadighohari@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 28 August 2023

Revised: 19 October 2023

Accepted: 28 October 2023

Published online: 22 December 2022

Keywords:

Growth promotion,

Disease control,

Gamma polyglutamic acid.

ABSTRACT

Modern agriculture in the 21st century must provide food security for this growing population, which means producing more food and fiber with less labor. Therefore, agriculture in this century requires smart investment based on more efficient and environmentally friendly production methods. Common wheat root rot caused by *B. sorokiniana* is one of the most important pathogens of wheat, which causes economic losses every year. In this research, from 180 *Bacillus* isolates from the samples collected from the wheat fields of Hamadan province, wastes of edible mushrooms, palm wastes and wood wastes, 9 isolates were able to produce γ-PGA with different production rates. 2 isolates were able to produce γ-PGA independently of glutamic acid. *Bacillus velezensis* UTB97 with a production rate of 40 g/L γ-PGA was selected as the superior producer isolate. UTB97 could prevent 65% growth of pathogenic fungi in laboratory conditions by dual culture method. Greenhouse result showed that the treatment of UTB97 and UTB97 + γ-PGA was able to control Common wheat root rot disease by 59 and 73%, respectively, compared to the control treatment, and also the treatment of UTB97 + γ-PGA was able to increase the growth index of wheat. (stem length and root dry weight), in the presence and absence of the pathogenic fungus.

Cite this article: Sasani, M., Ahmadzadeh, M., Besharati, H., & Mirzadi Gohari, A. (2022). Optimization of gamma polyglutamic acid (γ-PGA) production by Bacillus and its effect on increasing wheat growth index and biocontrol of Bipolaris sorokiniana causal agent of common root rot of wheat. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 11 (2), 69-82. DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2023.364379.322

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2023.364379.322

Extended Abstract

Introduction

Agriculture in the 21st century must provide food security for this growing population, which means producing more food and fiber with less labor. Therefore, agriculture in this century requires smart investment based on more efficient and environmentally friendly production methods. In modern agriculture, by using biological fertilizers and adopting appropriate strategies, it is possible to prevent nitrogen losses in the soil and reduce the efficiency of chemical fertilizers. In recent years, the development of the use of biological control agents as an alternative to chemical fungicides for the biological control of pathogens has been considered. Among them, *Bacillus* has an advantage over other antagonistic microorganisms due to its broad antibacterial properties, significant growth promoting effect by producing a wide range of secondary metabolites, Poly gamma glutamic acid (γ-PGA) is an anionic, biodegradable, non-toxic and hydrophilic polypeptide produced by various *Bacillus* species. Glutamic acid D and L are the basic units of this polymer which are created by

amide bonds, numerous studies have proven that γ-PGA significantly increases plant performance and absorption of nutrients N, P, K by strengthening the absorption capacity of roots and regulating the availability of food through changing the microbial and enzymatic characteristics can also increase the ability of the biocontrol agent to control plant pathogens.

Materials and methods:

Isolation of γ-PGA producing bacteria was done from samples collected from wheat fields of Hamadan province, edible mushroom waste, palm waste and wood waste; The media culture was used for the production of γ-PGA includes: 20 grams of glucose, 20 grams of glutamic acid, 0.5 grams of KH_2PO_4, 0.1 grams of $MgSo_4$, 0.15 grams of $CaCl_2$, 2 grams of yeast extract, 0.5 grams of $ZnSo_4$ and 0.1 grams of $MnSo_4$ per litter. The γ-PGA production rate was evaluated by using cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). Identification of bacteria using a DNA extraction kit and amplify the 16S rDNA region (Blank et al., 2018). In order to investigate the effect of bacteria and γ-PGA on the control of crown and root rot disease of wheat, cross-culture method was used in laboratory conditions and Peng et al.'s (2020) method was used in greenhouse conditions.

Results

In this research, from 180 *Bacillus* isolates from the samples collected from the wheat fields of Hamadan province, wastes of edible mushrooms, palm wastes and wood wastes, 9 isolates were able to produce γ-PGA with different production rates. 2 isolates were able to produce γ-PGA independently of glutamic acid. *Bacillus velezensis* UTB97 with a production rate of 40 g/L γ-PGA was selected as the superior producer isolate. UTB97 could prevent 65% growth of pathogenic fungi in laboratory conditions by dual culture method. Greenhouse result showed that the treatment of UTB97 and UTB97 + γ-PGA was able to control Common wheat root rot disease by 59 and 73%, respectively, compared to the control treatment, and also the treatment of UTB97 + γ-PGA was able to increase the growth index of wheat. (stem length and root dry weight), in the presence and absence of the pathogenic fungus.

Conclusion

The results of this research showed that *B.Velezensis* UTB97 is a powerful strain for gamma polyglutamic acid production. This strain can produce γ-PGA at the rate of 40 g/liter in optimal media culture. also use of UTB97 and γ-PGA caused the control of common crown and root rot disease of wheat and increased the growth index of wheat. Therefore, in order to increase the yield and production of wheat, simultaneous application of bacteria and γ-PGA can be promising.

نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، دوره ۱۱، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۲۴۲۳-۸۰۹۰

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

بهینه‌سازی تولید گاما پلی‌گلوتامیک اسید (γ-PGA)، در باکتری *Bacillus velezensis* و تاثیر آن بر افزایش شاخص‌های رشدی گندم و کنترل *Bipolaris sorokiniana* عامل بیماری پوسیدگی معمولی ریشه گندم

محسن ساسانی[۱] | مسعود احمدزاده[۲]✉ | حسین بشارتی[۳] | امیر میرزادی گوهری[۴]

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mohsen7sasani@ut.ac.ir

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ahmadz@ut.ac.ir

۳. بخش بیولوژی موسسه خاک و آب کشور، کرج، ایران. رایانامه: besharati1350@yahoo.com

۴. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mirzadighohari@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/ ۰۷/ ۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۰۶

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۱۰/۰۱

کلیدواژه‌ها:

افزایش رشد، کنترل بیماری، گاما پلی گلوتامیک اسید.

چکیده

کشاورزی مدرن در قرن بیست و یکم باید امنیت غذایی این جمعیت رو به رشد را تامین کند، که به معنای تولید غذا و فیبر بیشتر با نیروی کار کمتر است؛ بنابراین کشاورزی در قرن حاضر نیازمند سرمایه‌گذاری هوشمندانه مبتنی بر روش‌های تولید کارآمدتر و سازگارتر با محیط زیست است. بیماری پوسیدگی معمول ریشه گندم با عامل *B. sorokiniana* ، از مهمترین بیماری‌های گندم است که هر ساله موجب ایجاد خسارت‌های اقتصادی می‌شود. در این پژوهش از مجموع ۱۸۰ جدایه باکتریایی باسیلوس جداشده از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع گندم استان همدان، ضایعات قارچ‌های خوراکی و ضایعات نخل، تعداد ۹ جدایه توانستند ترکیب گاما پلی گلوتامیک اسید را با مقادیر مختلف تولید کنند، که از این بین، دو جدایه توانستند γ-PGA را به صورت مستقل از گلوتامیک اسید تولید کنند. جدایه *Bacillus velezensis* UTB97 با نرخ تولید ۴۰ گرم بر لیتر γ-PGA به عنوان جدایه برتر تولیدکننده انتخاب شد. جدایه UTB97 توانست در شرایط آزمایشگاهی به میزان ۶۵ درصد از رشد قارچ بیمارگر به روش کشت متقابل جلوگیری کند. بررسی‌های گلخانه‌ای که به‌صورت تیمار بذور گندم انجام شد، نشان داد که تیمار باکتری UTB97 و UTB97 + γ-PGA توانست بیماری پوسیدگی معمولی ریشه گندم را به ترتیب به میزان ۵۹ و ۷۳ درصد در مقایسه با تیمار شاهد کنترل کند، همچنین تیمار UTB97 + γ-PGA توانست موجب افزایش شاخص‌های رشدی گندم (طول ساقه و وزن خشک ریشه)، در حضور و عدم حضور قارچ بیمارگر شود.

استناد: ساسانی، محسن؛ احمدزاده، مسعود؛ بشارتی، حسین؛ و میرزادی گوهری، امیر (۱۴۰۱). بهینه‌سازی تولید گاما پلی‌گلوتامیک‌اسید (γ-PGA)در باکتری باسیلوس و تاثیر آن بر افزایش شاخص‌های رشدی گندم و کنترل *Bipolaris sorokiniana* عامل بیماری پوسیدگی معمولی ریشه گندم. *نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی* ، ۱۱ (۲)، ۸۲-۶۹. DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2023.364379.322

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/jbioc.2023.364379.322

مقدمه

جمعیت کنونی جهان حدود ۸ میلیارد نفر است و انتظار می رود تا سال ۲۰۵۰ به بیش از ۱۰ میلیارد نفر افزایش یابد (FAO., 2019). کشاورزی مدرن در قرن بیست و یکم باید امنیت غذایی این جمعیت رو به رشد را تامین کند، که به معنای تولید غذا و فیبر بیشتر با نیروی کار کمتر است؛ بنابراین کشاورزی در قرن حاضر نیازمند سرمایه‌گذاری هوشمندانه مبتنی بر روش‌های تولید کارآمدتر و سازگارتر با محیط زیست است. امنیت غذایی به معنای دسترسی همه انسان‌ها و حیوانات به مواد غذایی سالم و مغذی در تمام مراحل زندگی است. این غذا باید نیازها و ترجیحات غذایی آن‌ها را برآورده کند تا از یک زندگی فعال و سالم لذت ببرند (Clapp *et al*., 2022; Mc Carthy *et al*., 2018). در دهه‌های گذشته کودهای شیمیایی باعث افزایش بهره‌وری در بخش کشاورزی شده است. با این حال، استفاده طولانی‌مدت از مواد شیمیایی به دلیل رسوب بقایای شیمیایی در خاک، اثرات زیانباری بر کیفیت محصول، حاصلخیزی خاک و جوامع میکروبی طبیعی خاک داشته است (Buddhika *et al*., 2013, Mondal *et al*., 2015). اما از سوی دیگر؛ استفاده از کودهای زیستی می‌توانند تاثیر مثبتی بر حاصلخیزی خاک داشته باشند و تاثیرات مثبت فراوانی بر جنبه‌های زیست محیطی و حاصلخیزی خاک داشته و با توجه به کمک به بهبود رشد و عملکرد گیاه از منظر اقتصادی نیز سودمند باشد (Wang *et al*., 2016). در کشاورزی مدرن با استفاده از کودهای زیستی و اتخاذ راهکارهای مناسب می توان از تلفات نیتروژن در خاک و کاهش راندمان کودهای شیمیایی جلوگیری کرد (Han *et al*., 2008; Khalil *et al*., 2009). گندم زمستانه (*Triticum. aestivum* L.) یکی از مهم ترین محصولات غذایی و خوراکی غلات در جهان است. با این حال، تولید گندم به سطوح بالایی از کود شیمیایی نیاز دارد که اغلب منجر به عدم تعادل تغذیه‌ای در خاک و کاهش بهره‌وری محصول می‌شود. نیتروژن یک عنصر ضروری برای افزایش عملکرد محصول و در نتیجه تضمین امنیت غذایی جهانی است (Zhang *et al*., 2015). همچنین عوامل بیماری‌زای گیاهی یکی از مهم‌ترین دلایل کاهش تولیدات کشاورزی هستند. بیماری پوسیدگی معمولی ریشه یکی از مهم‌ترین بیماریهای گندم است، *Bipolaris sorokiniana* به عنوان عامل پوسیدگی معمولی ریشه گندم گزارش شده است که برای گندم دوروم تهدید کننده‌تر است (Al-Sadi *et al*., 2021). *B. sorokiniana* می تواند نه تنها ریشه‌های گندم، بلکه برگ و ساقه و همچنین دانه های گندم را نیز آلوده کند (Allali *et al*., 2019). در حال حاضر موثرترین راه برای کنترل پوسیدگی ریشه گندم استفاده از کنترل شیمیایی بوده (O'Sullivan *et al*., 2021) که با مفهوم کشاورزی ارگانیک و دوستدار محیط زیست در تضاد است. در سال‌های اخیر، توسعه استفاده از عوامل کنترل زیستی به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش شیمیایی برای کنترل زیستی بیمارگرها مورد توجه قرار گرفته است (Sahu *et al*., 2019؛Sarkar *et al*., 2018 and Zhao *et al*., 2015). در میان آن‌ها، باسیلوس به دلیل خواص ضد باکتریایی طیف گسترده و اثر محرک رشد قابل توجهی که دارد، به عنوان یک باکتری، نسبت به سایر میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست مزیت دارد؛ زیرا دارای توانایی منحصر به فردی برای تشکیل اندوسپور در پاسخ به محیط‌های نامطلوب مختلف است (Miljakovic *et al*., 2020).

پلی گاما گلوتامیک اسید (γ-PGA) یک پلی‌پپتید آنیونی، زیست تخریب‌پذیر، غیرسمّی و آبدوست است که توسط گونه‌های مختلف باسیلوس تولید می‌شود. اسید گلوتامیک D و L واحدهای پایه این پلیمر هستند که توسط پیوندهای آمیدی ایجاد شده‌اند (Rehm *et al*., 2009). میزان تولید γ-PGA به باکتری و محیطی که باکتری در آن رشد می‌کند، بستگی دارد. عوامل مختلفی مانند دما، pH، دوره انکوباسیون، و منبع کربن و نیتروژن بر تولید میکروبی و وزن مولکولی γ-PGA تأثیر می‌گذارند. γ-PGA با جرم مولکولی بالا برای کاربردهای مختلف صنعتی بسیار امیدوارکننده است. بنابراین، بهینه‌سازی پارامترها برای تولید بیشتر γ-PGA ضروری است (Kimura *et al*., 2004 & Kocianova *et al*., 2005). ژانگ و همکاران، ۲۰۱۷ نشان دادند که γ-PGA به طور قابل توجهی باعث افزایش عملکرد گیاه و جذب عناصر مغذی N، P، K با تقویت ظرفیت جذب ریشه و تنظیم در دسترس بودن مواد غذایی از طریق تغییر ویژگی های میکروبی و آنزیمی شد، زیرا γ-PGA می تواند NH^{+4} خاک را کاهش دهد. محتوای N که منجر به تاخیر در تشکیل NO^{-3}-N می‌شود، و این می‌تواند به طور موقت ذخیره N در دسترس بیشتر در خاک برای جذب گیاه مفید باشد. بنابراین γ-PGA کارایی گیاه را برای استفاده از عناصر خاک، به ویژه نیتروژن

افزایش داد (Zhang *et al*.. 2017). γ-PGA به عنوان هم‌افزایی، ترکیب امیدوارکننده در سیستم‌های کشاورزی در نظر گرفته می‌شود و نقش مهمی در چرخه نیتروژن خاک ایفا می‌کند (Yuliang Fu *et al*., 2022). همچنین، وانگ و همکاران، ۲۰۰۸، نشان دادند که لیپوپپتیدها و γ-PGA تولیدشده توسط *B. subtilis* B6-1 می‌توانند به طور موثری پژمردگی خیار را کنترل کرده، جذب مواد مغذی را افزایش دهند و همچنین رشد نشاهای خیار را در مراحل ابتدایی رشد افزایش دهند؛ بنابراین می‌توان گفت γ-PGA می‌تواند قدرت عامل کنترل زیستی را در تحریک رشد گیاه و کنترل بیماری‌های گیاهی افزایش دهد.

هدف از تحقیق حاضر جداسازی باکتری‌های برتر تولیدکننده ترکیب گاما پلی گلوتامیک اسید، بهینه‌سازی تولید این ترکیب و تأثیر این ترکیب بر کنترل پوسیدگی معمولی ریشه گندم در شرایط گلخانه بود.

مواد روش‌ها

۱- جداسازی و غربالگری

غربالگری اولیه باکتری‌های تولیدکننده γ-PGA از نمونه‌های جمع‌آوری شده از مزارع گندم استان همدان، ضایعات قارچ‌های خوراکی، ضایعات نخل و ضایعات چوب انجام شد. ده گرم از هر نمونه در نود میلی لیتر آب استریل دیونیزه شده همگن شده و با مخلوط کن به مدت ۱ دقیقه مخلوط شد و سپس کشت به روش سری رقت انجام شد. سپس غربالگری به‌منظور انتخاب بهترین جدایه‌ها انجام شد. (Chatterjee *et al*., 2017). محیط کشت جداسازی متشکل از ده گرم در لیتر گلوکز، پنج گرم در لیتر عصاره مخمر، پنج گرم در لیتر مونو سدیم گلوتامات، نیم گرم در لیتر K_2HPO_4، نیم گرم در لیتر KH_2PO_4، و یک‌دهم گرم در لیتر $MgSO_4.7H_2O$ همچنین pH اولیه محیط نیز با استفاده از NaOH یا HCl روی ۶,۵ تنظیم شد. محیط به مدت بیست دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد اتوکلاو شد. پس از انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۱۴۰ rpm جدایه‌های تولیدکننده γ-PGA به منظور انتخاب بهترین جدایه برای تجزیه و تحلیل بیشتر انتخاب شدند.

انتخاب بهترین ایزوله تولید کننده:

جدایه‌های تولید کننده γ-PGA در ارلن ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت بهینه‌شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و دور ۱۴۰ در دقیقه کشت داده شد. محیط کشت شامل: ۲۰ گرم گلوکز، ۲۰ گرم اسید گلوتامیک، ۰,۵ گرم KH_2PO_4، ۰,۱ گرم منگنز، ۰,۱۵ گرم کلرید کلسیم، ۲ گرم عصاره مخمر ۰,۵ گرم روی و منیزیم ۰,۱ گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود.

تجزیه و تحلیلγ-PGA

مقدار تولید γ-PGA با استفاده از ترکیب CTAB مورد بررسی قرار گرفت. برای خالص‌سازیγ-PGA ، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت با ۱۸۰۰ میکرولیتر آب مایع دیونیزه شده مخلوط شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه (۱۰۰۰۰دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس) سانتریفیوژ شد تا سلول‌ها جدا شوند. مقدار سه برابری اتانول سرد به ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی حاوی γ-PGA اضافه شد تا γ-PGA رسوب کند. محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شد. با سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس و دور ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه، γ-PGAرسوب شده به عنوان یک گلوله بازیابی شد. گلوله مجدداً در یک میلی لیتر آب مقطر معلق شد. حدود ۱۰۰ میکرولیتر نمونه و۱۰۰ میکرولیتر از محلول CTAB به هر چاهک یک صفحه الایزا ۹۶ چاهکی افزوده شد و به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شد. معرف CTAB به γ-PGA با بار منفی متصل می شود و یک محلول تشکیل می‌دهد، برای هر نمونه، سه تکرار اندازه‌گیری شد. کدورت در ۴۰۰ نانومتر با استفاده از (BioTek Instruments, Winooski, USA). اندازه‌گیری شد. حضورγ-PGA یک کمپلکس نامحلول تشکیل می‌دهد

که کدورت سوسپانسیون را افزایش می‌دهد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از استاندارد γ-PGA 1 MDa (Henkel AG & Co., KGaA, Düsseldorf, Germany) برای محاسبه غلظت γ-PGA در محیط کشت استفاده شد (Halmschlag *et al*., 2020).

شناسایی باکتری‌ها

با توجه به نتایج حاصل از میزان تولید γ-PGA، از بین ۱۸۰ جدایه، ۹ باکتری به عنوان بهترین باکتری مولد γ-PGA انتخاب شدند. شناسایی مولکولی این ۹ جدایه انجام شد و پس از ثبت توالی در سایت NCBI، کد دسترسی وارد شد.

جدایه‌های باکتری که در گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شده بودند، روی پلیت‌های LBA کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت، یک لوپ پر از باکتری به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۲۰۰ دور در دقیقه رشد کرد، به‌منظور استخراج DNA باکتری‌ها از کیت استخراج DNA (Monorach* DNA Gel Extraction Kit# T1020L, Germany) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه 16S rDNA از روش (بلانک و همکاران،، ۲۰۱۸) و ترکیب آغازگرهای زیر استفاده شد.

16S rRNA fwd: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
16S rRNA rev: GGTTACCTTGTTACGACTT

مقایسه تشابه توالی ژن 16S rDNA با استفاده از برنامه پایگاه داده BLAST GenBank (NCBI) انجام شد.

کنترل زیستی پوسیدگی ریشه گندم معمولی

قارچ *Biopolaris sorokiniana* عامل پوسیدگی معمولی ریشه گندم از کلکسیون قارچ‌شناسی بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تهران تهیه شد.

بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر *Bipolaris sorokiniana*

برای بررسی قدرت بازداری از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاه از روش (Thammasittirong 2016) استفاده شد. به‌این ترتیب که یک قرص ۵ میلی‌متری از کشت ۵ روزه قارچ *B. sorokiniana* به فاصله ۲/۵ سانتی‌متری از لبه تشتک پتری حاوی محیط NA+PDA 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 سلسیوس قرار گرفتند. پس از ۷ روز، شعاع رشد پرگنه قارچ در حضور باکتری و تیمار شاهد اندازه‌گیری شد. درصد ممانعت از رشد قارچ توسط باکتری با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

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

شعاع رشد قارچ درحضور باکتری $R_2 =$ / شعاع رشد قارچ در تیمار شاهد $= R_1$

آزمایش های گلدانی

آزمایش گلخانه‌ای با استفاده از بذر گندم پیشگام (تهیه‌شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی، تهران، ایران) انجام شد. اثرکنترلی γ-PGA و باکتری روی قارچ عامل بیماری پوسیدگی معمولی طوقه و ریشه گندم شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. قبل از کاشت، بذور به مدت ۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضدعفونی شدند، سپس دو بار با آب استریل شسته شده و برای خشک‌شدن دو ساعت زیر هود لامینار استریل قرار گرفتند، بذرها در گلدان‌های پلاستیکی (قطر ۴۵ سانتی متر) حاوی ۵ کیلو گرم خاک استریل کاشته شدند. (شامل: خاک مزرعه، ماسه و خاک رس، به ترتیب ۲:۱:۱). گیاهان به مدت ۱۴ روز پس

از کاشت در شرایط گلخانه‌ای (۲۳ تا ۳۰ درجه سلسیوس) رشد کردند و هفته‌ای دو بار آبیاری شدند. پس از ۱۴ روز، محلول اسپور قارچ بیمارگر (1×10^{6} cfu/ml) در نزدیکی خاک ریشه گندم در گلدان آبیاری شد، پس از ۲ روز ۵۰ میلی لیتر از هر تیمار بیوکنترل (شرح در جدول ۲) به هر گلدان اضافه شد. این آزمایش در شش تیمار و سه تکرار و در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی (شرح داده شده در جدول ۱) انجام شد. پس از۱۵ روز تمام گیاهان از ریشه کنده شدند و برای ارزیابی شدت بیماری، زیر شیر آب با آب جاری شسته شدند. پنج سطح نمره وجود داشت: سطح ۰ برای گیاهان سالم و عاری از بیماری، سطح ۱ برای کمتراز ۲۵ درصد بیماری، سطح ۲ برای۲۵ تا ۵۰ درصد بیماری، سطح ۳ برای ۵۰ تا ۷۵ درصد بیماری، و سطح ۴ برای بیش از ۷۵ درصد بیماری انتخاب شدند (Peng *et al*., 2020).

$$IR\ (\%) = (A - 0.5) - (a - 0.5) / (A - 0.5) \times 100$$

جدول ۱. توضیحات مربوط به تیمارهای باکتریایی

Table 1, description of bacterial treatments

Treatment	Description
UTB 97	50 ml of *B. Velezensis* UTB97 bacteria grown in LB culture media with a population of 10^{8} cfu/ml
UTB 97 + Pathogen	50 ml of *B. Velezensis* UTB97 bacteria grown in LB culture media 10^{8} cfu/ml +Pathogenic fungi
UTB97 + PGA	50 ml of *B. Velezensis* UTB97 bacteria in LB , 10^{8} cfu/ml + 2 grams γ-PGA
UTB97 + PGA + Pathogen	+ Pathogenic fungi 50 ml of *B. Velezensis* UTB97 bacteria in LB , 10^{8} cfu/ml + 2 grams γ-PGA
Control +	10^{6} cfu/ml 50 ml of *Bipolaris Sorokiniana*
Control -	ml sterile distilled water ۵۰

نتایج

از مجموع ۱۸۰ جدایه باکتریایی جدا شده تعداد ۹ جدایه توانستند ترکیب گاما پلی گلوتامیک اسید γ-PGA را با مقادیر مختلف تولید کنند، که پس از شناسایی مولکولی این ۹ جدایه متعلق به جنس باسیلوس بودند (جدول دو)، همچنین از بین این ۹ جدایه باسیلوس ۷ جدایه وابسته به منبع خارجی گلوتامیک اسید بودند و ۲ جدایه *Bacillus licheniformis* M6 و *Bacillus halotolerans* BP2 می‌توانستند این ترکیب را به صورت مستقل از گلوتامیک اسید تولید کنند. در این میان جدایه *Bacillus velezensis* UTB97 با نرخ تولید ۴۰ گرم بر لیتر γ-PGA به عنوان جدایه برتر تولید کننده انتخاب شد و در بررسی‌های گلخانه ای مورد استفاده قرار گرفت (جدول۲). همچنین نتایج این بررسی نشان داد که گلوکز بهترین منبع کربن و عصاره مخمر بهترین منبع نیتروژن برای تولید γ-PGA توسط جدایه‌های باسیلوس جداسازی شده در این تحقیق انتخاب شدند.

جدول۲. توضیحات مربوط به جدایه‌های برتر تولید کننده γ-PGA

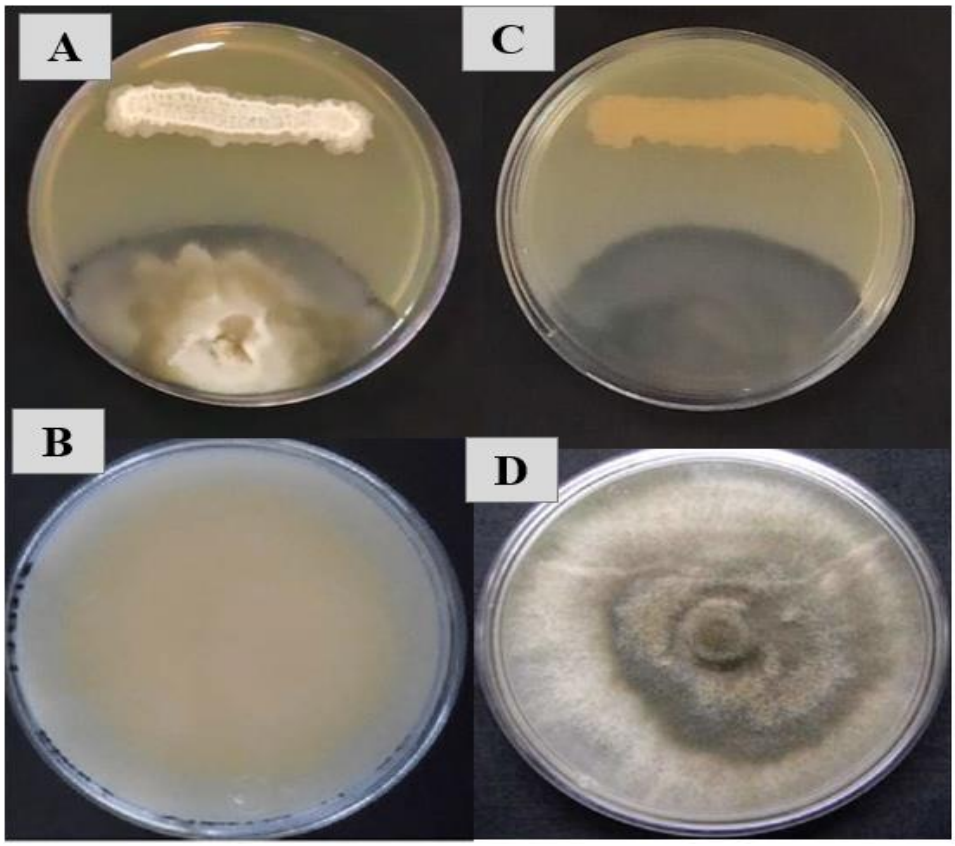
Table 2, descriptions of the top isolates producing γ-PGA

جدایه	Humans Pathogenicity	The rate of γ-PGA production with glutamic acid	The rate of γ-PGA production Without glutamic acid	isolation place	accession number in NCBI
Bacillus velezensis **M1**	–	3.169	–	Edible mushroom waste	OR161817
Bacillus subtilis AP24	–	7.537	–	Palm wastes	OR161814
Bacillus licheniformis M6	–	10.715	۴٫۸۹۰	Wheat root	OR161822
Bacillus subtilis AP40	–	8.035	–	Wheat root	OR161815
Bacillus licheniformis A84	–	5.955	–	Edible mushroom culture media	OR161818
Bacillus licheniformis B113	–	7.۲50	–	Palm wastes	OR161819
Bacillus velezensis 97	–	40.754	–	Edible mushroom waste	OR161821
Bacillus halotolerans BP2	–	9.466	4.654	Edible mushroom waste	OR161823
Bacillus Velezensis M3A	–	5.015	–	Edible mushroom waste	MW988103

بررسی اثر ممانعت کنندگی از رشد قارچ بیمارگر

ممانعت از رشد قارچ *B. sorokiniana* در شرایط آزمایشگاهی

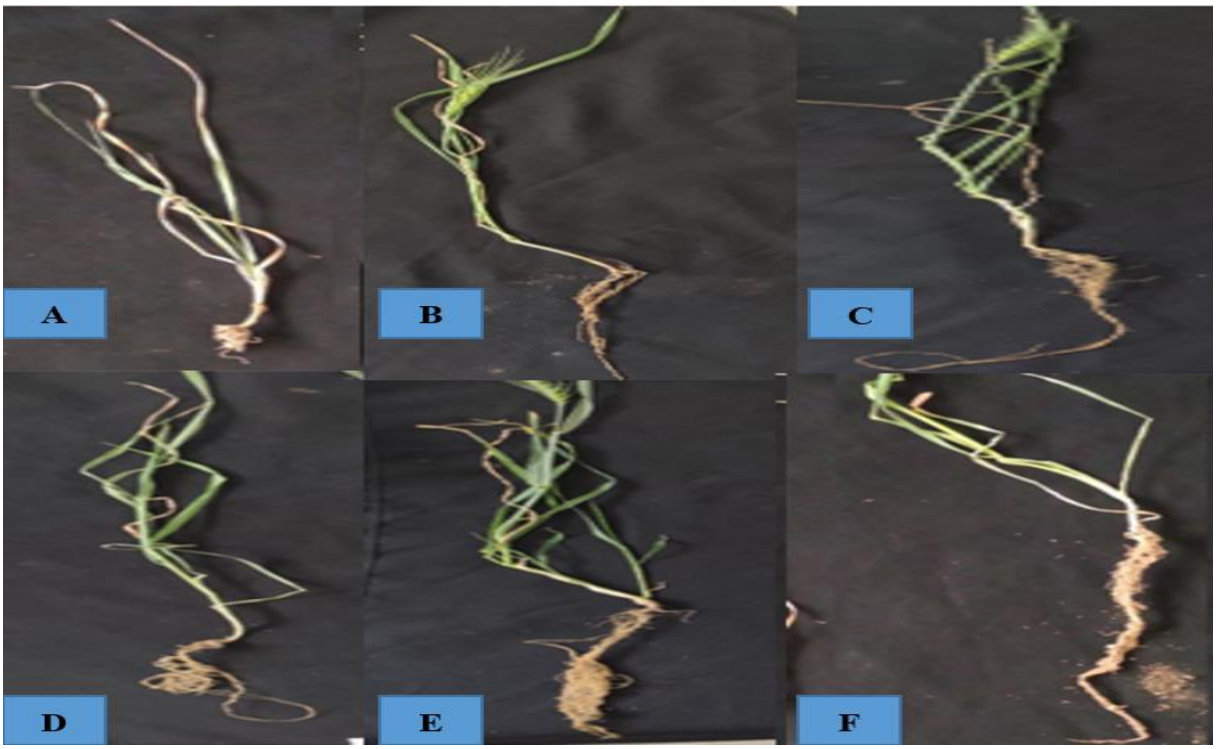
سویه *B. velezensis* UTB97 که به عنوان برترین جدایه تولیدکننده γ-PGA انتخاب شده بود، در این آزمایش استفاده شد و توانست در شرایط آزمایشگاهی به میزان ۶۵ درصد از رشد قارچ بیمارگر در روش کشت متقابل جلوگیری کند.



شکل ۱. ممانعت از رشد قارچ *B.Sorokiniana* توسط جدایه *B.Velezensis* UTB97؛ به روش کشت متقابل
Figure 1, inhibition of *B. Sorokiniana* growth by *B. Velezensis* UTB97; by dual culture method

ممانعت از رشد قارچ *B. sorokiniana* در گلخانه

پس از گذشت ۱۵ روز از تلقیح قارچ بیمارگر تاثیر تیمارهای مختلف روی شدت بیماری پوسیدگی معمولی طوقه و ریشه و همچنین افزایش شاخص‌های رشدی گندم ارزیابی شد. در تیمار شاهد مثبت (اثبات بیماری‌زایی) ۸۳ درصد بیماری پوسیدگی معمولی طوقه و ریشه ثبت شد. در تیمار شاهد منفی (گیاه سالم)، کاملا سالم و عاری از بیماری بود، همچنین درصد کنترل بیماری در تیمار حضور باکتری UTB97 و تیمار UTB97 + γ-PGA به ترتیب ۵۹ و ۷۳ مشاهده شد. در آزمایش مربوط به بررسی شاخص‌های رشدی گندم، دو تیمار UTB97 و تیمار UTB97 + γ-PGA به شکل معنی‌داری سبب افزایش شاخص‌های رشدی گندم در مقایسه با تیمار شاهد منفی شدند. همچنین تیمار UTB97 + γ-PGA حتی در حضور قارچ بیمارگر توانست موجب افزایش شاخص‌های رشدی گیاه نظیر وزن خشک ساقه و ریشه وطول ریشه در مقایسه با تیمار شاهد منفی (گیاه سالم) شود.



شکل۲. A، اثبات بیماری‌زایی (شاهد مثبت) قارچ *B.Sorokiniana* ، B، گیاه سالم (شاهد منفی)، C، تاثیر جدایه UTB 97 در کنترل بیماری، D، تاثیر جدایه UTB97 + γ-PGA در کنترل بیماری، E، تاثیر جدایه UTB 97 بر شاخص‌های رشدی، F، تاثیر جدایه UTB97 + γ-PGA بر شاخص‌های رشدی

figure 2. A, Pathogenicity (positive control) of B. Sorokiniana, B, negative control, C, effect of UTB 97 isolate in disease control, D, effect of UTB97 + γ-PGA isolate in disease control, E, effect UTB 97 isolate on growth index, F, the effect of UTB 97 + γ-PGA isolate on growth index.

جدول ۳. جدول مقایسه میانگین بذور گندم تیمار شده با جدایه‌های UTB 97 و UTB97 + γ-PGA روی کنترل قارچ ***B. sorokiniana*** عامل بیماری پوسیدگی معمولی طوقه و ریشه گندم و افزایش شاخص‌های رشدی گندم

Table 3. Comparison table of average wheat seeds treated with UTB 97 and UTB97 + γ-PGA isolates on the control of *B. sorokiniana* fungus, the cause of common crown and root rot disease of wheat and increase of growth indices of wheat.

تیمار	% Disease	% Disease control	Plant C(height)m	Root (length)Cm	Plant fresh weight (g)	Root wet weight (g)	Root dry weight (g)	Plant Dry weight (g)
pathogenicity	a۸۳	-	d۱۴	d۴,۳۳۳	c۰,۰۴۶۶	d۰,۰۰۱	e۰,۰۰۱	d۰,۰۲۳۳
healthy plant	-	a۱۰۰	c۳۴,۳۳۳	c۱۴	bc۰,۶۷۶۶	c۰,۱۵	d۰,۱	c۰,۳۳۳
۹۷+ pathogen	c۳۳,۳۳۳	bc۵۹,۸۳۹	c۳۴	c۲۰	b۰,۹	b۰,۳	c۰,۱۲	c۰,۲۷
۹۷+ pathogen+ γ-PGA	c۲۱,۶۶۷	b۷۳,۸۹۵	b۳۸,۳۳۳	a۳۵,۳۳۳	b۱,۱۲	b۰,۴۰۳۳	c۰,۱۷۶۶۶	b۰,۵۶۶۶
۹۷	b۴۷,۳۳۳	-	b۴۱	b۳۰	b۱,۰۶۶۶۷	b۰,۴۲	b۰,۲۴	b۰,۶۰۳۳
۹۷+ γ-PGA	bc۳۶	-	a۶۵,۶۶۷	a۴۰,۳۳۳	a۲,۳	a۰,۸۶۳۳	a۰,۵۱	a۰,۹۴۶۶

بحث

بیماری پوسیدگی معمولی طوقه و ریشه گندم یکی از مهمترین دلایل کاهش عملکرد گندم در مناطق گرم و مرطوب است (Gupta *et al*., 2018). با توجه به خاک‌زاد بودن بیماگر و ناکارآمدی سموم شیمیایی در کنترل بیمارگرهای خاک‌زاد، نیاز به استفاده از روش‌های جایگزین بیش از پیش احساس می‌شود. کنترل بیولوژیک بیمارگر با استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک روشی جایگزین مناسب، ایمن و پایدار است که ضمن کارآمدی با سایر روش‌های مدیریتی مرسوم در کشاورزی پایدار نیز سازگار است (Haas and keel, 2003). استفاده از باکتری‌هایی با توانایی بالا در کنترل قارچ‌های بیمارگر و توانمند در تولید متابولیت‌ها و هورمون‌های محرک رشد موجب افزایش امیدواری به منظور افزایش تولید محصولات کشاورزی در واحد سطح شده است. لیکن پیچیدگی‌های روابط میکروبی در خاک، و گاهاً عدم ثبات رفتار عوامل بیولوژیک نگرانی‌هایی را در این زمینه ایجاد کرده است (احمدزاده و شریفی تهرانی، ۱۳۹۴). لذا بایستی تلاش‌ها در جهت افزایش کارایی و اثر بخشی این عوامل افزایش یابد. گاما پلی‌گلوتامیک‌اسید، یک ترکیب زیست‌تخریب‌پذیر، قابل‌حل در آب، غیر آلرژی‌زا برای پستانداران و غیر سمی برای انسان است. به سبب این خصوصیات این ترکیب کاربردهای بسیار گسترده‌ای در کشاورزی دارد (Cai *et al*., 2017). طبق تحقیقات متعددی ثابت‌شده است که γ-PGA به دلیل بنیاد آنیونی می‌تواند به صورت طبیعی کاتیون‌های قابل‌دسترسی زیستی مانند، Fe^{+3}، $Fe^{+2}Mg^{+2}$، Zn^{+2}، Ca^{+2} و Mn^{+2} را به شکلی کارآمدتر به گیاه منتقل کند (Shih *et al*., 2004). همچنین کاربرد باکتری‌ها در خاک‌هایی با مقدار NH^{+3} بالا سبب تولید γ-PGA توسط باکتری می‌شود (Potter *et al*., 2001) . از طرفی با توجه به ماهیت γ-PGA که از ترکیب دو اسید آمینه L و D گلوتامیک اسید تشکیل شده است و همچنین ظرفیت بسیار بالای این تریکب برای جذب و نگهداری آب این ترکیب می‌تواند در شرایط خشن خاک سبب افزایش ماندگاری و ثر بخشی باکتری شود چرا که در صورت بروز تنش گرسنگی و خشکی باکتری می‌تواند از γ-PGA به عنوان منبع غذایی استفاده کند (Ashiuchi, M., and H. Misono., 2002., Chen *et al*., 2020).

در این تحقیق استفاده از باکتری *B. velezensis* UTB97 + γ-PGA توانست به میزان ۷۳ درصد از بروز بیماری پوسیدگی معمولی طوقه و ریشه گندم جلوگیری کند همچنین نکته قابل توجه افزایش شاخص‌های رشدی گیاه نظیر ارتفاع گیاه و وزن خشک ریشه حتی در حضور قارچ بیمارگر نسبت به تیمار شاهد منفی (گیاه سالم) بود. که می‌توان دلیل این امر را حضور ترکیب γ-PGA و اثر بخشی این ترکیب روی زنده‌مانی و کارایی باکتری و کمک به جذب بهتر عناصر غذایی توسط گیاه نسبت داد. همچنین رودریگز و همکاران، ۲۰۲۱ گزارش کردند که ترکیب باسیلوس سوبتیلیس TE3 و *B. amyloliquefaciens* XZ34-1 به طور موثری سبب کنترل بیماری های پوسیدگی طوقه و ریشه و همچنین لکه‌برگی ناشی از قارچ بیمارگر *B. sorokiniana* می‌شود (Villa-Rodriguez *et al*., 2021; Yi *et al*., 2021). همچنین کاربرد سوسپانسیون باکتری *Bacillus subtilis* TE3، روی بذر گندم سبب کاهش معنی‌دار تعداد زخم‌ها و سیاه شدن ریشه گندم کاشته شده در خاک‌آلوده به قارچ *B. sorokiniana* در مقایسه با تیمار شاهد شد، همچنین محلول‌پاشی عصاره باکتریایی فیلترشده روی برگ‌های گندم سبب کاهش معنی‌دار تعداد و اندازه لکه‌های نکروتیک روی برگ‌های گندم شد که این امر نشان‌دهنده وجود ترکیبات ضد باکتریایی (خصوصاً بیوسورفکتانت‌ها) در عصاره فیلترشده بوده که از رشد قارچ بیمارگر جلوگیری کرده است (Rodriguez *et al*., 2019). رودریگز و همکاران، ۲۰۱۹، همچنین اعلام کردند که آن دسته از باکتری‌هایی که آنزیم‌ها و ترکیبات خارج سلولی (خصوصاً بیوسورفکتانت‌هایی نظیر سورفکتین و ایتورین) را به میزان بیشتری به محیط خارج از سلول ترشح می‌کنند، از قدرت بسیار بیشتری برای کنترل قارچ *B. sorokiniana* برخوردار هستند (Rodriguez *et al*., 2019). در ارتباط با اثر γ-PGA بر رشد گیاه تحقیقات نشان داده است که این ترکیب هم به صورت ترکیب با باکتری تولید کننده و هم به صورت کاربرد به تنهایی سبب افزایش عملکرد محصول می‌شود، گوا و همکاران (۲۰۲۳) گزارش کردند که کاربرد درصد های مختلف از γ-PGA سبب افزایش ۶,۷۷ درصدی عملکرد گندم و همچنین افزایش محتوای پروتئین دانه گندم می‌شود.

کاربرد γ-PGA تولید شده توسط *Bacillus subtilis* به همراه باکتری روی ذرت گلدانی در مناطق خشک اعمال شد و مشخص شد که γ-PGA می‌تواند سرعت سبز شدن ذرت را در شرایط خشکسالی بهبود بخشد، نرخ بقای نهال ذرت را بهبود بخشد و سبب افزایش رشد ریشه، زیست توده و برگ گیاه ذرت شود (Yin AM *et al*., 2018). استفاده از γ-PGA در کاشت پنبه تحت آبیاری قطره‌ای در مناطق خشک سین‌کیانگ می‌تواند باعث افزایش رشد پنبه، افزایش عملکرد پنبه، بهبود کیفیت پنبه و بهبود کارایی مصرف آب خاک شود (Liang JP *et al*.,2019). همچنین کاربرد ده درصدی γ-PGA در خاک می تواند به طور قابل توجهی رشد اسفناج را بهبود بخشد، وزن تر و عملکرد ماده خشک اسفناج را افزایش دهد و راندمان استفاده از کود نیتروژن را بهبود بخشد (Chen L *et al*., 2018). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که باکتری *B.Velezensis* UTB97 می‌تواند ترکیب γ-PGA را در محیط کشت بهینه تولید کند و کاربرد همزمان باکتری UTB97 و γ-PGA سبب کنترل بیماری پوسیدگی معمولی طوقه و ریشه گندم و افزایش شاخص‌های رشدی گیاه می‌شود.

REFERENCES

Ahmadzadeh, M and Sharifi Tehrani, A. (2021) Plant probiotic bacteria. University of Tehran Press,

Allali, K., Goudjal, Y., Zamoum, M., Bouznada, K., Sabaou, N., & Zitouni, A. (2019). *Nocardiopsis dassonvillei* strain MB22 from the Algerian Sahara promotes wheat seedlings growth and potentially controls the common root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana*. *Journal of Plant Pathology*, *101*, 1115-1125.

Al-Sadi, A. M. (2021). *Bipolaris sorokiniana*-induced black point, common root rot, and spot blotch diseases of wheat: A review. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *11*, 584899.

Ashiuchi, M. and H. Misono (2002). "Biochemistry and molecular genetics of poly-γ-glutamate synthesis." Applied microbiology and biotechnology 59: 9-14.

Cai, D., He, P., Lu, X., Zhu, C., Zhu, J., Zhan, Y., ... & Chen, S. (2017). A novel approach to improve poly-γ-glutamic acid production by NADPH regeneration in *Bacillus licheniformis* WX-02. *Scientific Reports*, *7*(1), 43404.

Chatterjee, A., Huma, B., Shaw, R., & Kundu, S. (2017). Reconstruction of Oryza sativa indica genome scale metabolic model and its responses to varying RuBisCO activity, light intensity, and enzymatic cost conditions. *Frontiers in plant science*, *8*, 2060.

Chen, L., Fei, L., Mohamed, K. S., Liu, L., Wang, Z., Zhong, Y., & Dai, Z. (2018). The effects of ploy (γ-glutamic acid) on spinach productivity and nitrogen use efficiency in North-West China. *Plant, Soil and Environment*, *64*(11), 517-522.

Cho, S. M., Kang, B. R., Han, S. H., Anderson, A. J., Park, J. Y., Lee, Y. H., ... & Kim, Y. C. (2008). 2R, 3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in Arabidopsis thaliana. *Molecular plant-microbe interactions*, *21*(8), 1067-1075.

Clapp, J., Moseley, W. G., Burlingame, B., & Termine, P. (2022). The case for a six-dimensional food security framework. *Food Policy*, *106*, 102164.

Fu, Y., Wang, S., Gao, S., Wang, S., Gao, Z., & He, Z. (2022). Effect of a Superabsorbent Polymer (Poly-Gamma-Glutamic Acid) on Water and Salt Transport in Saline Soils under the Influence of Multiple Factors. *Polymers*, *14*(19), 4056.

Ghosh, K., Ray, M., Adak, A., Halder, S. K., Das, A., Jana, A., ... & Mondal, K. C. (2015). Role of probiotic *Lactobacillus fermentum* KKL1 in the preparation of a rice based fermented beverage. *Bioresource technology*, *188*, 161-168.

Gondal, M. A., Dastageer, M. A., & Khalil, A. (2009). Synthesis of nano-WO3 and its catalytic activity for enhanced antimicrobial process for water purification using laser induced photo-catalysis. *Catalysis Communications*, *11*(3), 214-219.

Guo, J., Zhang, J., Zhang, K., Li, S., & Zhang, Y. (2023). Effect of γ-PGA and γ-PGA SAP on soil microenvironment and the yield of winter wheat. *Plos one*, *18*(7), e0288299.

Guo, Y., Gao, P., Li, F., & Duan, T. (2019). Effects of AM fungi and grass endophytes on perennial ryegrass *Bipolaris sorokiniana* leaf spot disease under limited soil nutrients. *European Journal*

of Plant Pathology, *154*, 659-671.
Haas, D. and C. Keel (2003). "Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease." Annual review of phytopathology 41(1): 117-153.
Halmschlag, B., Putri, S. P., Fukusaki, E., & Blank, L. M. (2020). Poly-γ-glutamic acid production by *Bacillus subtilis* 168 using glucose as the sole carbon source: a metabolomic analysis. *Journal of bioscience and bioengineering*, *130*(3), 272-282.
Harishchandra, H. and P. Perumpuli (2023). "IDENTIFICATION OF ACETIC ACID BACTERIA FROM NATURALLY FERMENTED BANANA VINEGAR." Self-Sustaining Agriculture: Way Forward for Food Security and Safety: 105.
Hu, Y., Shao, Y., Wu, C., Yuan, C., Ishimura, G., Liu, W., & Chen, S. (2018). γ-PGA and MTGase improve the formation of ε-(γ-glutamyl) lysine cross-links within hairtail (*Trichiurus haumela*) surimi protein. *Food Chemistry*, *242*, 330-337.
Izano, E. A., Sadovskaya, I., Wang, H., Vinogradov, E., Ragunath, C., Ramasubbu, N., ... & Kaplan, J. B. (2008). Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in Aggregatibacter actinomycetemcomitans. *Microbial pathogenesis*, *44*(1), 52-60.
Kimura, K., Tran, L. S. P., Uchida, I., & Itoh, Y. (2004). Characterization of *Bacillus subtilis* γ-glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly-γ-glutamate. *Microbiology*, *150*(12), 4115-4123.
Kocianova, S., Vuong, C., Yao, Y., Voyich, J. M., Fischer, E. R., DeLeo, F. R., & Otto, M. (2005). Key role of poly-γ-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of Staphylococcus epidermidis. *The Journal of clinical investigation*, *115*(3), 688-694.
Layek, J., Das, A., Idapuganti, R. G., Sarkar, D., Ghosh, A., Zodape, S. T., ... & Meena, R. S. (2018). Seaweed extract as organic bio-stimulant improves productivity and quality of rice in eastern Himalayas. *Journal of Applied Phycology*, *30*, 547-558.
Liang, J., Shi, W., He, Z., Pang, L., & Zhang, Y. (2019). Effects of poly-γ-glutamic acid on water use efficiency, cotton yield, and fiber quality in the sandy soil of southern Xinjiang, China. *Agricultural Water Management*, *218*, 48-59.
Liu, W., Xie, Y., Ma, J., Luo, X., Nie, P., Zuo, Z., ... & Ren, J. (2015). IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics*, *31*(20), 3359-3361.
Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of *Bacillus spp.* in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, *8*(7), 1037.
O'Sullivan, C. A., Belt, K., & Thatcher, L. F. (2021). Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 707509.
Paul, S. K., Mahmud, N. U., Gupta, D. R., Surovy, M. Z., Rahman, M., & Islam, M. T. (2021). Characterization of *Sclerotium rolfsii* causing root rot of sugar beet in Bangladesh. *Sugar Tech*, *23*, 1199-1205.
Peng, Y. P., Chang, Y. C., Chen, K. F., & Wang, C. H. (2020). A field pilot-scale study on heavy metal-contaminated soil washing by using an environmentally friendly agent—poly-γ-glutamic acid (γ-PGA). *Environmental Science and Pollution Research*, *27*, 34760-34769.
Pötter, M., Oppermann-Sanio, F. B., & Steinbüchel, A. (2001). Cultivation of bacteria producing polyamino acids with liquid manure as carbon and nitrogen source. *Applied and environmental microbiology*, *67*(2), 617-622.
Rehm, B. H. (2010). "Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications." Nature Reviews Microbiology 8(8): 578-592.
Shih, I. L., Van, Y. T., & Shen, M. H. (2004). Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly (glutamic acid) and poly (lysine). *Mini reviews in medicinal chemistry*, *4*(2), 179-188.
Thammasittirong, S. N. R. (2017). The potential of *Bacillus subtilis* BAS114 for in vitro biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *Advances in Environmental Biology*, *11*(1), 46-51.
Villa-Rodriguez, E., Parra-Cota, F., Castro-Longoria, E., López-Cervantes, J., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against

Bipolaris sorokiniana, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum L.* subsp. durum). *Biological control*, *132*, 135-143.

Villa-Rodriguez, E., Lugo-Enríquez, C., Ferguson, S., Parra-Cota, F. I., Cira-Chávez, L. A., & de los Santos-Villalobos, S. (2022). *Trichoderma harzianum* sensu lato TSM39: A wheat microbiome fungus that mitigates spot blotch disease of wheat (Triticum turgidum L. subsp. durum) caused by *Bipolaris sorokiniana*. *Biological Control*, *175*, 105055.

Wang, L., Mao, J., Zhao, H., Li, M., Wei, Q., Zhou, Y., & Shao, H. (2016). Comparison of characterization and microbial communities in rice straw-and wheat straw-based compost for Agaricus bisporus production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *43*(9), 1249-1260.

Yi, Y., Shan, Y., Liu, S., Yang, Y., Liu, Y., Yin, Y., ... & Li, R. (2021). Antagonistic strain *Bacillus amyloliquefaciens* XZ34-1 for controlling *Bipolaris sorokiniana* and promoting growth in wheat. *Pathogens*, *10*(11), 1526.

Yin, A., Jia, Y., Qiu, T., Gao, M., Cheng, S., Wang, X., & Sun, Y. (2018). Poly-γ-glutamic acid improves the drought resistance of maize seedlings by adjusting the soil moisture and microbial community structure. *Applied Soil Ecology*, *129*, 128-135.

Zabed, H. M., Akter, S., Yun, J., Zhang, G., Awad, F. N., Qi, X., & Sahu, J. N. (2019). Recent advances in biological pretreatment of microalgae and lignocellulosic biomass for biofuel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *105*, 105-128.

Zhang, L., Yang, X., Gao, D., Wang, L., Li, J., Wei, Z., & Shi, Y. (2017). Effects of poly-γ-glutamic acid (γ-PGA) on plant growth and its distribution in a controlled plant-soil system. *Scientific reports*, *7*(1), 6090.

Zhang, P., Guo, G., Wu, Q., Chen, Y., Xie, J., Lu, P., ... & Liu, Z. (2020). Identification and fine mapping of spot blotch (Bipolaris sorokiniana) resistance gene Sb4 in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, *133*, 2451-2459.

Zhang, X., Wu, Y., & Gu, B. (2015). Urban rivers as hotspots of regional nitrogen pollution. *Environmental Pollution*, *205*, 139-144.