

مطالعه فنوتیپی و ژنوتیپی *Pseudomonas fluorescens* جدایه PGU0 و ارزیابی توانایی بیوکنترلی آن علیه *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه لویا

۱. فاطمه جمالی*؛ ۲. فرشته بیات

۱ و ۲. استادیاران گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۹ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۹)

چکیده

سودوموناس‌های فلورسنت مولد آنتی‌بیوتیک ۲ و ۴- دی استیل فلورو گلو سینول (DAPG) برای استفاده به‌عنوان عوامل بیوکنترل، در سراسر دنیا، به‌خوبی مطالعه شده‌اند. استرین *Pseudomonas fluorescens* PGU0 از ریزوسفر آفتابگردان در استان بوشهر جداسازی شد. آزمون کشت متقابل مشخص کرد که این استرین در شرایط درون‌شیشه‌ای فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ *Rhizoctonia solani* روی محیط‌های کشت مختلف را دارد و در شرایط اتاقک رشد نیز موجب کاهش شدت بیماری (۵۲ درصد) و افزایش وزن خشک گیاهچه‌های آلوده لویا (۸۰ درصد) می‌شود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با پرایمرهای اختصاصی، وجود ژن‌های کلیدی (*phlD*، *hcnBC* و *pltB*) دخیل در بیوستز متابولیت‌های ضد میکروبی، به‌ترتیب، *Phl*، پایولوتورین (PLT) و سیانید هیدروژن (HCN) را مشخص کرد. تولید آنتی‌بیوتیک‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) بررسی و مشخص شد این باکتری توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌های DAPG و PLT را دارد. همچنین، تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور در شرایط آزمایشگاهی توسط این باکتری به اثبات رسید. آنالیز فیلوژنتیکی 16S rDNA شباهت این استرین را با سایر استرین‌های بیوکنترل مهم دنیا اثبات کرد که می‌توانند متابولیت‌های ضد میکروبی نظیر *Phl* و *Plt* را تولید کنند.

کلیدواژه‌گان: بیوکنترل، پایولوتورین، سیانید هیدروژن، ۲ و ۴- دی استیل فلورو گلو سینول.

مقدمه

(Kloepper et al. 1993). برای به‌حداقل رساندن نداشتن ثبات فعالیت بیوکنترل در استرین‌های باکتریایی، بهتر است استرین‌هایی برای تحقیق استفاده شوند که به شرایط خاک و آب و هوایی مناطقی سازگاری پیدا کرده باشند که قرار است در آینده در آن محل استفاده شوند (Handelsman and Stabb 1996).

مکانیسم‌هایی که معمولاً برای سرکوب بیماری توسط گونه‌های *Pseudomonas* ذکر می‌شوند شامل تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن (HCN)، آنزیم‌های تجزیه‌کننده، رقابت برای آهن به واسطه

باکتری‌های ریزوسفری فلورسنت، متعلق به *Pseudomonas* spp. برای حفاظت گیاهان علیه بیمارگرهای قارچی خاکزاد نظر محققان زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Weller 2007, Haas and Défago). هرچند بیشتر تحقیقات بر کنترل بیماری‌های ریشه‌ای توسط این باکتری‌ها متمرکز شده‌اند، در دهه‌های اخیر، بررسی‌ها و تحقیقات فراوانی درباره استرین‌های منفرد ریزوسفری با توانایی کنترل بیمارگرهای بخش‌های مختلف گیاه انجام شده است

سیستمیک در گیاهان توتون علیه بیماری ایجاد شده توسط ویروس نکروز توتون شود (Maurhofer et al. 1994). مکانیسم‌های مختلفی به این استرین اجازه فعالیت به عنوان عامل بیوکنترل در گیاهان میزبان مختلف و علیه بیمارگرهای مختلف را می‌دهند.

جایگاه بیوسنتز Phl در میان سودوموناس‌های فلورسنت به خوبی حفظ شده است، ولی توانایی آن‌ها برای تولید این آنتی‌بیوتیک از یک استرین به استرین تحت شرایط درون‌شیشه‌ای دیگر بسیار متغیر است که این حدس را برمی‌انگیزد که سودوموناس‌های Phl^+ از نظر توانایی حفاظت از گیاهان در برابر بیمارگرهای قارچی نیز متغیرند. بیشتر سودوموناس‌های Phl^+ در دو گروه تعریف شده توسط آنالیز محدود کردن 16S rDNA (ARDRA) قرار می‌گیرند. اعضای گروه اول نظیر CHA0، Pf-5 و PF می‌توانند علاوه بر Phl ، نیز تولید کنند، در حالی که، آن‌هایی که به گروه دوم ARDRا تعلق دارند، مانند Q2-87، نمی‌توانند Phl تولید کنند. گروه سوم که گروه کوچک‌تری است نیز برای استرین‌های Phl^+ Plt^- شامل *P. fluorescens* F113 پیشنهاد شده است (Keel et al. 1996).

هدف از این تحقیق، بررسی مکانیسم‌های آنتاگونیستی و ردیابی ژن‌های رمزکننده برخی آنتی‌بیوتیک‌ها در *Pseudomonas fluorescens* PGU0 و نیز مطالعه توانایی بیوکنترل این استرین علیه *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا در شرایط درون‌شیشه‌ای و گلخانه بود. همچنین، رابطه فیلوژنتیکی این جدایه با سایر استرین‌های بیوکنترل مولد انواع آنتی‌بیوتیک‌ها براساس 16S rDNA بررسی شد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در این تحقیق باکتری *P. fluorescens* PGU0 از ناحیه ریزوسفر گیاه آفتابگردان، در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر، جداسازی شد. برای نگهداری طولانی‌مدت، کشت باکتریایی در کینگ ب برات (King et al. 1954) همراه با ۵۰ درصد گلیسرول ۸۷ درصد استریل در لوله‌های اپندورف در ۸۰- درجه سانتی‌گراد انجام شد. قارچ *R. solani* AG2-

سیدروفورها، رقابت برای کربن و مقاومت القایی سیستمیک است (Haas and Défago 2005). آنتی‌بیوتیک‌های ۲ و ۴- دی استیل فلورو گلوکوسینول (DAPG یا Phl)، پایلوتورین (Plt)، پیرول‌نیتین (Prn) و مشتقات مختلف فنازین (Phz)، به عنوان دلایل عمده فعالیت آنتاگونیستی گونه‌های *Pseudomonas* با توانایی بیوکنترل ذکر شده‌اند (Thomashow and Weller 1996).

بسیاری از سودوموناس‌های فلورسنت می‌توانند DAPG تولید کنند (Keel et al. 1996) که متابولیت ثانویه‌ای است که برای باکتری‌ها و قارچ‌ها (Keel et al. 1992)، نامندها (Cronin et al. 1997) کرم‌های حلقوی (Bowden et al. 1965) و گیاهان (Maurhofer et al. 1995) تحت شرایط آزمایشگاهی سمیت دارد. این آنتی‌بیوتیک در ریزوسفر گیاهانی که با استرین‌های Phl^+ نظیر استرین CHA0 تلقیح شده بودند (Keel et al. 1992) و نیز در ریزوسفر گندم‌های رشد یافته در خاک بازدارنده (Bonsall et al. 1997) یافت شده است. استفاده از استرین‌های موتانتی که به طور اختصاصی دارای نقص در تولید Phl بودند، دخالت این آنتی‌بیوتیک در حفاظت از گیاهان علیه قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی (Keel et al. 1992) توسط سودوموناس‌های مولد را اثبات کرده است. وارد کردن ژن‌های رمزکننده تولید Phl در سودوموناس‌های Phl^- موجب بازگرداندن توانایی حفاظت از گیاهان به این استرین‌ها شده است (Fenton et al. 1992). همچنین، ساخت سودوموناس‌ها با خصوصیت بیش تولید این آنتی‌بیوتیک موجب افزایش توانایی حفاظت از گیاهان شده است (Maurhofer et al. 1995). در راستای این نتایج، سودوموناس‌های Phl^+ در خاک‌های بازدارنده به فراوانی یافت می‌شوند، ولی در خاک‌های پذیرا جمعیت پایین‌تری دارند (Raaijmakers et al. 1997).

برخی از استرین‌های سودوموناس فلورسنت مکانیسم‌های چندگانه‌ای برای بیوکنترل دارند. به عنوان مثال، در *Pseudomonas protegens* CHA0 (*P. fluorescens*) (Voisard et al. 1994)، تولید DAPG، HCN و Plt در بیوکنترل نقش دارند. همچنین، این استرین می‌تواند موجب القای مقاومت القایی

بدون بیمارگر به همین میزان ارزن دوبار اتوکلاو شده افزوده شد. بذور جوانه زده لوبیا، رقم گلی، در سوسپانسیون باکتری به غلظت 5×10^7 واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر (CFU/ml) شناور شد و پس از ۱ ساعت، به تعداد سه عدد در هر گلدان (تکرار) کاشته شدند. گلدانها در اتاقک رشد (Binder Germany) با شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در دمای ۸ درجه سانتی گراد و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری شدند. یک هفته پس از کاشت، گیاهان از خاک خارج شدند و وزن خشک گیاه اندازه گیری شد. به منظور ارزیابی شدت علائم بیماری بر ریشه های گیاه، ارزش های صفر تا ۱۰ استفاده شدند، ارزش صفر نشان دهنده نداشتن علائم (گیاه سالم با هیپوکوتیل سفید) و ارزش ۱۰ نشانگر آلودگی شدید (گیاه مرده، پوسیده، کاملاً پژمرده و خشک شده) بود (Siddiqui and Shaukat 2002). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار اجرا شد و داده های حاصل با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و میانگین ها با استفاده از تست حداقل اختلاف معنی دار (LSD) ($P \leq 0.05$) از یکدیگر جدا شدند.

خصوصیات فنوتیپی جدایه

تولید سیانید هیدروژن از نظر کیفی روی محیط کینگ ب (Alstrom 1989) و تولید سیدروفور فلورسنت به صورت کیفی روی محیط S1 تحت نور ماورای بنفش (۳۶۶ نانومتر) پس از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد ارزیابی شد (Gould et al. 1985). اندازه گیری میزان تولید سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری با روش کاستاندا و همکاران انجام شد (Castaneda et al. 2005). آزمون حل کنندگی فسفات معدنی روی محیط کشت اسپربر انجام و قطر هاله شفاف اطراف کلنی باکتری پس از یک هفته، اندازه گیری شد (Sperber 1958).

ردیابی ژن های بیوسنتز ترکیبات ضد میکروبی

ردیابی *hcnAB* (ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز HCN). بدین منظور از آغازگر مستقیم PM2 (TGCGGCATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCT

IIIB-2 عامل مرگ گیاهچه لوبیا، از کلکسیون آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی دانشکده تهیه شد. قارچ روی تشتک های حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) رشد داده شد. همچنین، این قارچ تا پایان تحقیق در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

سنجش بازدارندگی از رشد قارچ در شرایط درون شیشه ای

آزمون کشت متقابل باکتری با قارچ های بیمارگر روی دو محیط کینگ ب (KB) و سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) انجام شد. ۲۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری رشد یافته بر محیط کینگ ب برات در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت، در چهار نقطه با فاصله ۵ میلی متر از لبه تشتک پتری کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، در مرکز هر پتری حلقه ای به قطر ۵ میلی متر از کشت هفت روزه قارچ قرار داده شد. پس از رسیدن حاشیه کلنی قارچ به لبه تشتک پتری شاهد، هاله بازدارندگی اندازه گیری و ثبت شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد و داده های حاصل با نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۱ تجزیه و میانگین ها با استفاده از تست حداقل اختلاف معنی دار (LSD) ($P \leq 0.05$) از یکدیگر جدا شدند.

کنترل بیمارگر در شرایط اتاقک رشد

خاک طبیعی از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی به نسبت ۱:۳ با ماسه مخلوط شد و پس از اتوکلاو شدن، ۳۰۰ گرم از آن در گلدان های پلاستیکی ریخته شد. قارچ *R. solani* رشد یافته بر محیط PDA برای تلقیح تشتک های پتری حاوی ۲۵ گرم بذر ارزن دوبار اتوکلاو شده و مرطوب شده با ۱۲ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. بذور ارزن تلقیح شده با قارچ در دمای ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و پس از یک هفته، به عنوان مایه تلقیح قارچی به کار برده شدند. در روز اول، خاک با سوسپانسیون باکتری PGU0 به غلظت 5×10^7 واحد تشکیل دهنده کلنی در گرم (CFU/g) خاک تلقیح شد. در روز دوم، مایه تلقیح قارچ به میزان ۱ گرم با بخش سطحی خاک مخلوط شد؛ به گلدان های شاهد

شامل یک چرخه 94°C به مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس، یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای با هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در 94°C ؛ ۳۰ ثانیه در 58°C ؛ ۶۰ ثانیه در 72°C ؛ در پایان یک چرخه 72°C برای ۱۰ دقیقه بود.

استخراج و تشخیص آنتی‌بیوتیک‌ها

از محیط کشت کینگ ب (KB) و کینگ ب برات حاوی ۱۰ گرم گلوکز به‌عنوان تنها منبع کربنی (KBG) (Jamali 2009) برای ارزیابی تولید آنتی‌بیوتیک در PGU0 استفاده شد. باکتری در این محیط در دمای 27°C درجه سانتی‌گراد بر شیکر با 170 دور در دقیقه کشت داده شد. نمونه‌گیری و استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از 35 میلی‌لیتر از محیط کشت پس از 72 ساعت طبق روش *Maurhofer et al.* (1992) انجام شد. اتیل استات به نسبت مساوی به محیط کشت اضافه شد، درب ارلن‌های حاوی محیط کشت و اتیل استات با درپوش بسته و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند. فاز آلی از فاز مایع به کمک فیلترهای سیلیکونی جدا شد و اتیل استات در دستگاه روتاری به‌طور کامل تبخیر شد. باقیمانده در 1 میلی‌لیتر متانل مخصوص HPLC حل شد. ردیابی و اندازه‌گیری کمی آنتی‌بیوتیک‌ها با دستگاه HPLC با تزریق 10 میکرولیتر نمونه انجام شد و در نهایت، آنتی‌بیوتیک‌های DAPG و Plt در طول موج‌های 270 و 330 نانومتر ردیابی شدند.

بررسی روابط فیلوژنتیکی PGU0 با سایر سودوموناس‌های

بیوکنترل براساس توالی 16S rDNA

آماده‌سازی و استخراج DNA جدایه مطابق روش Wang *et al.* (2001) انجام شد. به‌منظور تکثیر ژن در جدایه از

آغازگر مستقیم

PS16f (TGGCTCAGATTGAACGCTGGCGG)

و آغازگر معکوس

PS16r (GTACCAGCCGCAGGTTCCCCTAC)

استفاده شد که ناحیه 16S rRNA را تکثیر می‌کند (Frapolli *et al.* 2007).

واکنش PCR طبق روش Frapolli *et al.* (2007)

انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز $1/5$ درصد بارگذاری شد و سپس، در دستگاه مستندساز ژل بررسی شد. باند صحیح با اسکالپل استریل به‌دقت بریده شد.

GG) و آغازگر معکوس PM7-26R (CCG CTCT TGA TCT G CAA TTG CAG GCC) (Svercel *et al.* 2007)، ساخت شرکت سیناژن، استفاده شد. این آغازگرها قطعه‌ای به طول 570 جفت باز را تکثیر می‌کنند. استخراج DNA باکتری‌ها با روش Wang *et al.* (2001) بود. واکنش PCR در 20 میکرولیتر شامل 4 میکرولیتر DNA باکتری، بافر PCR (1xPCR buffer)، $1/5$ میکرومول MgCl_2 ، 250 میکرومول dNTP s، $0/4$ میکرومول از هر آغازگر و 1 واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بود. عمل تکثیر با دستگاه ترموسایکلر Mastercycler gradient، ساخت شرکت اپندورف آلمان، انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه 94°C به مدت 120 ثانیه و سپس، یک برنامه 30 چرخه‌ای با هر چرخه شامل 30 ثانیه در 94°C ؛ 30 ثانیه در 67°C ؛ 60 ثانیه در 72°C ؛ در پایان یک چرخه 72°C برای 5 دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز 1 درصد در 75 ولت به مدت 1 ساعت الکتروفورز شد؛ نتایج با استفاده از دستگاه مستندساز ژل، مدل EV243 ساخت شرکت Consort بلژیک، بررسی شد. دو جدایه CAH0 به‌عنوان شاهد مثبت و موتانت *gac* آن (CHA89) به‌عنوان شاهد منفی استفاده شدند.

ردیابی ژن *phlD* (ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز DAPG)

واکنش زنجیره‌ای مطابق روش بالا انجام شد با این تفاوت که تکثیر با استفاده از آغازگر مستقیم B2BF (ACCCACCGCAGCATCGTTTATGAGC) و آغازگر BPR4 (CCGCCGTATGGAAGATGAAAAAGTC) (Mc Spadden- Gardener *et al.* 2001) انجام شد. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه 94°C به مدت 120 ثانیه و سپس، یک برنامه 30 چرخه‌ای با هر چرخه شامل 30 ثانیه در 94°C ؛ 30 ثانیه در 60°C ؛ 60 ثانیه در 72°C ؛ در پایان یک چرخه 72°C برای 10 دقیقه بود.

ردیابی ژن *pltB* (ژن کلیدی دخیل در بیوسنتز Plt)

شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مانند بالا و با آغازگر مستقیم PltBf (CGGAGCATGGACCCCCAGC) و معکوس PltBr (GTGCCCGATATTGGTCTTGACC) انجام شد که یک قطعه 773 جفت باز از ژن *pltB* را تکثیر می‌کند (Mavrodi *et al.* 2001). برنامه حرارتی PCR

و سیدروفور را تولید کند که احتمالاً در توانایی بیوکنترل این استرین نقش دارند. از طرف دیگر توانایی محلول‌سازی فسفات معدنی و تولید سیدروفور توسط این جدایه ممکن است در افزایش رشد گیاه نقش مؤثری را ایفا کند.

جدول ۱. خصوصیات فنوتیپی و توانایی بیوکنترل جدایه PGU0 در شرایط درون‌شیشه‌ای

۷/۶ a	هاله بازدارندگی روی محیط KB (mm)
۵/۲b	هاله بازدارندگی روی محیط PDA (mm)
۲	
خصوصیات فنوتیپی	
۱۶	میزان تولید DAPG ($\mu\text{g/ml}$) روی KBG
۰	میزان تولید DAPG ($\mu\text{g/ml}$) روی KB
۱۶	میزان تولید PLT ($\mu\text{g/ml}$) روی KBG
۱۱۸	میزان تولید PLT ($\mu\text{g/ml}$) روی KB
۵۳/۴۸	میزان تولید MAPG ($\mu\text{g/ml}$) روی KBG
۰	میزان تولید MAPG ($\mu\text{g/ml}$) روی KB
+	تولید سیدروفور روی محیط S ₁
۲۵/۴۵	میزان تولید سیدروفور ($\mu\text{M/ml}$)
+	تولید سیانید هیدروژن (HCN)
۱۵/۳۳	انحلال فسفات معدنی (قطر هاله شفاف بر حسب mm)

جدول ۲. مقایسه میانگین تأثیر جدایه PGU0 *P. fluorescens* بر کنترل بیماری و وزن تر گیاه در شرایط اتافک رشد

تیمار	وزن خشک گیاه (گرم)	شدت بیماری (۹-۰)
شاهد سالم	۲/۳۹a	۰c
شاهد آلوده	۰/۳۸۴c	۸/۵۶a
PGU0	۲/۳۱a	۰c
PGU0+ <i>R. solani</i>	۱/۹۳b	۴/۱B

* میانگین‌هایی که حروف مشترک دارند، اختلاف معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ آزمون LSD ندارند.

سودوموناس‌های بیوکنترل، اختصاصی یک بیمارگر یا یک گونه گیاهی ویژه نیستند؛ بلکه دارای دامنه میزبانی وسیعی هستند و بیمارگرهای مختلفی را کنترل می‌کنند (Thomashow and Weller 1996, Weller *et al.* 2002). *de La Fuente et al.* (2004) نیز توانایی بیوکنترل UP61 جداسازی‌شده از شبدر را علیه *R. solani* و *Sclerotium rolfsii* روی گوجه‌فرنگی مطالعه کردند و فهمیدند که این جدایه می‌تواند

برای آماده‌سازی و خالص‌سازی محصولات حاصل از تکثیر، از کیت Wisard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit of Promega (Madison, WI) استفاده شد. تعیین توالی را شرکت Metabion آلمان انجام داد. سپس، توالی به‌دست‌آمده با توالی‌های 16S rRNA ثبت‌شده در NCBI انطباق داده شد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار (6.7) CLC main workbench از روش حداکثر درست‌نمایی رسم شد.

نتایج و بحث

PGU0 *P. fluorescens*، استرین جداسازی‌شده از ریزوسفر آفتابگردان دارای توانایی آنتاگونیستی علیه مرگ گیاهچه لوبیا در شرایط درون‌شیشه‌ای بود. آنتاگونیسم علیه بیمارگر با اندکی تفاوت روی دو محیط KB و PDA مشاهده شد. مقایسه میانگین نشان داد که میزان بازدارندگی از رشد قارچ روی دو محیط در سطح ۵ درصد آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار با یکدیگر تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۱). محققان دیگر نیز سطح بازدارندگی از بیمارگر را روی محیط کشت‌های KB، PDA و مالت آگار (MA) متفاوت گزارش و اظهار کردند که این تفاوت ممکن است به دلیل تولید ضعیف عوامل ضد قارچی یا بکتری یا رشد بهتر قارچ روی محیط PDA باشد (Sharifi-Tehrani *et al.* 1998, de La Fuente *et al.* 2004).

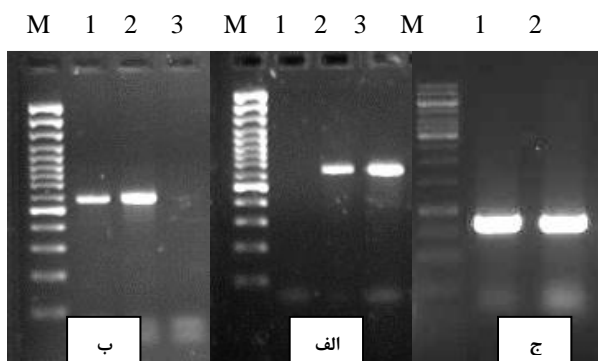
جدایه PGU0، در شرایط اتافک رشد نیز موجب کاهش معنی‌دار پوسیدگی ریشه لوبیا و افزایش قابل ملاحظه فاکتورهای رشدی نسبت به شاهد شد. شدت بیماری گیاهچه‌های لوبیای آلوده به بیمارگر به ارزش ۸/۵۶ بود. با تلقیح گیاهچه‌های لوبیا با بکتری PGU0 *P. fluorescens* شدت بیماری به‌طور معنی‌داری (۵۲/۱ درصد) کاهش یافت ($P \leq 0/05$) (جدول ۲).

از طرف دیگر بیمارگر میزان وزن تر گیاهچه‌های لوبیا را نسبت به شاهد کاهش داد، ولی در حضور بکتری، میزان رشد گیاهچه‌های بیمار نسبت به شاهد آلوده ۸۰ درصد افزایش یافت. میزان افزایش رشد گیاهچه‌های لوبیا در حضور بکتری به تنهایی با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این جدایه می‌تواند انواع متابولیت‌های ضد میکروبی (DAPG، Plt و HCN)

ژن‌های بیوسنتزی دخیل در تولید آنتی‌بیوتیک HCN و DAPG

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با هدف ردیابی ژن‌های کلیدی دخیل در بیوسنتز آنتی‌بیوتیک Plt، DAPG و HCN (به ترتیب *phlD*، *pltB* و *hcnAB*) در جدایه PGU0 انجام شد. ژن‌های دخیل در بیوسنتز DAPG در استرین مذکور تشخیص داده شدند و قطعه DNA به طول تقریبی ۶۲۹ جفت باز، به کمک دو پرایمر *phlD*- اختصاصی B2BF و BPR4 از دسته ژنی *phlACBD* روی ژل آگارز تکثیر شد (شکل ۱-ب). همچنین، به کمک دو پرایمر PM7 و PM26-R از دسته ژنی مسئول بیوسنتز سیانید هیدروژن (*hcnABC*) تکثیر شد (شکل ۱-الف). از طرف دیگر پرایمرهای *pltBf/pltBr* قطعه DNA به طول تقریبی ۷۷۳ از دسته ژنی بیوسنتز پایولوتورین را تکثیر کردند (شکل ۱-ج).

بیمارگرها را در شرایط گلخانه کنترل کند. مطالعه‌های انجام شده با استرین CHA0 نیز نشان‌دهنده اختصاصی نبودن این استرین بود (Voisard *et al.* 1994). همچنین، ترکیبات متفاوت ترشحات ریشه می‌تواند بر بیان ژن‌های بیوکنترل و تولید متابولیت‌ها توسط ریزوباکتری‌ها مؤثر باشد؛ مثلاً کراس و لوبر بیان متفاوت ژن‌های *plt* در *P. fluorescens* Pf-5 در بذره‌های خیار و پنبه را گزارش کردند (Kraus and Loper 1995). Jamali *et al.* (2009b) نیز تأثیر ارقام لوبیا را بر بیان ژن‌های بیوکنترل نظیر *hcnA* و *phlA* در استرین CHA0 با تکنیک ژن‌های گزارشگر، بررسی کردند و فهمیدند که بیان این ژن‌ها در ریزوسفر این ارقام متفاوت است که احتمالاً این مسئله می‌تواند به دلیل تفاوت در ترکیب ترشحات ریشه ارقام باشد.



شکل ۱. الف) تصویر الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد از PCR انجام شده روی ژن HCN با پرایمر اختصاصی (۵۷۰ bp). M: بیانگر DNA 100bp، ۱: باکتری PGU0، ۲: باکتری CHA0 به عنوان کنترل مثبت، ۳: باکتری CHA89 به عنوان کنترل منفی؛ ب) تصویر الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد از PCR انجام شده روی ژن DAPG با پرایمر اختصاصی (629 bp). M: بیانگر DNA 100 bp، ۱: باکتری CHA89 به عنوان شاهد منفی، ۲: باکتری PGU0، ۳: باکتری CHA0 به عنوان شاهد مثبت؛ ج) تصویر الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد از PCR انجام شده روی ژن PLT با پرایمر اختصاصی (773 bp). M: بیانگر DNA 1Kb، ۱: باکتری PGU0، ۲: باکتری CHA0 به عنوان شاهد مثبت

با استفاده از پرایمرهای *Phl2b/Phl2a* مرتبط با وجود مولدین DAPG در خاک‌های طبیعی، دریافته‌اند که حدود ۱۰ درصد از *Pseudomonas* فلورسنت ریزوسفر گندم در خاک‌های بازدارنده (Raaijmakers *et al.* 1997) و ریزوسفر ذرت (Picard *et al.* 2000) واجد این ژن‌ها هستند. تاکنون، مولدین DAPG در خاک‌های آفریقا، آسیا، استرالیا، اروپا و آمریکای شمالی یافت شده‌اند (Keel *et al.* 1996). این باکتری‌ها از ریزوسفر گیاهان مختلف نظیر

McSpadden Gardener *et al.* (2001) با طراحی جفت پرایمرهای اختصاصی و با پیشنهاد سنجشی مبتنی بر PCR، توانستند سودوموناس‌های *phlD*⁺ را هدف قرار دهند. پرایمرهای BPR4 و B2BF که ۶۲۹ جفت باز از ژن *phlD* را تکثیر می‌کنند، نسبت به پرایمرهای *Phl2a/Phl2b*، بسیار اختصاصی‌اند و ژن هدف را در مجموعه‌ای از مولدین DAPG تکثیر می‌کنند که از نظر ژنتیکی متنوع هستند.

گلیسرول، تولید Plt را تحریک می‌کند (Jamali 2009b). مشاهدات ما با نتایج Maurhofer *et al.* (1994) نیز هماهنگ است. همچنین، آنان گزارش کردند که سطوح DAPG به‌طور معکوس با غلظت Plt مرتبط است و موتانت‌های *plt⁻* در استرین CHA0 مقادیر بیشتری DAPG و MAPG تولید می‌کنند.

ترشحات ریشه حاوی دامنه وسیعی از ترکیبات آلی است (Brnizri *et al.* 1998) و تغییر و مصرف این ترکیبات تأثیری اساسی بر تولید متابولیت‌های ثانویه باکتریایی دارد. تفاوت در ترکیبات قندی ترشحات ریشه می‌تواند مکانیسم غالب بیوکنترل در سیستم‌های بیمارگر - میزبان را تعیین کند (Maurhofer *et al.* 1994). همچنین، بیان ژن‌های مسئول بیوسنتز Plt در *P. fluorescens* Pf-5 روی بذور خیار و پنبه متفاوت گزارش شده است (Kraus and Loper 1995). Jamali *et al.* (2009b) نیز اثر ارقام مختلف لوبیا بر بیان ژن‌های *phlA* و *hcnA* در استرین CHA0 توسط ژن‌های گزارشگر را بررسی کردند و فهمیدند که ترکیبات مختلف ترشحات ریشه موجب بیان متغیر بیان ژن‌های بیوکنترل می‌شوند.

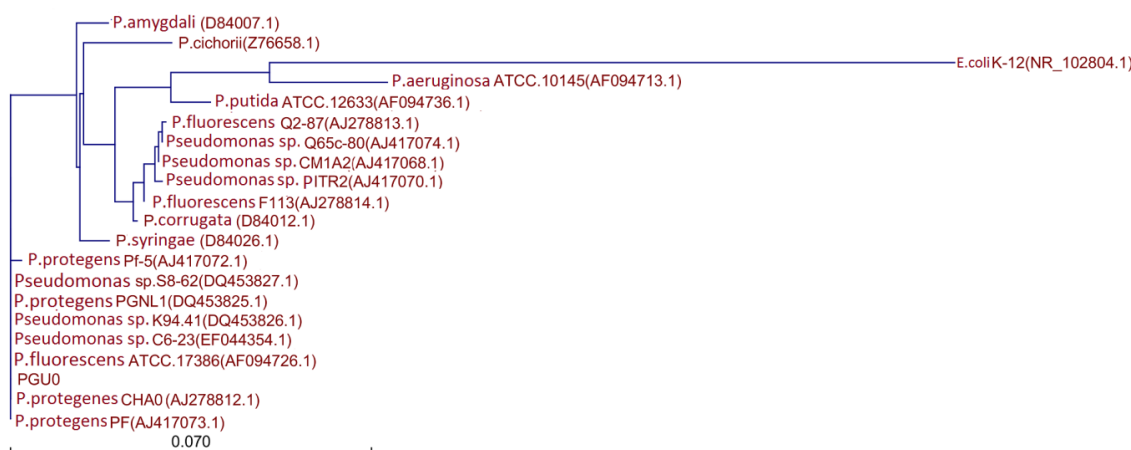
مقایسه فیلوژنتیکی PGU0 با سودوموناس‌های فلورسنت مولد آنتی‌بیوتیک
با استفاده از پرایمرهای PS16f و PS16r، یک قطعه ۱۳۰۱ جفت بازی از 16S rDNA در جدایه PGU0 تکثیر شد. این توالی به همراه ۲۱ توالی مربوط به این گروه از باکتری‌ها که از بانک ژن اخذ شده بودند، ارزیابی فیلوژنتیکی شدند. طول توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA در بین جدایه‌های مورد بررسی از بانک ژن بین ۱۴۴۰-۱۵۳۴ نوکلئوتید متغیر بود. مطالعات فیلوژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی روشن کرد که این جدایه با ۹۸ درصد حمایت بوت استرپ با *P. fluorescens* استرین‌های ATCC، Pf-5، PGNL1، CHA0، C6-23، PF، 17368، S8-62 و K94.41 در یک کلاد قرار گرفتند (شکل ۲). با توجه به اینکه تمامی باکتری‌های این کلاد جزء گروه 1 ARDRA هستند و با توجه به خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های ایرانی به نظر می‌رسد که این جدایه نیز به گروه 1 ARDRA متعلق باشد.

گندم (Raaijmakers *et al.* 1997)، خیار و گوجه‌فرنگی (Keel *et al.* 1996) گزارش شده‌اند. در ایران وجود ژن‌های *phlD* و *hcnAB* (ژن‌های کلیدی بیوسنتز DAPG و HCN) و نیز تولید متابولیت‌های مرتبط با این ژن‌ها، در برخی سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی شده از میزبان‌های مختلف نظیر خیار، آفتابگردان و گندم پیش از این نیز به اثبات رسیده است (Ahmadadeh 2001، Behbodi 2004، Jamali 2009). اما در مورد ردیابی ژن *pltB* تاکنون، تحقیقی روی جدایه‌های ایرانی انجام نشده بود. طبق نظر دانشمندان، ژن *pltB* ردیابی شده با PCR. برای تولید پایولوتورین در *P. fluorescens* Pf-5 یک ژن کلیدی به‌شمار می‌رود (Nowak-Thompson *et al.* 1999). ولی هنوز مشخص نیست که آیا این ژن نیز در طبیعت حفظ شده است یا خیر.

خصوصیات فنوتیپی جدایه PGU0

نتایج آنالیز HPLC نشان داد که این جدایه در محیط KBG و KB پس از ۷۲ ساعت، می‌تواند آنتی‌بیوتیک‌های DAPG، PLT و MAPG (پیش‌ماده آنتی‌بیوتیک DAPG) را تولید کند (جدول ۱). پیک‌ها و نیز زمان بازدارندگی ترکیبات تولیدشده توسط این استرین مشابه با استانداردهای مورد استفاده بود. زمان بازدارندگی برای آنتی‌بیوتیک‌های DAPG، PLT و MAPG به ترتیب ۸/۷، ۱/۸ و ۷/۴ دقیقه بود. محیط‌های KB و KBG به ترتیب تولید آنتی‌بیوتیک‌های Plt و DAPG را در استرین PGU0 تحریک کردند و میزان تولید این آنتی‌بیوتیک‌ها روی این دو محیط با یکدیگر متفاوت بود. مطالعات در مورد تأثیر محیط کشت بر تولید آنتی‌بیوتیک توسط *Pseudomonas* spp. فلورسنت نشان داده است که گلوکز تولید DAPG توسط CHA0 را تحریک می‌کند؛ در حالی که، از تولید پایولوتورین و پیروولنیتین ممانعت می‌کند (Duffy and Défago 1999). منبع کربنی در محیط KBG، گلوکز و در KB گلیسرول است؛ بنابراین، مشاهدات این محققان می‌تواند نتایج به‌دست‌آمده توسط این تحقیق را توجیه کند. تحقیقی که پیش از این بر سه جدایه ایرانی *P. fluorescens* اجرا شده بود، نیز مشخص کرد که گلوکز، تولید DAPG و

(Spadden Gardener *et al.* 2000, Mavrodi *et al.* 2001). Landa *et al.* (2002) این طبقه‌بندی را تا ۱۷ ژنوتیپ مشخص گسترش دادند. نتایج آنالیز ژنتیکی شباهت بالای PGU0 با سایر استرین‌های ARDRA1 مولد DAPG و Plt را نشان داد؛ در حالی که، منشأ این استرین‌ها کاملاً نامشابه بود: CHA0 از توتون در سوئیس و Pf-5 از پنبه در ایالات متحده جداسازی شده بود.



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی باکتری *P. fluorescens* جدایه PGU0 براساس توالی 16S rRNA با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی با برخی از جدایه‌های ثبت‌شده در NCBI

مشترک تولید آنتی‌بیوتیک می‌کنند و از نظر ژنتیکی بسیار مشابهند، این سؤال را مطرح می‌کند که آیا چنین استرین‌هایی می‌توانند در مکان‌هایی غیر از محل جمع‌آوری خود نیز مؤثر باشند و آیا سازگاری‌های فیزیولوژیکی خاصی برای یک محصول یا منطقه خاص ضرورت دارد یا خیر. اگر چنین باشد استفاده از پروب‌های ژنتیکی نظیر تولید DAPG شناسایی عوامل بیوکنترل مؤثر را تسهیل می‌کند. با توجه به اینکه مولدین DAPG به فراوانی از خاک‌های بازدارنده جدا می‌شوند، می‌توان نتیجه گرفت که این استرین‌ها بخش مهمی از سودوموناس‌های مرتبط با ریشه گیاه را شامل می‌شوند و نقش مهمی را در بیوکنترل در چنین خاک‌هایی ایفا می‌کنند.

Keel *et al.* (1996) با مطالعه ۴۵ استرین جداسازی‌شده از کشورهای مختلف دو کلاستر متفاوت را در میان مولدین DAPG توصیف کردند که با توانایی تولید Plt از یکدیگر متمایز می‌شوند. محققان دیگر با روش‌هایی نظیر rep-PCR، ARDRA، *phlD* RFLP و RAPD، ۱۴ ژنوتیپ را در میان ۱۲۳ استرین مولد DAPG گزارش کردند که به خاک‌های مختلفی متعلق بودند (Mc

انتخاب جدایه PGU0 براساس توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و خصوصیت آنتاگونیستی این استرین علیه *R. solani* بود و در ابتدای این تحقیق الگوهای ژنتیکی مد نظر قرار نگرفته بودند. با این حال نتایج این تحقیق، این حدس را برمی‌انگیزد که امکان استفاده از مقایسه‌های ژنتیکی برای پیش‌بینی فعالیت گسترده استرین‌های بیوکنترل وجود دارد.

استرین‌های دارای ژن *phlD* تنوع فنوتیپی چشمگیری دارند. تشابه مولدین DAPG از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی با منشأ جغرافیایی این استرین‌ها مرتبط نیست و استرین‌های بسیار مشابه می‌توانند از مناطق مختلف جمع‌آوری شده باشند. این یافته که استرین‌های *Pseudomonas* با منشأ جغرافیایی متفاوت به‌طور

REFERENCES

- Ahmadzadeh M (2001) Influence of antagonistic rhizobacteria of *Pseudomonas* and *Bacillus* genus against seed rot and damping-off diseases of beans and studying their antagonistic mechanisms. Ph.D. thesis in Plant pathology, College of Agriculture, Tehran University. (in Persian)
- Alstrom S (1989) Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and Soil* 102: 3-9.

- Behboudi K** (2004) Influence of fluorescent pseudomonads on *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor* and their tolerance to 2,4-diacetylphloroglucinol gene expression in sunflower rhizosphere. Ph.D. thesis in Plant Pathology, College of Agriculture, Tehran University. (in Persian)
- Benizri E, Courtade A, Picard C, Guckert A** (1998) Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1481-1484.
- Bonsall RF, Weller DM, Thomashow LS** (1997) Quantification of 2,4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. in vitro and in the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology* 63: 951-955
- Bowden K, Broadbent JL, Ross WJ** (1965) Some simple anthelmintics. *British Journal of Pharmacology* 24: 714-724.
- Castaneda GC, Munoz TJJ, Videia JRP** (2005) A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Microchemical Journal* 81: 35-40.
- Cronin D, Moëne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, O'Gara F** (1997). Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied Environmental Microbiology* 63: 1357-1361.
- De La Fuente L, Thomashow L, Weller D, Bajsa N, Quagliotto L, Chernin L, Arias A** (2004) *Pseudomonas fluorescens* UP61 isolated from birdsfoot trefoil rhizosphere produces multiple antibiotics and exerts a broad spectrum of biocontrol activity. *European Journal of Plant Pathology* 110:671-681.
- Duffy BK, Défago G** (1999) Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied Environmental Microbiology* 65(6): 2429-2438.
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F** (1992) Exploitation of gene(s) in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied Environmental Microbiology* 58: 3873-3878.
- Frapolli M, Défago G, Moëne-Loccoz M** (2007) Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2,4-diacetylphloroglucinol. *Environmental Microbiology* 9: 1939-1955.
- Gould WD, Hagedron C, Bradinelli TR, Zablatowics RM** (1985) New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Applied Environmental Microbiology* 49: 28-32.
- Haas D, Défago G** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3: 307-319.
- Handelsman J, Stabb EV** (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *Plant Cell* 8: 1855-1869.
- Jamali F** (2009a) Influence of some biotic factors on the expression of hydrogen cyanide- and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis genes in *Pseudomonas fluorescens* on bean rhizosphere, Ph. D. thesis in Plant pathology, College of Agriculture, Tehran University. (in Persian)
- Jamali F, Sharifi-Tehrani A, Lutz MP, Maurhofer M** (2009b) Influence of host plant genotype, presence of a pathogen, and coinoculation with *Pseudomonas fluorescens* strains on the expression of hydrogen cyanide and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic genes in *P. fluorescens* strain CHA0. *Microbial Ecology* 57(2): 267-275.
- Keel C, Schnider U, Maurhofer M, Voisard C, Laville J, Burger U, Wirthner P, Haas D, Défago G** (1992) Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 5: 4-13.
- Keel C, Weller DM, Natsch A, Défago G, Cook RJ, Thomashow LS** (1996) Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied Environmental Microbiology* 62: 552-563.
- King EO, Ward MK, Rainey DE** (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44: 301-307.
- Klopper JW, Tuzun S, Liu L, Wei G** (1993) Plant growth promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. In: Lumsden RD, Vaughn JL (eds), *Pest Management: Biologically Based Technologies*, American Chemical Society Books, Washington, DC, USA. pp. 156-165.
- Kraus J, Loper JE** (1995) Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied Environmental Microbiology* 61: 849-854.
- Landa BB, Mavrodi DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS, Weller DM** (2002) Differential ability of genotypes of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* strains to colonize the roots of pea plants. *Applied Environmental Microbiology* 68: 3226-3237.

- Maurhofer M, Keel C, Défago G** (1995) Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology* 44: 40-50.
- Maurhofer M, Keel C, Haas D, Défago G** (1994) Pyoluteorin production by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 is involved in the suppression of *Pythium* damping-off of cress, but not cucumber. *European Journal of Plant Pathology* 100: 221-232.
- Mavrodi OV, McSpadden Gardener BB, Mavrodi DV, Bonsall RF, Weller DM, Thomashow L S** (2001) Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 91: 35-43.
- Mc Spadden Gardener BB, Mavrodi DV, Thomashow LS, Weller DM** (2001) A rapid polymerase chain reaction-based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria. *Phytopathology* 91: 44-54.
- Mc Spadden Gardener BB, Schroeder KL, Kalloger SE** (2000) Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology* 66: 1939-1946.
- Nowak-Thompson B, Chaney N, Wing JS, Gould SJ, Loper JE** (1999) Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology* 181: 2166-2174.
- Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS** (1997) Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Applied Environmental Microbiology* 63: 881-887.
- Sharifi-Tehrani A, Zala M, Natsch A, Moënné-Loccoz Y, Défago G** (1998). Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 104: 631-643.
- Siddiqui, I. A., and Shaikat, S. S.** 2002. Resistance against the damping-off fungus *Rhizoctonia solani* systemically induced by the plant-growth-promoting rhizobacteria *Pseudomonas aeruginosa* (IE-6S⁺) and *P. fluorescens* (CHA0). *Journal of Phytopathology.* 150: 550-506.
- Sperber JI** (1958) The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 9: 778-781.
- Svercel M, Duffy B, Défago G** (2007) PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnAB* in *Pseudomonas* spp. *Journal of Microbiological Methods* 70: 209-213.
- Thomashow LS, Weller DM** (1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological control: mechanisms and antifungal metabolites, *In: Stacey G, Keen NT* (eds.), *Plant-Microbe Interactions*, Vol. 1. Chapman and Hall, New York. pp. 187-235.
- Voisard C, Bull CT, Keel C, Laville J, Maurhofer M, Schnider U, De fago G, Haas, D** (1994) Biocontrol of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Current concepts and experimental approaches. *In: O'Gara F, Dowling DN, Boesten B* (eds), *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMOs*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany. pp. 67-89.
- Wang C, Ramette A, Pungasamarnwong P, Zala M, Natsch A, Moënné-Loccoz Y, Défago G** (2001) Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiology Ecology* 37: 105-116.
- Weller DM** (2007) *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97: 250-256.
- Weller DM, Raaijmakers JM, McSpadden Gardener BB, Thomashow LS** (2002) Microbial populations responsible for specific suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of. Phytopathology* 40: 309-348.