کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۷، شمارهٔ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۷ (۹۲-۸۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2019.273278.255

اثر *Bacillus methylotrophicus* در کنترل *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* و بیان برخی ژن‌های دفاعی خربزه

جواد ابخو[1] و احمد مهربان[2*]
۱. مربی، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران،
۲. استادیار، گروه کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد زاهدان، زاهدان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۱- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۰)

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی اثر *Bacillus methylotrophicus* در کنترل قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* و بیان برخی ژن‌های دفاعی خربزه انجام شد. این آزمایش به دو روش آغشته‌سازی خاک با *B. methylotrophicus* و آغشته‌سازی بذر با آن در شرایط گلخانه انجام شد. همچنین بیان ژن‌های *galactinol synthase 2* (*GAL2*)، *β-1,3- glucanas 2* (*βGlu2*)، *catalase* (*CAT*) و *chitinase* (*Chi*) با تکنیک Real-time PCR ارزیابی شد. گیاهان تیمار شده با *B. methylotrophicus* از نظر شدت بیماری اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند. شدت بیماری در روش آغشته‌سازی خاک با *B. methylotrophicus* نسبت به روش آغشته‌سازی بذر به‌طور معنی‌داری کمتر بود. میزان بیان ژن‌های *GAL2*، *βGlu2* ، *CAT* و *Chi* به‌طور معنی‌داری توسط *B. methylotrophicus* افزایش یافت. نتایج این تحقیق نشان داد که *B. methylotrophicus* در کنترل بیماری پژمردگی ناشی از قارچ *F. o.* f. sp. *melonis* و افزایش بیان ژن‌های دفاعی در گیاه خربزه موثر است. همچنین نتایج ما پیشنهاد می‌کند که *B. methylotrophicus* احتمالاً از طریق القای ژن‌های دفاعی باعث افزایش مقاومت خربزه در مقابل *F. o.* f. sp. *melonis* می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus methylotrophicus*، *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*، کنترل بیولوژیک، *chitinase*

Effect of *Bacillus methylotrophicus* on control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and expression of some defense-related genes in melon plant

Javad Abkhoo[1] and Ahmad Mehraban[2]*
1. Instructor, Agricultural Research Institute,University of Zabol, Iran
2. Assistant Professor, Department of Agronomy, Islamic Azad University, Zahedan Branch, Zahedan, Iran
(Received: January 1, 2019 - Accepted: March 11, 2019)

ABSTRACT

In this study, we investigated the effect of *Bacillus methylotrophicus* on control of *Fusarium* wilt disease of melon caused by *F. oxysporum* f. sp. *melonis* and the expression of some defense-related genes in melon. This experiment was carried out using two methods of soil treatment and seed treatment with *B. methylotrophicus* under greenhouse conditions. Furthermore, the expression of *galactinol synthase 2* (*GAL2*), *β-1,3- glucanas 2* (*βGlu2*), *catalase* (*CAT*) and *chitinase* (*Chi*) was evaluated by real-time PCR (qRT-PCR) technique. Disease severity was significantly reduced in plants treated with *B. methylotrophicus* particularly in soil treatment method. The expression of *GAL2, βGlu2, CAT* and *Chi* genes was significantly increased by *B. methylotrophicus*. The results showed the biocontrol activity of *B. methylotrophicus* against *F. o.* f. sp. *melonis* and the subsequent increase in the expression of defense-related genes in melon plant. Furthermore, our results suggest that *B. methylotrophicus* enhances disease resistance in melon against *F. o.* f. sp. *melonis* probably through induction of defense-related genes.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus*, biological control, *chitinase*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*.

* Corresponding author E-mail: : amehraban2004@yahoo.com

تازه‌های تحقیق

گیاهان تیمار شده با *B. methylotrophicus* از نظر شدت علائم بیماری اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند. شدت بیماری در روش آغشته‌سازی خاک با *B. methylotrophicus* نسبت به‌روش آغشته سازی بذر کمتر بود. میزان بیان ژن‌های *GAL2*، *βGlu2*، *CAT* و *Chi* به‌طور معنی‌داری توسط *B. methylotrophicus* افزایش یافت. باکتری *B. methylotrophicus* در کنترل بیماری پژمردگی ناشی قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* و افزایش بیان ژن های دفاعی در گیاه خربزه موثر است.

مقدمه

خربزه یکی از مهمترین محصولات کشاورزی در منطقه سیستان می‌باشد و نقش مهمی در اقتصاد خانواده‌ها دارد. بیماری بوته‌میری یا پژمردگی خربزه ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* از جمله بیماری‌های مهم خربزه در منطقه سیستان است که سالیانه خسارت زیادی به این محصول در منطقه سیستان وارد می‌سازد و می-تواند یک عامل محدود کننده باشد (Safarnezhad 2004). بررسی نشان داده است که ژنوتیپ‌های خربزه منطقه به این بیمارگر حساس هستند (Abkhoo 2018). استفاده از سموم تدخینی و قارچکش‌های شیمیایی برای کنترل قارچ *F. o.* f. sp. *melonis* می‌تواند مفید باشد (Sherf and MacNab 1986) اما این سموم شیمیایی برای سلامت انسان و محیط زیست خطرناک هستند (Brimner and Boland 2003). قارچ‌کش‌های زیستی عوارض کمتری برای انسان و محیط‌زیست دارند، به همین دلیل استفاده از آن‌ها برای کنترل بیمارگرهای گیاهی خاکزاد در حال افزایش است (Bora *et al.* 2004, Ashrafizadeh *et al.* 2005, Norouzi *et al.* 2017). باکتری *Bacillus methylotrophicus* دارای توانایی کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی است و میزان وقوع بیماری پژمردگی ناشی از باکتری *Ralstonia solanacearum* را در گیاه گوجه فرنگی کاهش داده است (Almoneafy *et al.* 2012). بررسی‌ها نشان داده که باکتری *B. methylotrophicus* پژمردگی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* را در گیاه گوجه‌فرنگی (Neto *et al.* 2018)، پوسیدگی ساقه ناشی از قارچ *F. graminearum* در گیاه ذرت (Li *et al.* 2016) و کپک خاکستری ناشی از قارچ *Botrytis cinerea* را در گیاه گوجه-فرنگی (Ge *et al.* 2016) کاهش داده و همچنین بلاست برنج ناشی از قارچ *Magnaporthe oryzae* را کنترل کرده است (Shan *et al.* 2013). آنزیم‌های chitinase (Chi) و β-1,3- glucanas (*βGlu*) گیاهی به ترتیب chitin (Sahai and Manocha 1993) و β-1,3- glucan (Leubner-Metzger and Meins 1999, Doxey *et al.* 2007) دیواره سلولی قارچ‌های بیماریزای گیاهی را تجزیه می‌کنند و نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر بیمارگرها را بازی می‌کنند. آنزیم *galactinol synthase* (*GAL*)، با کاتالیز کردن انتقال یک galactosyl باقیمانده از UDP-galactose به myo-inositol، ترکیب galactinol را سنتز می‌کند (Peterbauer *et al.* 2001). نیشیزاوا و همکاران پیشنهاد کردند که احتمالاً galactinol با دفع رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل، گیاه را از تخریب اکسیداتیو ناشی از تنش‌های شوری و سرما محافظت می‌کند (Nishizawa *et al.* 2008). آنزیم کاتالاز (CAT) بوسیله تبدیل پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) به آب و اکسیژن، تنش اکسیداتیو را کاهش می‌دهد و نقش مهمی در دفاع گیاهان دارد (Scandalios *et al.* 1997, Liu *et al.* 2015, Nie *et al.* 2015). تحقیقات نشان داده است که میزان بیان ژن‌های cucumber galactinol synthase (*CsGolS1*)، *βGlu*، *CAT* و *Chi* در هنگام تیمار گیاه با عوامل آنتاگونیستی افزایش می‌یابد و بیان ژن *CsGolS1* در القای مقاومت در گیاه خیار نسبت به *Corynespora cassiicola* (Kim *et al.* 2008)، بیان ژن *Chi* در القای مقاومت در گیاه خیار نسبت به *Pythium aphanidermatum* (Sabbagh and

Valizadeh 2016) و بیان ژن *βGlu* در القای مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (Chandrasekaran *et al*. 2017) موثر است و افزایش بیان ژن‌های *βGlu*، *CAT* و *Chi* ممکن است در کاهش پوسیدگی میوه هلو ناشی از *Monilinia fructicola* نقش داشته باشد (Xu *et al*. 2008). بنابراین، هدف از این تحقیق، ارزیابی باکتری *B. methylotrophicus* در کنترل بیماری پژمردگی ناشی قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* در خربزه بود. همچنین مبانی مولکولی کنترل بیولوژیک بیماری نیز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش

جدایه‌های عامل بیماری و*B. methylotrophicus* مورد بررسی

در این بررسی از قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* که قبلاً از بوته‌های خربزه منطقه سیستان جدا شده و بیماریزایی آن به اثبات رسیده بود استفاده شد. در این آزمایش از باکتری *B. methylotrophicus* که از شرکت رویان تیسان سبز تهیه شده بود، استفاده گردید.

بررسی تاثیر *B. methylotrophicus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط گلخانه

هدف از این آزمایش بررسی میزان تاثیر *B. methylotrophicus* در کنترل و یا کاهش بیماری پژمردگی خربزه در اثر قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* در شرایط گلخانه بود. این آزمایش به دو روش زیر انجام شد (Ashrafizadeh *et al*. 2005):

۱- آغشته‌سازی خاک با *B. methylotrophicus*:

بذر خربزه رقم سفیدک خطدار برای کشت گیاه استفاده شد. بذرها پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت چهار دقیقه، سه بار توسط آب مقطر شسته شدند. مخلوط خاک شامل خاک مزرعه و ماسهٔ شسته‌شده به نسبت ۱:۱، دو بار به مدت یک ساعت سترون و به گلدان‌های به ارتفاع بیست سانتی‌متر و قطر دهانه بیست سانتی-متر منتقل شد. شش عدد بذر خربزه در گلدان‌هایی که شصت سی‌سی از سوسپانسیون ۲×۱۰^{۱۰}cfu/ml باکتری *B. methylotrophicus* به خاک آن‌ها اضافه شده بود، کاشته شدند. به خاک گلدان‌های گیاهان شاهد فقط شصت سی‌سی آب مقطر اضافه شد. سوسپانسیون اسپور قارچ با استفاده از روش ابریل و همکاران تهیه شد (Abril *et al*. 2008) و تعداد کنیدی در سی‌سی با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش و غلظت نهایی اسپور ۲×۱۰^{۶} کنیدی در سی‌سی تعیین گردید (Perchepied and Pitrat 2004). ریشه گیاهچه‌های هفت‌روزه به آرامی از خاک خارج و به مدت یک دقیقه در سوسپانسیون اسپور قارچ قرار گرفت و سپس گیاهچه‌ها مجدداً در گلدان‌ها کاشته شدند (Banihashemi 2010). گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سلسیوس با رطوبت نسبی هفتاد درصد قرار داده شدند و با آب مقطر بدون مواد مغذی آبیاری شدند.

۲- آغشته‌سازی بذر با *B. methylotrophicus*:

بذرهای خربزه رقم سفیدک خطدار پس از ضدعفونی سطحی به مدت دو ساعت در سوسپانسیون ۲×۱۰^{۱۰}cfu/ml باکتری *B. methylotrophicus* قرار گرفتند (Burgess and Hepworth 1996). بذرهای گیاهان شاهد به مدت دو ساعت در آب مقطر قرار داده شدند. مخلوط خاک شامل خاک مزرعه و ماسهٔ شسته شده به نسبت ۱:۱، دو بار به مدت یک ساعت سترون و به گلدان‌های به ارتفاع بیست سانتی‌متر و قطر دهانه بیست سانتی‌متر منتقل شد. در هر گلدان شش عدد بذر خربزه کاشته شد. سوسپانسیون اسپور قارچ با استفاده از روش ابریل و همکاران تهیه شد (Abril *et al*. 2008) و تعداد کنیدی در سی‌سی با استفاده از لام هموسایتومتر شمارش و غلظت نهایی اسپور

۲×۱۰^{۶} کنیدی در سی‌سی تعیین گردید (Perchepied and Pitrat 2004). ریشه گیاهچه‌های هفت‌روزه به آرامی از خاک خارج و به مدت یک دقیقه در سوسپانسیون اسپور قارچ قرار گرفت و سپس گیاهچه‌ها مجدداً در گلدان‌ها کاشته شدند (Banihashemi 2010). گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجـه سلسیوس با رطوبت نسبی هفتاد درصد قرار داده شدند و با آب مقطر بدون مواد مغذی آبیاری شدند. شدت بیماری سه هفته بعد از مایه‌زنی با قارچ با استفاده از شاخص پرچپید و پیترات مورد ارزیابی قرار گرفت (Perchepied and Pitrat 2004). این شاخص شامل پنج درجه، ۱ (بدون علائم)، ۲ (زردی لپه‌ها یا نخستین برگ حقیقی)، ۳ (زردی دو برگ حقیقی)، ۴ (زردی سه برگ حقیقی) و ۵ (گیاهچه میری) بود. برای هر تیمار سه تکرار و هجده بوته در نظر گرفته شد و این آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. شدت بیماری (Disease severity) طبق فرمول زیر محاسبه شد (Bora *et al.* 2004):

۱۰۰×[(بالاترین درجه در مقیاس × تعداد کل بوته‌ها)/ (فراوانی × درجه در مقیاس)مجموع]=شدت بیماری

همچنین درصد کاهش بیماری طبق فرمول زیر محاسبه شد (Moss *et al.* 2007):

۱۰۰×[شدت بیماری در شاهد/ (شدت بیماری در تیمار - شدت بیماری در شاهد)مجموع]= (٪) کاهش بیماری

بررسی اثر *B. methylotrophicus* بر بیان ژن‌های دفاعی خربزه

در این آزمایش ابتدا بذر خربزه رقم سفیدک خط‌دار پس از ضدعفونی سطحی در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک (شامل خاک مزرعه و ماسهٔ شسته شده با نسبت ۱:۱ و استریل شده دو بار به مدت یک ساعت) کاشته شد. ریشه گیاهچه‌های هفت‌روزه به آرامی از خاک خارج و در سوسپانسیون ۲×۱۰^{۱۰} cfu/ml باکتری *B. methylotrophicus* به مدت پنج دقیقه فرو برده شد (Akram *et al.* 2013) و سپس در سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت ۲×۱۰^{۶} کنیدی در سی‌سی قرار گرفت و گیاهچه‌ها مجدداً در گلدان‌ها کاشته شدند (Banihashemi 2010). در بوته‌های شاهد ریشه‌ها در آب مقطر به مدت پنج دقیقه فرو برده شد و سپس در سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت ۲×۱۰^{۶} کنیدی در سی‌سی قرار گرفت. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجـه سلسیوس با رطوبت نسبی هفتاد درصد قرار داده شدند. سپس به مدت سه روز متوالی و به فاصله یک روز نمونه‌برداری از برگ‌ها انجام شد. استخراج RNA از برگ‌ها توسط کیت شرکت TOPAZ GENE RESEARCH انجام شد. جهت سنتز رشته اول cDNA از کیت (First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas) استفاده شد.

در این تحقیق بیان چهار ژن *GAL2* با شماره دسترسی XM_008460096.2، *βGlu2* با شماره دسترسی NM_001328463.1 ، *CAT* با شماره دسترسی XM_008454734.1 و *Chi* با شماره دسترسی XM_008465639.2 ارزیابی شد. برای طراحی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق (جدول ۱) از نرم‌افزار Primer Express software v 3.0 (Applied Biosystems) استفاده شد. بررسی بیان ژن‌های مورد نظر به روش Real Time PCR انجام شد. دستگاه مورد استفاده Rotor-Gene 3000 (Corbett Robotics, Australia) بود. واکنش‌ها در حجم بیست میکرولیتر شامل چهار میکرولیتر EvaGreen® qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Riia, Estonia)، یک میکرولیتر آغازگر رفت (ده میکرومولار)، یک میکرولیتر آغازگر برگشت (ده میکرومولار) سیزده میکرولیتر آب و یک میکرولیتر از نمونه cDNA بود. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرش سازی اولیه ۱۵ دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس سپس چهل سیکل شامل بیست ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، بیست ثانیه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و سی ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. این آزمایش در سه تکرار زیستی و دو تکرار فنی و و بصورت فاکتوریل در قالب طرح

کاملاً تصادفی انجام شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR منحنی ذوب به منظور بررسی اختصاصیت واکنش PCR رسم گردید. ارزیابی کمّی میزان بیان ژن‌ها با استفاده از روش مقایسه چرخه آستانه (Cycle threshold) انجام شد. تغییرات نسبی بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن خانه‌دار *ADP ribosylation* (*ADP*) (Housekeeping gene) *factor 1* نرمال شد (Kong *et al*. 2014). محاسبه و تغییرات بیان ژن بوسیله نرم‌افزار Relative Expression Software Tool (REST 2009 v2.0.13) اندازه‌گیری شد (Pfaffl *et al*. 2002).

جدول۱- مشخصات آغازگرهای ژن‌های استفاده شده در این تحقیق

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used in the present study

Gene name	Forward primer 5-3	Reverse primer 5-3	Product size (bp)	Reference
GAL2	TCCCAACCTTGTTCATGGCTA	GGGAAGGCAGATATAAAACCAG	68	this study
βGlu2	TCTTAAACGGGACGTTGCGA	GGAATGACACTGGCTCCGTA	141	this study
CAT	GGCCAAGCATTTGAGGAGTG	CAGTCACACGAGAGAGATGC	139	this study
Chi	GACATGAACAAAAATCGAGGTCAA	GTGCTTTAACTTGTTCACTTATGC	165	this study
ADP	ATATTGCCAACAAGGCGTAGA	TGCCCGTAAACAAGGGATAAA	93	Kong *et al*. 2014

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس با استفاده از نرم‌افزار SPSS (v.20) و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD, least significant difference) در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

اثر *B. methylotrophicus* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط گلخانه

نتایج اثر *B. methylotrophicus* در کنترل بیماری خربزه آلوده با *F. o.* f.sp. *melonis* در جدول ۲ نشان داده شده است. گیاهان تیمار شده با *B. methylotrophicus* از نظر شدت بیماری اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند. شدت بیماری در روش آغشته‌سازی خاک با *B. methylotrophicus* نسبت به روش آغشته سازی بذر به‌طور معنی‌داری کمتر بود. درصد کاهش بیماری در روش آغشته‌سازی خاک با *B. methylotrophicus* و روش آغشته‌سازی بذر در مقایسه با شاهد به ترتیب ۷۷/۷۹٪ و ۶۸/۸۹٪ بود.

جدول ۲- تجزیهٔ واریانس اثر *Bacillus methylotrophicus* روی شدت بیماری و کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*، با آزمونLSD.

Table 2. Analysis of variance for the effects of *Bacillus methylotrophicus* on disease severity and reduction of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* by LSD test. *Fusarium* wilt disease in melon caused by

Treatment	Seed treatments		Soil treatments	
	Control (pathogen alone)	*B. methylotrophicus*+pathogen	Control (pathogen alone)	*B. methylotrophicus*+pathogen
Disease severity (%)	100.00a	31.11b	100.00a	22.21c
Disease reduction (%)	-	68.89	-	77.79

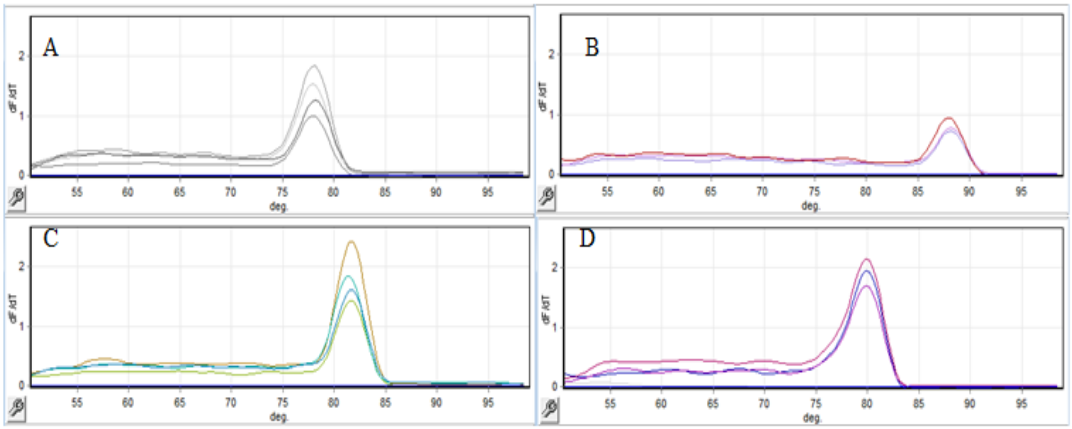
در هر ردیف حروف همسان اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

Means followed by the same letters in each row are not significantly different at the 5%.

بیان ژن‌های *GAL2*، *βGlu2*، *CAT* و *Chi* تحت تاثیر *B. methylotrophicus* با تکنیک Real-Time PCR

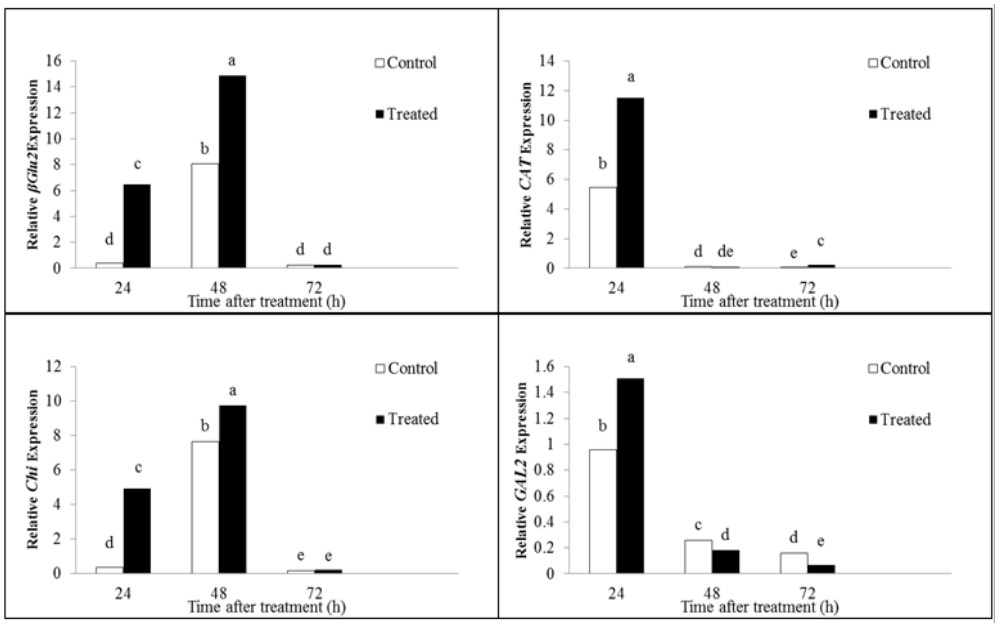
شرایط بهینه طوری فراهم شد که هیچ محصول غیر اختصاصی در طول واکنش تولید نشود که این امر با استفاده از منحنی ذوب (مشاهده یک پیک ذوب

منفرد) تائید شد (شکل ۲). نتایج بررسی میزان بیان ژن *βGlu2* در بوته‌های خربزه تیمارشده با *B. methylotrophicus* و تیمارنشده با *B. methylotrophicus* (شاهد) پس از مایه‌زنی با قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *βGlu2* در بوته‌های آلوده تیمارشده با *B. methylotrophicus* و شاهد در سطح ۵ درصد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار نشان داد. تیمار با *B. methylotrophicus* باعث افزایش بیان ژن *βGlu2* در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار شد که حداکثر بیان ژن *βGlu2* در ۴۸ ساعت پس از تیمار بود. نتایج بررسی میزان بیان ژن *CAT* در بوته‌های خربزه تیمارشده با *B. methylotrophicus* و غیرتیمار با *B. methylotrophicus* (شاهد) پس از مایه‌زنی با قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *CAT* در بوته‌های آلوده تیمارشده با *B. methylotrophicus* و شاهد در سطح پنج درصد در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نشان داد. تیمار با *B. methylotrophicus* باعث افزایش بیان ژن *CAT* در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار شد که حداکثر میزان بیان ژن *CAT* در ۲۴ ساعت پس از تیمار بود. نتایج بررسی میزان بیان ژن *Chi* در بوته‌های خربزه تیمارشده با *B. methylotrophicus* و تیمارنشده با *B. methylotrophicus* (شاهد) پس از مایه‌زنی با قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *Chi* در بوته‌های آلوده تیمارشده با *B. methylotrophicus* و شاهد در سطح ۵ درصد در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار نشان داد. تیمار با *B. methylotrophicus* باعث افزایش بیان ژن *Chi* در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار شد که حداکثر میزان بیان ژن *Chi* در ۴۸ ساعت پس از تیمار بود. نتایج بررسی میزان بیان ژن *GAL2* در بوته‌های خربزه تیمارشده با *B. methylotrophicus* و تیمارنشده با *B. methylotrophicus* (شاهد) پس از مایه‌زنی با قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* در شکل ۲ مشاهده می‌شود. نتایج اختلافات معنی‌داری را بین میزان بیان ژن *GAL2* در بوته‌های آلوده تیمارشده با *B. methylotrophicus* و شاهد در سطح پنج درصد در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار نشان داد. تیمار با *B. methylotrophicus* باعث افزایش بیان ژن *GAL2* در زمان ۲۴ ساعت پس از تیمار شد که حداکثر میزان بیان ژن *GAL2* در ۲۴ ساعت پس از تیمار بود.



شکل ۱- آنالیز منحنی ذوب برای ژن‌های (A) *galactinol synthase 2*، (B) *β-1,3- glucanas 2*، (C) *catalase* و (D) *chitinase*. هر یک از قله‌ها نماینگر دمای ذوب یک محصول PCR است.

Fig. 1. Analysis of the melting curve for *galactinol synthase 2* (A), *β-1,3- glucanas 2* (B), *catalase* (*C*) and *chitinase* (*D*) genes. Each peak represents the melting temperature of a PCR product.



شکل ۲- میزان بیان ژن‌های *galactinol synthase 2* (*GAL2*)، *β-1,3- glucanas 2 (βGlu2)*، *catalase* (*CAT*) و *chitinase* (*Chi*) در بوته‌های خربزه تیمارشده با *Bacillus methylotrophicus* و تیمارنشده با *B. methylotrophicus* (شاهد) پس از مایه‌زنی با قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. تغییرات نسبی بیان ژن‌های هدف نسبت به ژن *ADP ribosylation factor 1* نرمال شدند. میانگین‌های دارای حروف مشترک، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی‌داری با هم ندارند (P <0.05).

Fig. 2. The level of mRNA expression of *galactinol synthase 2* (*GAL2*), *β-1,3- glucanas 2* (*βGlu2*), *catalase* (*CAT*) and *chitinase* (*Chi*) in *Bacillus methylotrophicus*-treated and non-treated (control) melon plants after inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Each sample was normalized with *ADP ribosylation factor 1* as a housekeeping gene in melon. Means with different letters are significantly different according to the least significant difference (LSD) test (P < 0.05).

بحث

در این تحقیق، کنترل بیماری پژمردگی ناشی قارچ *F. o.* f. sp. *melonis* در گیاه خربزه با استفاده از باکتری *B. methylotrophicus* و تاثیر آن در ارتباط با افزایش بیان برخی ژن‌های دفاعی گیاه خربزه بررسی شد. طبق گزارشات متعدد، باکتری *B. methylotrophicus* دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی است. نتو و همکاران تاثیر تیمار بذر گوجه فرنگی با باکتری *B. methylotrophicus* در کنترل بیماری پژمردگی ناشی از قارچ *F. o.* f.sp. *lycopersici* در شرایط گلخانه‌ای بررسی کردند. این باکتری سبب ایجاد مقاومت سیستمیک القایی در گیاه گوجه‌فرنگی شد و بیماری پژمردگی فوزاریومی را تا ۷۵٪ کاهش داد که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد (Neto *et al.* 2018). مطالعات قبلی نشان داده است که باکتری *B. methylotrophicus* پوسیدگی ساقه ذرت ناشی از قارچ *F. graminearum* را به‌طور معنی‌داری در آزمایشات مزرعه‌ای کاهش داده (Li *et al.* 2016) و بلاست برنج ناشی از قارچ *M. oryzae* را تا ۸۹ درصد (Shan *et al.* 2013) و کپک خاکستری گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ *B. cinerea* را تا شصت درصد (Ge *et al.* 2016) در آزمایش گلخانه‌ای کنترل کرده است. همچنین این باکتری فعالیت آنتاگونیستی علیه *R. solanacearum* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از خود نشان داده، میزان وقوع بیماری پژمردگی ناشی از *R. solanacearum* را در گیاه گوجه‌فرنگی کاهش داده است (Almoneafy *et al.* 2012). روش آغشته‌سازی خاک با *B. subtilis* نسبت به روش آغشته‌سازی بذر

در کنترل بیماری‌های مختلف موثرتر بوده است (Szczech and Shoda 2006, Zhang *et al*. 2009). تعداد کل باکتری‌های *B. subtilis* RB14-C روی ریشه‌های گیاهان گوجه‌فرنگی که به روش آغشته-سازی بذر با *B. subtilis* تیمار شده بودند نسبت به ریشه‌های گیاهان گوجه‌فرنگی که به روش آغشته-سازی خاک تیمار شده بودند به‌طور معنی‌داری کمتر بود (Szczech and Shoda 2006). در این تحقیق براساس شدت علائم بیماری و زیست توده ریشه و اندام های هوایی روش آغشته‌سازی خاک با *B. methylotrophicus* نسبت به روش آغشته‌سازی بذر حفاظت بهتری را از گیاه خربزه در مقابل قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* فراهم کرد که احتمالاً به دلیل تفاوت در میزان کلنیزاسیون ریشه‌های خربزه توسط *B. methylotrophicus* در این دو روش می‌باشد. در این تحقیق *B. methylotrophicus* میزان بیان ژن‌های *GAL2*، *βGlu2*، *CAT* و *Chi* را در گیاه خربزه افزایش داد. پس از اینکه گیاه حضور بیمارگر را بوسیله گیرنده‌های تشخیص الگوی تشخیص داد سیستم ایمنی ذاتی گیاه فعال می‌شود (Boller and Felix 2009, Zipfel 2014). همچنین گیاه میکروب‌های مفید را در ابتدا به عنوان مهاجمان بالقوه شناسایی می‌کند و یک پاسخ ایمنی علیه آن-ها ایجاد می‌کند (Zamioudis and Pieterse 2012) و بنابراین، بیان ژن‌های دفاعی در این زمان‌ها اتفاق می‌افتد. مخمرهای آنتاگونیستی *Pichia membranaefaciens*، *Rhodotorula glutinis*، *Cryptococcus laurentii* و *Candida guilliermondii* آسیب اکسیداتیو را در میوه‌های هلو که در معرض قارچ *M. fructicola* بودند کاهش دادند و به‌طور معنی‌داری بیان ژن‌های *Chi*، *βGlu* و *CAT* در میوه هلو تحریک کردند. میزان بیان ژن-های *Chi* و *βGlu* در ۴۸ ساعت پس از تیمار افزایش و سپس کاهش یافت، اما میزان بیان ژن *CAT* در ۲۴ ساعت پس از تیمار افزایش و سپس کاهش یافت (Xu *et al*. 2008) که با نتایج این تحقیق مشابهت دارد. در میوه‌های شاهد بیان ژن *βGlu* در دو روز پس از مایه‌زنی با قارچ *M. fructicola* افزایش معنی‌داری داشت و سپس کاهش یافت که مشابه نتایج این تحقیق بود اما بیان ژن *CAT* از روز اول پس از مایه‌زنی با قارچ *M. fructicola* شروع به کاهش کرد و بیان ژن *Chi* پس از افزایش موقت در روز اول پس از مایه‌زنی با قارچ *M. fructicola*، به تدریج کاهش یافت (Xu *et al*. 2008). *Phytophthora capsici* با کاهش بیان برخی از ژن‌های دفاعی گیاه پاسخ‌های ایمنی آن را سرکوب می‌کند (Li *et al*. 2019) بنابراین در این تحقیق احتمالاً بیان ژن‌های دفاعی گیاه شاهد کاهش می-یابد تا پاسخ‌های ایمنی آن سرکوب شوند. کیم و همکاران گزارش کردند که تیمار گیاه خیار با *Pseudomonas chlororaphis* باعث ایجاد مقاومت سیستمیک در آن نسبت به *C. cassiicola* می‌شود و میزان بیان ژن *CsGolS1* در آن افزایش می‌یابد (Kim *et al*. 2008). همچنین بیان ژن *GolS* در بوته‌های خیار تیمارشده با عصاره *Ascophyllum nodosum* نسبت به بوته‌های شاهد افزایش یافت و باعث مقاومت گیاه خیار به *P. melonis* شد (Abkhoo and Sabbagh 2015). صباغ و ولی‌زاده نشان دادند که تیمار گیاه خیار با کودهای بیولوژیک نیتروکسین، قارچ‌ریشه (میکوریز) و ورمی‌کمپوست بیشترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *P. aphanidermatum* در گیاه خیار داشت و تیمار قارچ‌ریشه بیشترین تأثیر را در الگوی بیان ژن *Chi* دارد (Sabbagh and Valizadeh 2016). مقاومت سیستمیک القایی ناشی از *B. subtilis* CBR05 میزان بیان ژن *βGlu* را در گیاه گوجه‌فرنگی برضد *X. c. pv. vesicatoria* افزایش داد و حداکثر میزان بیان ژن *βGlu* در ۷۲ ساعت پس از تیمار بود (Chandrasekaran *et al*. 2017). به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که *B. methylotrophicus* دارای پتانسیل کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی ناشی از قارچ *F. o.* f.sp. *melonis* در خربزه است.

این توانایی باعث افزایش سطوح رونویسی ژن‌های *GAL2*، *βGlu2*، *CAT* و *Chi* در گیاه خربزه بود.

کاهش بیماری توسط تیمار با *B. methylotrophicus* احتمالاً به دلیل افزایش بیان ژن‌های دفاعی گیاه خربزه است. بنابراین پیشنهاد می‌شود باکتری *B. methylotrophicus* در مدیریت تلفیقی این بیماری در نظر گرفته شود تا میزان استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی به حداقل برسد.

REFERENCES

Abkhoo J (2018) Assessment of resistance in muskmelon genotypes to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* under greenhouse condition. *In*: The first international conference on modern researches in applied and engineering sciences, 8 March, Shanghhai, China. 1-5.

Abkhoo J, Sabbagh SK (2016) Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, and gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascophyllum nodosum*. Journal of Applied Phycology 28:1333–1342.

Abril M, Curry KJ, Smith BJ, Wedge DE (2008) Improved microassays used to test natural product based and conventional fungicides on plant pathogenic fungi. Plant Disease 92(1):106-112.

Akram W, Mahboob A, Javed AA (2013) *Bacillus thuringiensis* strain 199 can induce systemic resistance in tomato against *Fusarium* wilt. European Journal of Microbiology and Immunology 3(4):275-280.

Almoneafy AA, Xie GL, Tian WX, Xu LH, Zhang GQ, Ibrahim M (2012) Characterization and evaluation of *Bacillus* isolates for their potential plant growth and biocontrol activities against tomato bacterial wilt. African Journal of Biotechnology 11:7193-7201.

Ashrafizadeh A, Etebarian HR, Zamanizadeh HR (2005) Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of *Fusarium* wilt of melon. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 39-57. (In Persian).

Banihashemi Z (2010) Reaction of cucumis melo cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* the cause of melon vascular wilt. Iranian Journal Plant Pathology 46(1):11-22. (In Persian).

Boller T, Felix G (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annual Review Plant Biology 60: 379-406.

Bora T, Özaktan H, Göre E, Aslan E (2004) Biological Control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. Journal of Phytopathology 152: 471-475.

Brimner T, Boland G (2003) A review of the nontarget effects of fungi used to biologically control plant diseases. Agriculture, Ecosystems & Environment 100: 3-16.

Burgess DR, Hepworth G (1996) Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia minor*) in sunflower by seed treatment with *Gliocladium virens*. Plant Pathology 45: 583-592.

Chandrasekaran M, Belachew ST, Yoon E, Chun S (2017) Expression of *β-1,3-glucanase* (*GLU*) and *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*) genes and their enzymes in tomato plants induced after treatment with *Bacillus subtilis* CBR05 against *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Journal of General Plant Pathology 83: 7–13.

Doxey AC, Yaish MW, Moffatt BA, Griffith M و Mcconkey BJ (2007) Functional divergence in the *Arabidopsis beta-1,3-glucanase* gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. Molecular Biology and Evolution 24(4): 1045-1055.

Ge B, Liu B, Nwet TT, Zhao W, Shi L, Zhang K (2016) *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from changbai mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. PLoS One 11(11): e0166079.

Kim MS, Cho SM, Kang EY, Im YJ, Hwangbo H, Kim YC, Ryu CM, Yang KY, Chung GC, Cho BH (2008) Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. Molecular Plant-Microbe Interactions 21(12): 1643-53.

Kong Q, Yuan J, Niu P, Xie J, Jiang W, Huang Y, Biem Zh (2014) Screening suitable reference genes for normalization in reverse transcription quantitative Real-Time PCR analysis in melon. PLoS ONE 9 (1): e87197.

Leubner-Metzger G, Meins F Jr (1999) Functions and regulation of plant *beta-1,3-glucanases* (PR-2), *In*: Datta SK, Muthukrishnan S (eds.), Pathogenesis-related proteins in plants. CRC Press

LLC, USA. pp. 49–76.

Li Q, Chen Y, Wang J, Zou F, Jia Y, Shen D, Zhang Q, Jing M, Dou D, Zhang M (2019) A *Phytophthora capsici* virulence effector associates with NPR1 and suppresses plant immune responses. Phytopathology Research 1(1): 1-11.

Li Y, Geng X, Ji P, Pan C, Wei S (2016) Isolation and evaluation of a *Bacillus methylotrophicus* strain for control of corn stalk rot. Journal Biocontrol Science and Technology 26: 727-731.

Liu Y, Yaoa Y, Hua X, Xinga S, Xua L (2015) Cloning and allelic variation of two novel *catalase* genes (SoCAT-1 and SsCAT-1) in *Saccharum officinarum* L. and *Saccharum spontaneum* L. Journal Biotechnology & Biotechnological Equipment 29: 431-440.

Moss WP, Byrne JM, Campbell HL, Ji P, Bonas U, Jones JB, Wilson M (2007) Biological control of bacterial spot of tomato using *hrp* mutants of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Biological Control 41:199-206.

Neto JRMC, Chaves RB, Sardinha DHS, Melo LGL, Rodrigues AAC (2018) Bacterial formulations in induction of resistance and growth promotion of tomato plants. Journal of Agricultural Science 10: 493-503.

Nie Q, Gao GL, Fan QJ, Qiao G,Wen XP, Liu T, Peng ZJ, Cai YQ (2015) Isolation and characterization of a *catalase* gene BHuCAT3 from pitaya (*Hylocereus undatus*) and its expression under abiotic stress. Gene 563(1):63-71.

Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S (2008) Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. Plant Physiology 147(3): 1251–1263.

Norouzi S, Rahnama K, Rabbaninasab H, Taqinasab M (2014) Evaluation of efficacy of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates in biological control of melon *Fusarium* wilt. Biocontrol in Plant Protection 2: 43-55. (In Persian).

Perchepied L, Pitrat M (2004) Polygenic inheritance of partial resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in melon. Phytopathology 94(12): 1331-1336.

Peterbauer T, Lahuta LB, Blochl A, Mucha J, Jones DA, Hedley CL, Gorecki RJ, Richter A (2001) Analysis of raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition. Plant Physiology 127(4):1764-1772.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST[a]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Research 9: 1–10.

Sabbagh SK, Valizadeh Sh (2016) Effect of bio-fertilizers on greenhouse cucumber resistant to damping-off disease caused by *Pythium aphanidermatum* and increase of yield component. Biological Control of Pests and Plant Diseases 5(1): 111-122. (In Persian).

Safarnezhad MR (2004) Study on fungal causes of cucurbit death in Sistan region. *In*: Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress, 28 Aug.–1 Sept., University of Tabriz, Tabriz, Iran. 262.

Sahai AS, Manocha MS (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. FEMS Microbiology Reviews 11: 317-338.

Scandalios JG, Guan L, Polidoros AN (1997) Catalases in plants, gene structure, properties, regulation and expression, *In*: Scandalios JG (ed.), Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences cold spring. Harbor Laboratory Pres, USA. pp. 343–406.

Shan H, Zhao M Chen D, Cheng J, Li J, Feng Z, Ma Z, An D (2013) Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79. Crop Protection 44: 29-37.

Sherf AF, MacNab AA (1986) Vegetable diseases and their control. John Wiley and Sons, USA.

Xu X, Qin G, Tian S (2008) Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. International Journal of Food Microbiology 15(1-2):153-8.

Szczech M, Shoda M (2006) The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. Journal of Phytopathology 154: 370-377.

Zamioudis C. Pieterse CMJ (2012) Modulation of host immunity by beneficial microbes. Molecular Plant-Microbe Interactions 25:39-150.

Zhang JX, Xue AG, Tambong JT (2009) Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*. Plant Disease 93(12):1317-1323.

Zipfel C (2014) Plant pattern-recognition receptors. Trends in Immunology 35: 345–351.