Archive of SID.ir

مقاله تحقیقی

شناسایی و تعیین صفات باکتری اندوفیت *Pseudomonas fluorescens* NZ105 به عنوان عامل کنترل زیستی بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه‌فرنگی

نیر زنده‌دل[۱]، نادر حسن‌زاده[۲]، فرید بیکی فیروزجاهی[۳]، شهرام نعیمی[۴]

۱ و ۲- دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳ و ۴- استادیار، دانشیار، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مسئول مکاتبات: فرید بیکی فیروزجاهی، ایمیل: f.beiki@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۸ ۹(۱) ۳۵-۴۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۰۵

چکیده

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) یکی از مهمترین صیفی‌جات در سراسر جهان و ایران است. بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه‌فرنگی با عامل *Verticillum dahliae* از موانع توسعه کشت این گیاه در کشور می‌باشد. یکی از روش‌های نوین در مدیریت بیماری‌های گیاهی استفاده از باکتری‌های مهارکننده اندوفیت است. هدف از انجام این پژوهش، شناسایی و معرفی باکتری‌های اندوفیت مؤثر به‌عنوان عامل کنترل زیستی بیماری مذکور است. برای این منظور، ابتدا نمونه‌برداری از گلخانه‌ها و مزارع گوجه‌فرنگی استان‌های تهران و البرز در بهار و تابستان ۱۳۹۶ انجام شد. جدایه‌های اندوفیت از اندام‌های ریشه، ساقه، برگ و میوه گوجه‌فرنگی جداسازی شدند. با انجام آزمون‌های کلیدی و بر اساس تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط کشت King's medium B، تعداد ۳۰ جدایه *Pseudomonas* فلورسنت مثبت انتخاب شدند. طی انجام آزمون‌های کشت متقابل، شش جدایه با توانایی بیوکنترل *V. dahliae* در شرایط گلخانه مورد بررسی‌های تکمیلی قرار گرفتند. جدایه *P. fluorescens* NZ105 به عنوان موثرترین عامل آنتاگونیست با ۳/۷ میلی‌متر بازدارندگی در ظرف پتری و ۸۵ درصد کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه انتخاب شد و به‌وسیله روش‌های بیوشیمیایی و ترادف ناحیه ژنی 16S rDNA مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد جدایه مذکور موجب افزایش معنی‌دار پارامترهای رشدی نظیر وزن خشک بوته و ریشه، ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن‌تر ریشه و بوته شده است. همچنین، بررسی‌ها نشان داد مکانیسم‌های تولید پروتئاز، متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار و متابولیت‌های فرّار ضد قارچی، در توان کنترل زیستی جدایه *P. fluorescens* NZ105 مؤثر بودند.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، *Verticillum dahliae*، پروتئاز، متابولیت‌ها، فاکتورهای رشد

مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicon esculentum* گیاهی یکساله، متعلق به خانواده *Solanaceae* و یکی از مهمترین صیفی‌جات در سراسر دنیا محسوب می‌گردد. با توجه به توسعه بخش کشاورزی کشور در چند سال اخیر، میزان تولید گوجه‌فرنگی در ایران طی سال‌های اخیر افزایش یافته است. ایران با حدود شش میلیون تُن، در جایگاه ششم تولیدکنندگان عمده گوجه‌فرنگی در جهان قرار دارد (FAO, 2019).گوجه‌فرنگی دومین محصول مهم گلخانه‌ای در کشور است و بیماری پژمردگی ورتیسلیومی با عامل *Verticillium dahliae* یکی از محدویت‌های جدی تولید گوجه‌فرنگی در ایران است (Murid & Haji Mansour, 2017). تاکنون روش‌های متعددی جهت مدیریت این بیماری از جمله استفاده از ارقام مقاوم و ضدعفونی خاک پیشنهاد و به اجرا گذاشته شده است. در شرایط گلخانه، اغلب از ارقام مقاوم استفاده می‌شود. با این

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

حال، در طول سال‌های گذشته، چندین مورد از شکسته‌شدن مقاومت در بسیاری از ارقام گوجه‌فرنگی چون Colibri و Rio Grande گزارش شده است (Rekanovic *et al.*, 2007). جدایه *V. dahliae* در تونس مؤید پویایی این گونه در تعامل با میزبان‌های خود و بروز بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در ارقام گوجه‌فرنگی است (Oliveira *et al.*, 2010). مضافاً بر این‌که مصرف بی‌رویه سموم شیمیایی و بروز پدیده مقاومت در بیمارگرها در برابر مصرف سموم و اثرات سوء زیست محیطی آن‌ها، استفاده از سایر روش‌های جایگزین و کم خطر نظیر کنترل زیستی مهار کننده‌های قارچی و باکتریایی را برجسته کرده است (Martin & Bull, 2002; Naraghi *et al.*, 2006; Naraghi *et al.*, 2008; Prabhat *et al.*, 2013). باکتری‌های اندوفیت در کنترل بیمارگرهای گیاهی و حفاظت از گیاهان در برابر تنش‌های عوامل زنده و غیر زنده حائز اهمیت هستند. باکتری‌های اندوفیت باعث افزایش دفاع سریع گیاهان نسبت به عفونت‌های باکتریایی، قارچی یا ویروسی و تنش‌های محیطی می‌شوند (Wang *et al.*, 2015). ضمن این که این باکتری‌ها گزینه‌های خوبی برای تولید کودهای زیستی می‌باشند و در مقایسه با باکتری فراریشه بهتر می‌توانند میزبانشان را در شرایط تنش و عوامل بیماری‌زا محافظت کنند. از مکانیسم‌های شناخته شده این باکتری‌ها ایجاد مقاومت القایی سیستمیک (Induced Systemic Resistance, ISR) وابسته به هورمون‌های گیاهی جاسمونیک اسید (JA) و اتیلن (ET) است (Vallino *et al.*, 2009).

از دیگر مکانیسم‌های شناخته شده برای این باکتری‌ها می‌توان از تولید ایندول اسید استیک، آنزیم‌های ACC دآمیناز، انحلال مواد مغذی در خاک، تثبیت نیتروژن و کنترل بیمارگرهای گیاهی نام برد (Vallino *et al.*, 2009). از جنس‌های باکتریایی اندوفیت بهبود یا ارتقا دهنده رشد گیاه (PGP) می‌توان به *Bacillus* و *Burkholderia* اشاره نمود که به‌طور قابل توجهی باعث افزایش طول و وزن خشک گیاه کلزا و برنج شده‌اند و همچنین جدایه MSA2 *Enterobacter* از ریشه گیاه *Jatropha curcas* موجب افزایش طول ریشه، تعداد برگ و وزن تر و خشک گیاه شده است (Singh *et al.*, 1999; Bhattacharyya & Jha, 2012). در خصوص استفاده از باکتری‌های اندوفیت گوجه‌فرنگی به‌عنوان یکی از روش‌های موثر در مدیریت بیماری پژمردگی ورتیسلیومی گزارش‌های محدودی وجود دارد. Amaresan *et al.* (2012) با مطالعه‌ی باکتری‌های اندوفیت در بوته‌های گوجه‌فرنگی توانستند جدایه‌های باکتری اندوفیت با قابلیت ارتقا رشد را شناسایی نمایند که بیشتر این جدایه‌ها متعلق به جنس *Bacillus* و دو جدایه از جنس *Serratia* بودند. اغلب این جدایه‌ها قادر به کنترل بیمارگرهای قارچی و شبه قارچی *Fusarium oxysporum*، *Colletotrichum capsici*، *Sclerotinia rolfsii* و *Pythium* sp. بودند. همچنین توانایی تولید سیدروفور، ایندول استیک اسید و فسفات را دارا بودند. در تحقیقی مشابه، با مطالعهٔ باکتری‌های اندوفیت در بوته‌های گوجه‌فرنگی توانستند جدایه‌های باکتری اندوفیت با قابلیت ارتقا رشد را شناسایی نمایند که متعلق به جنس *Pseudomonas* و دو جدایه از جنس‌های *Stenotrophomonas* و *Acinetobacter* بودند. این جدایه‌ها ضمن کنترل بیمارگر قارچی *V. dahliae* دارای توانایی تولید سیدروفور، ایندول استیک اسید، تولید متابولیت‌های فرار ضد قارچی، آنتی‌بیوتیک‌ها، پروتئازها، کیتینازها و سیانید هیدروژن بودند (Safdarpour & Khodakaramian, 2019). با توجه به موارد فوق و اهمیت ابعاد مختلف این موضوع، اقدام به جداسازی، شناسایی و معرفی مؤثرترین جدایه باکتری اندوفیت از روی گیاه گوجه فرنگی گردید. توصیف کامل صفات باکتری اندوفیت *Pseudomonas fluorescens* NZ105 از دیگر اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌های بررسی

نمونه برداری

نمونه‌برداری از بوته‌های گوجه‌فرنگی در ۲۰ گلخانه و ۱۵ مزرعه در طی فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۶ در استان‌های تهران و البرز انجام شد. در طی نمونه‌برداری، ۱۰ بوته کاملاً سالم فاقد هر گونه علایم ظاهری بیماری از هر

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

گلخانه یا مزرعه انتخاب شد. ریشه، ساقه، برگ و میوه هر گیاه به عنوان یک نمونه در نظر گرفته شد.

جدایه‌های قارچ بیمارگر *V. dahliae*

جدایه قارچ بیمارگر *V. dahliae* با کد VD–Co–P–G–22 از کلکسیون مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور تهیه شد. ریسه‌های قارچی به صورت جداگانه به محیط کشت PDA منتقل شدند. سپس جدایه قارچ به روش نوک ریسه خالص‌سازی شد.

جداسازی اندوفیت‌های جنس *Pseudomonas*

نمونه‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه با آب شستشو داده شدند و پس از ضدعفونی با اتانول ۷۵٪ به مدت ۴۰ ثانیه وسپس با هیپوکلریت سدیم ۵٪ به‌مدت یک دقیقه و اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، سه بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. نمونه‌ها در هاون سترون حاوی آب مقطر سترون، له شدند و ۲۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق بر روی محیط کشت کینگ ب (KB) به صورت مخطط کشت داده شد (Atugala & Deshappriya, 2015). جدایه‌هایی با رنگدانه فلورسنت، به عنوان گونه‌های جنس *Pseudomonas* انتخاب و بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی (تولید لوان، اکسیداز، آرژنین دی هیدرولیزه، پوسیدگی نرم بافت سیب زمینی و ایجاد فوق حساسیت روی برگ گیاه توتون) در حد جنس گروه‌بندی شدند.

بررسی برهمکنش بیمارگر *V. dahliae* با باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas* در شرایط آزمایشگاه

ارزیابی‌های اولیه برای تعیین توان بیوکنترل جدایه‌های فلورسنت مثبت جنس *Pseudomonas* علیه قارچ بیمارگر *V. dahliae* روی محیط کشت PDA به‌صورت کشت متقابل انجام گرفت. قرص‌های میسلیومی به اندازه پنج میلی‌متر و از حاشیه پرگنه ۱۵ روزه در حال رشد قارچ تهیه شد. در تشتک‌های حاوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار(PDA) این قرص‌ها روبروی باکتری بیمارگر قرار داده شد. سپس تشتک‌های پتری شاهد حاوی قارچ بیمارگر *V. dahliae* و تیمار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی درون انکوباتور نگهداری شدند. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار انجام شد. قطر پرگنه بیمارگر در روز پانزدهم برای محاسبات آماری یادداشت‌برداری نهایی شد و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر (PI) با استفاده از فرمول $PI=[(R_1-R_2)/R_1]\times 100$ که در آن R1 برابر با شعاع پرگنه در شاهد و R2 برابر با شعاع پرگنه در حضور جدایه‌های باکتری است، محاسبه شد (Munif *et al.*, 2012).

آزمایش‌های گلخانه‌ای

ارزیابی توان باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas* در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای

بذورگوجه‌فرنگی رقم فلات با ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون هر شش جدایه منتخب *Pseudomonas* که در غلظت 10^8 cfu/ml به روش اسپکتروفتومتر تعیین شده بود به مدت ۲۴ ساعت آغشته و داخل سینی نشاء کاشته شدند (Atugala & Deshappriya, 2015). ۲۴ ساعت قبل از انتقال نشاهای تیمار شده، به گلدان‌های حاوی خاک سترون، سوسپانسیون قارچ با جمعیت $10^8\times 1$ اسپور در هر میلی‌لیتر اضافه شد و سپس نشاهای تیمار شده به گلدان‌ها منتقل شدند (Nejad *et al.*, 2000). ۴۵ روز پس از رشد گیاهان تیمار شده گوجه فرنگی، هر هفته درصد شدت بیماری با شمارش علایم ظاهری اندام‌های هوایی تعداد نشاهای سالم و بیمار، تعیین و میزان کنترل بیماری برای هر تیمار محاسبه شد. میزان کنترل بیماری با استفاده از فرمول $[(D_1-D_2)/D_1]\times 100$ که در آن D_1 درصد شدت بیماری در شاهد آلوده و D_2 درصد شدت بیماری در تیمار، محاسبه شد (Jabnoun *et al.*, 2009)، این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی پنج تکرار (هر تکرار شامل ۱۰ گیاهچه) انجام و تجزیه آماری داده‌های حاصل از اندازه‌گیری پارامترها، با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد و مقایسه تجزیه واریانس و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد صورت گرفت.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

ردیابی حضور اندوفیت‌ها در بافت‌های گیاهی

از هر کدام از تیمارهای مایه‌زنی شده با باکتری‌های اندوفیت و شاهد مایه‌زنی نشده، پنج گیاهچه به صورت تصادفی برای اثبات پدیده اندوفیت شدن، انتخاب شدند. برای این منظور، قطعات گیاهی مختلف پس از انجام همان مراحل اشاره شده در قسمت جداسازی باکتری‌های اندوفیت، روی محیط کشت کینگ ب (KB) قرار داده شدند. پس از جداسازی و شناسایی باکتری‌های رشد یافته در اطراف قطعات و مقایسه آنها با باکتری‌های جداسازی شده از قطعات مربوط به شاهد مایه‌زنی نشده، اندوفیت بودن باکتری‌های مورد مطالعه تعیین شد.

تأثیر باکتری‌های اندوفیت بر رشد گیاه گوجه‌فرنگی

برای بررسی اثر جدایه‌های اندوفیت بر شاخص‌های رشد گیاه، بذور مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر با هر یک از باکتری‌های اندوفیت مایه‌زنی شده (مطابق روش اشاره شده در بالا) و در سینی‌های نشاء کاشته شدند. پس از ۴۵ روز رشد گیاهان تیمار شده گوجه فرنگی، شاخص‌های رشدی شامل طول ریشه، طول ساقه، وزن‌تر ریشه و بوته و وزن خشک بوته و ریشه تیمار شده با شش جدایه منتخب *Pseudomonas* نسبت به شاهد سالم (بدون بیمارگر) و شاهد آلوده به بیمارگر قارچ در شرایط گلخانه بررسی و یادداشت‌برداری شد (Bhattacharyya & Jha, 2012).

شناسایی و جدایه اندوفیت موثر *Pseudomonas*

به منظور شناسایی مؤثرترین باکتری اندوفیت *Pseudomonas* از روش‌های بیوشیمیایی و تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA استفاده شد (Kumar *et al.*, 2016).

استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

جدایه موثر *Pseudomonas* روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. کلنی هر ایزوله داخل میکروتیوب سترون حاوی ۵۰۰ میکرولیتر سود (NaOH) یک دهم نرمال و ۱۰ میکرولیتر SDS نیم درصد مخلوط شد. پس از ورتکس، نمونه‌ها برای مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. سپس در داخل ظرف یخ به مدت سه دقیقه شوک سرمایی داده شدند. پس از آن به مدت پنج دقیقه نمونه‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی به داخل میکروتیوب سترون منتقل و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Elboutahiri *et al.*, 2009). برای تکثیر ژن 16S rDNA از جفت آغازگر عمومی (5'–CGGGATCCAGAGTTTGATCCTGGTCAGAAC GAACGCT–3' و 5'–CGGGATCCTACGGCTACCTTGTTACGACTTC ACCCC–3') استفاده شد (Kumar *et al.*, 2016).

مخلوط واکنش نهایی PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با مواد حاوی بافر ۱X،۲/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۱/۵ میلی مولار) ۱ میکرولیتر، dNTPS ۰/۵ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت هر کدام یک میکرولیتر، آنزیم Taq DNA polymerase (۲/۵ میلی مولار) ۰/۳ میکرولیتر، آب مقطر سترون ۱۶/۷ میکرولیتر و DNA استخراج شده ۲ میکرولیتر تهیه شد. واکنش PCR با برنامه حرارتی شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه برای واسرشت اولیه و ۲۵ چرخه PCR و هر چرخه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس به مدت سه دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه کامل شد. چهار میکرولیتر از هر محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با یک میکرولیتر مارکر رنگ آمیزی مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱٪ و یک میکرولیتر DNA ladder SMO 323 (Thermo Scientific) بارگذاری و پس از ۳۰ دقیقه الکتروفورز ژل‌ها توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن (Gel Document Uvitec/DM 500) مشاهده و عکس‌برداری شد. محصول واکنش PCR به شرکت بایونیر کره جنوبی فرستاده شد (Kumar *et al.*, 2016).

بررسی توانایی تولید متابولیت‌های مهم توسط جدایه موثر *Pseudomonas*

آزمون تولید پروتئاز

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

کلنی جدایه موثر *Pseudomonas* روی تشتک حاوی محیط کشت SMA (Simmon citrate agar) به صورت لکه‌ای در سه تکرار کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. تشکیل هاله شفاف در اطراف پرگنه باکتری به منزله فعالیت پروتئازی جدایه ارزیابی شد (Gull & Hafeez, 2012).

آزمون تولید متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار

سوسپانسیون جدایه موثر *Pseudomonas* با غلظت 1×10^{8} cfu/ml روی تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA کشت و به مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس کل پرگنه‌های سطح محیط کشت‌ها را تراشیده و یک پنبه سترون آغشته به کلروفرم بر روی درپوش تشتک‌ها بصورت وارونه قرار داده شد. پس از ۳۰ دقیقه، یک دیسک از میسلیوم حاشیه کشت ۱۵ روزه قارچ بیمارگر در وسط هر تشتک و یک تشتک به عنوان شاهد کشت داده شد و میزان درصد بازدارندگی (PI) پس از ۱۵ روز طبق فرمول $PI=[(R_1-R_2) / R_1] \times 100$ اندازه‌گیری شد (Raut & Hamde, 2016).

آزمون تولید متابولیت‌های فرار ضد قارچی

طبق آزمون فوق، سوسپانسیون جدایه موثر *Pseudomonas* با غلظت مشابه تهیه و سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این رقت روی محیط‌های کشت نوترینت آگار حاوی دو درصد گلوکز (NGA) پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت پتری ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس یک دیسک از کشت ۱۵ روزه از قارچ بیمارگر در وسط محیط کشت PDA قرار داده شد. در شرایط سترون، تشتک‌های کشت باکتری و قارچ بیمارگر روی هم قرار داده شدند و با استفاده از نوار پارافیلم، منفذ میانی تشتک‌ها مسدود شد. پس از ۱۰ روز طبق فرمول بالا درصد بازدارندگی (PI) از رشد قارچ اندازه‌گیری شد (Raut & Hamde, 2016).

تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمون‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی انجام شد و برای هر تیمار پنج تکرار در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد صورت گرفت.

نتایج

جداسازی باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas*

با انجام آزمون‌های کلیدی و نیز بر اساس تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط کشت King's medium B، از تعداد ۳۰ جدایه *Pseudomonas* فلورسنت مثبت شش جدایه در حد جنس گروه‌بندی شدند. شش جدایه با توانایی بیوکنترل *V. dahliae* در شرایط گلخانه مورد بررسی‌های تکمیلی قرار گرفتند (جدول ۱).

اثر آنتاگونیستی جدایه‌های *Pseudomonas* در آزمایشگاه

با بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های *Pseudomonas* علیه قارچ بیمارگر *V. dahliae*، پنج جدایه به‌ترتیب *Pseudomonas* sp. NZ 2011 با میانگین ۲/۷ میلی‌متر، *Pseudomonas* sp. NZ 2201 با میانگین ۲/۶ میلی‌متر، *Pseudomonas* sp. NZ 2202 با میانگین ۲/۳ میلی‌متر، *Pseudomonas* sp. NZ 1102 با میانگین ۱/۷ میلی‌متر و *Pseudomonas* sp. NZ 1101 با میانگین ۱/۴ میلی‌متر، هاله بازدارندگی را ایجاد نمودند. این پنج مورد همراه با جدایه *P. fluorescens* NZ105 با میانگین ۳/۷ میلی‌متر با بیشترین هاله بازدارندگی، برای ارزیابی توانایی بیوکنترل *V. dahliae* در شرایط گلخانه مورد بررسی قرارگرفتند.

اثرجدایه‌های منتخب در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای

نتایج تجزیه واریانس توان مهار زیستی شش جدایه باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas* به‌همراه قارچ بیمارگر *V. dahliae* در مقایسه با شاهد آلوده (قارچ بیمارگر) و

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

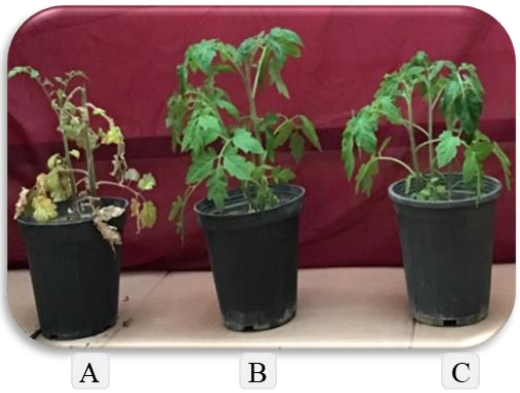
شاهد سالم (بدون قارچ بیمارگر) نشان داد اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد در بین تیمارها وجود دارد. جدایه باکتری *P. fluorescens* NZ105 با ۸۵ درصد نسبت به شاهد آلوده بیشترین کاهش درصد شدت بیماری را نشان داد (شکل ۱).

سایر جدایه‌های اندوفیت *Pseudomonas* توانایی مهار زیستی کمتری نسبت به شاهد سالم و باکتری منتخب داشتند (جدول ۲).

جدول ۱- مشخصات فنوتیپی شش جدایه باکتری منتخب تعلق به جنس *Pseudomonas*

Table 1. Phenotypic characters of six selected *Pseudomonas* isolates

Isolates	Levan	Gram staining	Hypersensitivity reaction	Arginine dihydrolase	Oxidae test	Fluorescent pigment	Potato rot
Pseudomonas sp. NZ 1101	–	–	–	–	–	+	–
Pseudomonas sp. NZ 2201	+	–	–	+	+	+	–
Pseudomonas sp. NZ 2011	+	–	–	+	+	+	–
Pseudomonas sp. NZ 1102	–	–	–	–	–	+	–
Pseudomonas sp. NZ 2202	–	–	–	–	–	+	–
P. fluorescens NZ 105	+	–	–	+	+	+	–



شکل۱- کاهش معنی دار علایم پژمردگی و افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی در تیمار بذور مایه زنی شده با قارچ بیمارگر *V. dahliae* و باکتری *P. fluorescens* NZ105 (B) در مقایسه با تیمار شاهد سالم (C) و شاهد آلوده به قارچ بیمارگر *V. dahliae* (A)

Fig. 1. Significant reduction of wilt symptom and increasing the growth of the tomato plants in seed treatments with *V. dahliae* and *P. fluorescens* NZ105 (B) compared to non–inoculated control (C) and inoculated control with *V. dahliae* (A)

تأثیر باکتری‌های اندوفیت *Pseudomonas* بر رشد گیاه

نتایج تجزیه واریانس صفات وزن‌تر و خشک بوته و ریشه، طول ریشه و بوته نشان داد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد وجود دارد. جدایه *P.* NZ105

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

fluorescens در این میان از توان بیشتری در افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد وزن خشک بوته، وزن خشک ریشه، ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن تر ریشه و وزن تر بوته برخوردار بود (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر جدایه‌های اندوفیت *Pseudomonas* روی درصد کنترل بیماری پژمرگی ورتیسلیومی و شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

Table 2. The effect of endophytic *Pseudomonas* isolates on *Verticillium* wilt disease control and tomato plant growth parameters under greenhouse conditions

Treatment	Disease severity (%)	Disease Control (%)	Seedling wet weight (g)	Seedling dry weight (g)	Seedling height (cm)	Root wet weight (g)	Root dry weight (g)	Root length (cm)
Inoculated control	94 ± 0.28 a	–	19.15±0.08 h	4.67±0.05 g	13.83± 0.05e	6.11± 0.06 g	1.98±0.05 g	4.83 ±0.05 f
Non–inoculated control	0.00 ± 0.00 g	–	58.50± 0.28 b	25.50± 0.28 b	28.50 ± 0.28 b	33.50 ± 0.28 b	15.50± 0.28 b	19.25±0.14 b
Pseudomonas sp. NZ 1101 + pathogen	55.50 ±0.28 b	44.5	49.71±0.05 c	18.20±0.28 c	24.00±0.05 c	31.66 ±0.06 c	12.62± 0.05 c	16.50± 0.28 c
Pseudomonas sp. NZ 2201 + pathogen	32.50 ±0.28 d	67.50	27.40±0.05 d	8.65±0.11 e	14.66 ±0.05 d	12.48 ±0.01 d	4.27±0.01 e	6.66 ±0.02 e
Pseudomonas sp. NZ 2011 + pathogen	31.50 ±0.28 e	68.50	25.40 ±0.05 f	8.59±0.05 e	14.16± 0.02 de	11.15±0.08 e	4.54± 0.02 e	6.83 ±0.01 e
Pseudomonas sp. NZ 1102 + pathogen	54.50 ±0.28 c	45.50	25.79±0.05 e	9.06±0.04 d	14.00 ±0.28 e	11.48 ±0.01 e	5.06±0.04 d	7.33 ± 0.05 d
Pseudomonas sp. NZ 2202 + pathogen	35.50 ±0.28 d	64.5	22.20±0.11 g	7.20± 0.11 f	10.62±0.06 f	9.85± 0.08 f	3.62±0.05 f	6.66 ± 0.02 e
P. fluorescens NZ 105+ pathogen	15.00 ±0.28 f	85	70.08±0.005 a	30.72±0.57 a	35.66±0.57 a	42.31 ±0.005 a	17.23± 0.57a	25.50±0.57 a

Values followed by the same letter are not statistically different ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test.

شناسایی جدایه باکتری اندوفیت موثر *Pseudomonas*بر اساس آنالیز PCR و تعیین ترادف ناحیه ژنی 16S r DNA

بر اساس نتایج تعیین ترادف ژن 16S rDNA جدایه منتخب با ۹۹٪ همولوژی بنام *P. fluorescens* NZ105 شناسایی و با شماره دسترسی MN814047 در پایگاه داده‌های NCBI GenBank ثبت توالی شد.

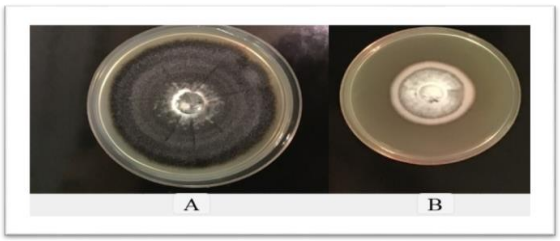
بررسی توانایی تولید متابولیت‌های میکروبی توسط جدایه *P. fluorescens* NZ105

تولید پروتئاز

میزان هاله بازدارندگی قارچ توسط جدایه *P. fluorescens* NZ105، ۱/۳۳ میلی‌متر تعیین شد.

تولید متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار

بیشترین میزان بازدارندگی رشد قارچ مربوط به جدایه *P. fluorescens*NZ105 با ۲/۷۶ میلی‌متر تعیین شد (شکل ۲).



شکل ۲- تولید متابولیت‌های بازدارنده خارج سلولی قابل نفوذ در آگار و بازداری از رشد قارچ *V. dahliae* توسط جدایه *P. fluorescens* NZ105 (B) نسبت به شاهد (A).

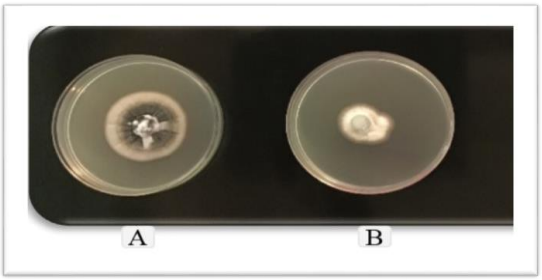
Fig 2. Production of extracellular metabolites and inhibition of *V. dahliae* growth by *P. fluorescens* NZ105 (B) compare to control (A).

تولید متابولیت‌های فرار ضد قارچی

جدایه *P. fluorescens* NZ105 موجب کاهش رشد میسلیوم قارچ بیمارگر به میزان ۶۸٪ شد (شکل ۳).

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل ۳- تأثیر متابولیت‌های فرار ضد قارچی تولید شده توسط جدایه باکتری اندوفیت *P. fluorescens* NZ105 به همراه قارچ بیمارگر *V. dahliae* (B) و شاهد (A)

Fig. 3. Effect of volatile metabolites produced by the endophytic bacterium *P. fluorescens* NZ105 against pathogenic fungus *V. dahliae* (B) compare to control (A)

بحث

امروزه به دلیل استفاده بی‌رویه از سموم شیمیایی و تاثیرات منفی آن‌ها بر محیط زیست، کاربرد روش‌های دیگری که بتوانند بدون تاثیر نامناسب بر محیط زیست، بیماری‌های گیاهی را به طور مطلوبی کنترل کنند، ضروری به نظر می‌رسد (Junaid *et al.* 2013; Kwak &Weller 2013; Prabhat *et al.* 2013). در این راستا و در پی این تحقیق، از مجموع ۳۰ جدایه اندوفیت *Pseudomonas*، شش جدایه *Pseudomonas* برای مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انتخاب شدند. نتایج حاصل از آزمون کشت متقابل و نیز ارزیابی میزان کنترل بیماری در شرایط گلخانه نشان داد که جدایه *P. fluorescens* NZ105 در آزمایشگاه بیشترین هاله بازدارندگی را علیه قارچ *V. dahliae* ایجاد کرد و در شرایط گلخانه نیز توانست بیش از دیگر جدایه‌ها و به میزان ۸۵ درصد باعث کاهش بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی شود. نتایج بدست آمده با نتایج (Martin & Bull 2002) همخوانی داشت. آن‌ها با استفاده از جدایه‌های اندوفیت *Pseudomonas* شاهد کاهش ۸۸ درصدی بیماری و نیز افزایش معنی‌دار پارامترهای رشدی گیاه گوجه فرنگی بودند. در تحقیق مشابه، دو جنس باکتریایی *Bacillus* و *Pseudomonas* قادر به کنترل بیمارگرهای قارچی *Verticillium*، *Fusarium* و *Rhizoctonia* به ترتیب به میزان ۸۸ درصد، ۸۶ درصد و ۸۵ درصد بودند (Munif *et al.*, 2012).

جدایه‌های مورد بررسی علاوه بر کاهش بیماری موجب افزایش معنی‌دار پارامترهای رشدی گیاه نظیر وزن خشک بوته و ریشه، ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن‌تر ریشه و بوته شدند. نتایج این تحقیق با نتایج توماس و یوپتری (Thomas & Upreti, 2015) مطابقت داشت. همچنین نتایج تحقیق حاضر با نتایج Nejad & Johnson (2000) و با Bhattacharyya & Jha (2012) که روی دو گیاه کلزا و گوجه‌فرنگی انجام شده بود همخوانی داشت. در تحقیق ایشان، کاهش علایم بیماری ناشی از *V. dahliae*، ۸۸ درصد و کاهش علایم بیماری ناشی از *F. oxysporum*، ۸۶ درصد اعلام شده بود. گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از باکتری‌های موثر در مهار زیستی توسط گونه‌های *B. subtilis* و *P. fluorescens* علیه این بیماری موجود می‌باشد که برخی از این عوامل به‌ویژه جدایه‌هایی از *Bacillus* و *Streptomyces* بصورت تجاری تولید شده‌اند (Kwak & Weller, 2013).

در خصوص بررسی توان بیوکنترل جدایه *P. fluorescens* NZ105 مشخص شد که استرین مذکور قادر به تولید متابولیت‌های فرار و ترشحات ضد قارچی و پروتئاز می‌باشد. نتایج این تحقیق با نتایج ارزیابی فاکتورهای تولید متابولیت‌های میکروبی توسط Amaresan *et al.* (2012) مطابقت داشت. استفاده از متابولیت ثانویه به ویژه آنتی‌بیوتیک‌های متنوع، متابولیت‌های فرار ضد قارچی، آنزیم‌ها و همچنین تولید بیوفیلم، همواره مورد توجه محققان مهار زیستی بیماری‌های گیاهی بوده‌اند (Morikawa, 2006; Khezri *et al.*, 2011).

با توجه به نتایج حاصل از این بررسی و با استناد به گزارشات ارائه شده توسط سایر محققین، می‌توان با اطمینان اعلام نمود که باکتری‌های اندوفیت نقش موثری در افزایش رشد رویشی گیاه داشته و با حضور آن‌ها مهار بیماری امکان پذیر می‌باشد، بدون اینکه اثرات مخرب و ناگوار بر سلامتی انسان و محیط زیست داشته باشند.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

پیشنهادها

با توجه به کارآیی باکتری مهار کننده *P. fluorescens* NZ105 در کنترل پژمردگی ورتیسلیومی گوجه فرنگی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام آزمون‌های مزرعه‌ای و متعاقب آن فرمولاسیون و تجاری‌سازی آن پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات و همکاری‌های خانم دکتر لاله نراقی که اینجانب را در انجام این تحقیق یاری نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

.

References

Amaresan, N., Jayakumar, V. & Thajuddin, N. 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chili (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. Indian Journal of Biotechnology, 13: 247–255.

Atugala, D.M. & Deshappriya, N. 2015. Effect of endophytic fungi on plant growth and blast disease incidence of two traditional rice varieties. Journal of the National Science Foundation, 43: 173–187.

Bhattacharyya, P.N. & Jha, D.K. 2012. Plant growth– promoting rhizobacteria (PGPB): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28: 1327–50.

Elboutahiri, N.I., Thami–Alami, E., Zaïd, S. & Udupa, M. 2009. Genotypic characterization of indigenous *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sullae* by rep–PCR, RAPD and ARDRA analyses. African Journal of Biotechnology, 8: 979–985.

FAO, 2019. FAOSTAT Retrieved from: www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity.

Gull, M. & Hafeez, Y. 2012. Characterization of siderophore producing bacterial strain *Pseudomonas fluorescens* Mst 8.2 as plant growth promoting and biocontrol agent in wheat. African Journal of Microbiology Research, 6: 6308–6318.

Jabnoun, H., Daami, M., Ayed, F. & Mahjoub, M. 2009. Biological control of tomato *Verticillium* wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. The African Journal of Plant Science and Biotechnology, 3: 26–36.

Junaid, J.M., Dar, N.A., Bhat, T.A., Bhat, A.H. & Bhat, M.A. 2013. Commercial biocontrol agents and their mechanism of action in the management of plant pathogens. International Journal of Modern Plant and Animal Sciences, 1: 39–57.

Khezri, M., Ahmadzadeh, M., Salehi–Jouzani, G. H., Behboudi, K., Ahangaran, A., Mousivand, M. & Rahimian, H. 2011. Characterization of some biofilm– forming *Bacillus subtilis* and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum*. Journal of Plant Pathology, 93: 373–382.

Kwak, Y.S. & Weller, D.M. 2013. Take–all of wheat and natural disease suppression: A Review. The Plant Pathology Journal, 29: 125–135.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33: 1870–4.

Martin, F.N. & Bull, C.T. 2002. Biological approaches for control of root pathogens of strawberry. Phytopathology, 92: 1356–1362.

Morikawa, M. 2006**.** Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Pseudomonas fluorescens* and related species. Journal of Bioscience and Bioengineering, 101: 1–8.

Murid, B. & Haji Mansou, Sh, 2017. Evaluation of resistance of tomato genotypes to Verticillium and Fusarium wilt using molecular markers. Journal of the World of Microbes, 10: 93–80.

Munif, A., Hallmann, J. & Sikora, R. 2012. Isolation of root endophytic bacteria from tomato and its biocontrol activity against fungal disease. Microbiology, 6: 148–156.

Naraghi, L., Heydary, A. & Ershad, D. 2006. Sporulation and survival of *Talaromyces flavus* on different plant material residues for biological control of cotton wilt caused by *V. dahliae*. Iranian Journal of Plant Pathology, 42: 381–397.

Naraghi, L., Azaddisfani, F. & Heydari, A. 2008. Study on antagonistic effects of non– volatile extracts of *Talaromyces flavus* on cotton Verticillium Wilt Disease. Asian Journal of Plant Sciences, 7: 389–393.

Nejad, P. & Johnson, P.A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. Biological Control, 18: 208–215.

Oliveira, M.F., da Silva, M.G. & Van Der Sand, S.T. 2010. Anti–phytopathogen potential of endophytic actinobacteria isolated from tomato plants (*Lycopersicon esculentum*) in southern Brazil, and characterization of *Streptomyces* sp. R18 (6), a potential biocontrol agent. Research in Microbiology, 161: 565–72.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Prabhat, N.J., Garima, G., Prameela, J. & Mehrotra, R. 2013. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: A potential gateway to sustainable agriculture. Greener Journal of Agriculture Sciences, 3: 73–84.

Raut, L.S. & Hamde, V.S. 2016. *In vitro* antifungal potential of rhizospheric isolates against *Fusarium oxysporum* causing *Fusarium* wilt of Bt– cotton. Bioscience Biotechnology Research communications, 9: 309–316.

Safdarpou, F. & Khodakaramian, G. H. 2019. Assessment of antagonistic and plant growth promoting activities of tomato endophytic bacteria in challenging with *Verticillium dahliae* under *in–vitro* and *in– vivo* conditions. Biological Journal of Microorganism, 7: 77–90.

Singh, P.P., shin, Y.C., Park, C.S. & Chung, Y.R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology, 89: 92–99.

Rekanovic, E., Milijasevic, S., Todorovic, B. & Potocnik, I. 2007. Possibilities of biological and chemical control of *Verticillium* wilt in pepper. Phytoparasitica, 35: 436– 441.

Thomas, P. & Upreti, R. 2015. Evaluation of tomato seedling root–associated bacterial endophytes towards organic seedling production. Biological Control, 20: 200–208.

Vallino, M., Greppi, D., Novero, M., Bonfante, P. & Lupotto, E. 2009. Rice root colonization by mycorrhizal and endophytic fungi in aerobic soil. Annals of Applied Biology, 154: 195–204.

Wang, Y., Liang, B., Zhang, Z., Yan, R., Yang, H. & Zhu, D. 2015. Phylogenetic diversity of culturable endophytic fungi in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griif), detection of polyketide synthase gene and their antagonistic activity analysis. Fungal Biology, 20: 68–78.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

Identification and characterization of endophytic bacterium, *Pseudomonas fluorescens* NZ105 as biocontrol agent of *Verticillum* wilt of tomato

Nayer Zendehdel[1], Nader Hasanzadeh[2], Farid Beiki Firouzjahi[3], Shahram Naeimi[4]

1, 2. PhD. student, Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3, 4. Assistant Professor, Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
Corresponding author: Farid Beiki Firouzjahi, email: f.beiki@gmail.com

Received: Feb., 26, 2021 9(1) 35–45 Accepted: June, 26, 2021

Abstract

Tomato (*Lycopersicon esculentum*) is one of the most important crops in the world and Iran. Verticillium wilt of tomato caused by *V. dahliae* is one of the most important obstacles to the cultivation of this plant in the country. Using endophytes has been introduced as a new solution to plant disease management. The aim of this study was to introduce endophytic bacteria as biological control agent for Verticillium wilt of tomato. For this purpose, plants were collected from both greenhouses and tomato fields in Tehran and Alborz provinces. Endophytic bacteria were isolated mainly from the roots, stems, leaves and fruits of tomato. Based on key tests and fluorescent pigmentation on King' B medium, 30 fluorescent *Pseudomonas* were selected. In dual culture tests, six isolates with biocontrol capacity of *V. dahliae* were screened and complementary evaluation was done under greenhouse conditions. The *P. fluorescens* NZ105 strain was identified as the most effective biocontrol agent with 3.7 mm inhibition zones in Petri dish and 85% disease incidence reduction in greenhouse. This strain was identified based on the key tests and 16S rDNA gene amplification. The results of the greenhouse test showed that *P. fluorescens* NZ105 had the best performance in increasing plant growth factors including plant dry weight, dry root weight, plant height, root length, wet root weight and wet plant weight. Furthermore, the studies showed that this strain is capable of producing protease, volatile antifungal metabolites and extracellular metabolites.

Keywords: tomato, *Verticillum dahliae*, protease, metabolites, growth parameter

Archive of SID.ir