

## تأثیر انواع محیط کشت و زمان بر تولید متابولیت‌های ضد میکروبی توسط سودومونادهای فلورسنت

فاطمه جمالی<sup>۱\*</sup>، عباس شریفی تهرانی<sup>۲</sup>، مسعود احمدزاده<sup>۳</sup> و کیوان بهبودی<sup>۴</sup>  
<sup>۱</sup>، استادیار گروه اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه خلیج فارس بوشهر  
<sup>۲</sup>، <sup>۳</sup>، <sup>۴</sup>، استاد، دانشیار و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران  
 (تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۱۰ - تاریخ تصویب: ۸۹/۲/۲۰)

### چکیده

شناسایی عوامل محیطی که در تنظیم بیوستز آنتی‌بیوتیک‌ها توسط سودومونادهای فلورسنت مؤثر است گامی مؤثر در زمینه افزایش توانایی این باکتری‌ها در بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی به شمار می‌رود. بررسی نه جدایه سودوموناد فلورسنت به کار رفته در جلوگیری از رشد قارچ *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه لویبا با استفاده از روش HPLC نشان داد که سه جدایه Pf-100، Pf-101 و Pf-68 قادر به تولید آنتی‌بیوتیک‌های ۲ و ۴-دی استیل فلوروگلوکوسینول (DAPG)، مونواستیل فلوروگلوکوسینول (MAPG) و پایولوتورین (Plt) بودند. بررسی تأثیر انواع محیط کشت و زمان بر تولید آنتی‌بیوتیک DAPG نشان داد که در محیط کینگ ب پراث (KB) جدایه Pf-100 و در محیط کینگ ب پراث فاقد گلیسرول و حاوی ده گرم گلوکز به عنوان منبع کربن (KBG) و محیط Yeast Malt (YM) هر سه جدایه قادر به تولید DAPG بودند و غلظت آنتی‌بیوتیک بسته به زمان متفاوت بود. در محیط Glycerol-Casaminoacids-medium (GCM) فقط دو جدایه Pf-101 و Pf-68 در زمان ۲۴ ساعت تولید DAPG کردند. تولید MAPG توسط جدایه‌های Pf-68 و Pf-101 بر محیط KBG و توسط هر سه جدایه در محیط YM مشاهده گردید که میزان تولید آن با گذشت زمان کاهش یافت. هر سه جدایه بر محیط KB تولید پایولوتورین کردند که غلظت این آنتی‌بیوتیک در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب برای جدایه‌های Pf-100، Pf-101 و Pf-68 به حداکثر میزان خود رسید. در محیط کشت KBG نیز تولید Plt توسط هر سه جدایه مشاهده گردید ولی میزان آن نسبت به محیط KB کمتر بود.

واژه‌های کلیدی: ۲-۴-دی استیل فلوروگلوکوسینول، مونواستیل فلوروگلوکوسینول، پایولوتورین، سودومونادهای فلورسنت، *Rhizoctonia solani*

## مقدمه

استرین‌های خاصی از سودومونادهای فلورسنت ساکن ریزوسفر به دلیل دارا بودن توانایی حفاظت از گیاهان در برابر بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و نامتدی در سال‌های اخیر توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (Haas & Défago, 2005). توانایی تولید متابولیت‌های ضد میکروبی نظیر ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوکوسینول<sup>۱</sup> (DAPG)، پایولوتورین<sup>۲</sup> (Plt)، سیانید هیدروژن<sup>۳</sup> و فنازین‌ها<sup>۴</sup> (Haas & Keel, 2003; Hass & Défago, 2005). کلنیزاسیون ریزوسفر (Lugtenberg & Dekkers, 1999) و القای مقاومت سیستمیک در گیاه میزبان (Maurhofer et al., 1994a; De Meyer et al., 1999) از جمله خصوصیات مهم این باکتری‌ها هستند که در حفاظت از گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. متأسفانه کارایی متغیر اغلب استرین‌های بیوکنترل در زمان‌های مختلف کاشت محصول و نیز در مکان‌های مختلف از جمله موانع عمده توسعه تجاری این عوامل بیوکنترل بوده و تعداد نسبتاً اندکی از آنها برای استفاده به عنوان عوامل بیولوژیک در کشاورزی به ثبت رسیده‌اند (Cook, 1993). اغلب این تغییر پذیری مربوط به تفاوت در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی محیط‌های طبیعی است که عوامل بیوکنترل در آنجا به کار برده می‌شوند (Thomashow & Weller, 1997; Duffy et al., 1996). شناسایی عوامل محیطی مهم و چگونگی تأثیر این عوامل بر بازدارندگی از بیمارگرها راهی برای غلبه بر این مشکل و افزایش قدرت بیوکنترل در باکتری‌ها می‌باشد.

در بسیاری از سیستم‌های بیمارگر- میزبان، مکانیسم اولیه بیوکنترل توسط سودومونادهای فلورسنت تولید آنتی‌بیوتیک می‌باشد (Thomashow & Weller, 1996). تحت شرایط خاص آنتی‌بیوتیک‌ها موجب سازگاری اکولوژیکی این باکتری‌ها و در نتیجه، تأثیر طولانی مدت بیوکنترل می‌شوند (Mazzola et al., 1992). آنتی‌بیوتیک‌ها همچنین ممکن است به عنوان عوامل

تنش یا سیگنال‌های القاء‌کننده مقاومت موضعی یا سیستمیک در گیاه میزبان عمل کنند (Leeman et al., 1996).

یکی از مهمترین ترکیبات ضد میکروبی که توسط استرین‌های بیوکنترل *Pseudomonas fluorescens* تولید می‌شود ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوکوسینول (DAPG) می‌باشد. این آنتی‌بیوتیک دارای طیف فعالیت وسیعی علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها و کرم‌های حلقوی بوده و نیز دارای خاصیت گیاه سوزی است (Fenton et al., 1992; Keel et al., 1992; Maurhofer et al., 1992; Shanahan et al., 1992; Dowling & O'Gara, 1994; Nowak-Thompson et al., 1994).

مطالعات بسیاری نقش تعیین‌کننده تولید DAPG توسط سودومونادهای فلورسنت در کنترل انواع بیمارگرهای گیاهی را به اثبات رسانده‌اند (Keel & Défago, 1997; Haas & Keel, 2003). مدارک مبنی بر نقش DAPG در کنترل بیمارگرها عمدتاً از مطالعه موتانت‌هایی که دارای نقص در تولید DAPG بوده و قادر به حفاظت از گیاهان نمی‌باشند و نیز از اثبات تولید این آنتی‌بیوتیک در ریزوسفر به دست آمده است (Keel et al., 1992; Bonsall et al., 1997; Raaijmakers et al., 1999). سودومونادهای فلورسنت مولد DAPG در ریزوسفر انواع محصولات یافت شده و از جمله میکروارگانیزم‌های مهم در خاک‌های با بازدارندگی طبیعی نسبت به پاختوره گندم (Raaijmakers & Weller, 1998) و پوسیدگی سیاه ریشه توتون به‌شمار می‌آیند (Ramette et al., 2003).

پایولوتورین (Plt) یک آنتی‌بیوتیک آروماتیک است که به وسیله استرین‌های خاصی از *P. fluorescens* جمله استرین‌های Pf-5 و CHA0 تولید می‌شود. Plt قادر به بازدارندگی مؤثر از بیمارگر گیاهی *Pythium ultimum* و کنترل بیماری‌های گیاهی ایجاد شده توسط این عامل بیماریزا می‌باشد (Howell & Stipanovic, 1980; Maurhofer et al., 1992; Maurhofer et al., 1994b). استرین *P. fluorescens* CHA0/3090، که DAPG و Plt بیشتری نسبت به استرین تیپ وحشی خود تولید می‌کند، دارای توانایی بیشتری در کنترل مرگ گیاهچه پیتی یومی خیار در مقایسه با تیپ وحشی

1. 2,4- Diacetylphloroglucinol
2. Pyoluteorin
3. Hydrogen cyanide
4. Phenazines

مزیتی بسیار مهم به شمار می‌رود زیرا اغلب استرین‌های مؤثر در بیوکنترل، چندین ترکیب ضد میکروبی تولید می‌کنند که احتمالاً به نوع خاک، گیاه میزبان و بیمارگر، مرحله پیشرفت بیماری و سایر شرایط محیطی بستگی دارد (Thomashow & Weller, 1996).

هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر زمان و انواع محیط‌های کشت مایع بر تولید متابولیت‌های ضد میکروبی توسط برخی جدایه‌های ایرانی *P. fluorescens* و شناسایی و تعیین کمیت این متابولیت‌ها توسط روش کروماتوگرافی مایع کارا<sup>۶</sup> (HPLC) می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از جدایه‌های باکتریایی

نه جدایه *P. fluorescens* به کار گرفته شده در ممانعت از رشد قارچ *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی ریشه و مرگ گیاهچه لوبیا (Jamali, 2009) (جدول ۱)، از نظر تولید آنتی‌بیوتیک با استفاده از روش HPLC مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها به روش Maurhofer et al. (1992) و Notz et al. (2001) انجام پذیرفت. در ابتدا جدایه‌ها در محیط کینگ ب برات<sup>۷</sup> (KB) در دمای ۲۷°C بر شیکر با ۱۴۳ دور در دقیقه کشت شدند. در مرحله بعد جدایه‌هایی که آنتی‌بیوتیک تولید کردند (Pf-100, Pf-68) (Pf-101, Pf-68)، در محیط‌های کشت عصاره مالت، محیط گلیسرول کازامینواسید<sup>۸</sup> (GCM)، محیط عصاره مخمر-عصاره مالت<sup>۹</sup> (YM)، KB و کینگ ب برات فاقد گلیسرول و حاوی ۱۰ درصد گلوکز به عنوان تنها منبع کربن (KBG) در سه تکرار و تحت شرایط فوق کشت شدند. استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها طی چهار روز متوالی صورت گرفت. محیط کشت GCM متشکل از دو محلول A (۵ گرم کازامینو اسید، ۲۰ گرم گلیسرول و ۰/۷۵ گرم  $K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$  در یک لیتر آب مقطر) و B (۱/۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر) بود. محیط عصاره مالت شامل ۱۵ گرم عصاره مالت در یک

است (Maurhofer et al., 1992). به نظر می‌رسد افزایش قدرت کنترل این بیماری به دلیل افزایش تولید Plt باشد چون Plt نسبت به DAPG دارای سمیت بسیار بیشتری برای *P. ultimum* است. علاوه بر این تیمار بذور پنبه با Plt موجب جلوگیری از مرگ گیاهچه ناشی از *Pythium* می‌گردد (Howell & Stipanovic, 1980). با اینحال، توانایی حفاظت از پنبه در مقابل *P. ultimum* در موتانت‌های Plt- منفی استرین Pf-5 کاهش نیافت که این نشان می‌دهد تولید Plt به وسیله استرین Pf-5 در بازدارندگی از مرگ گیاهچه این گیاهان نقش ندارد (Kraus & Loper, 1992). نتایج Maurhofer et al. (1994b) نشان داد که تولید پایولوتورین بسته به گیاه میزبان در بازدارندگی از مرگ گیاهچه توسط استرین CHA0 نقش دارد. این پژوهشگران حدس زدند که نقش Plt در کنترل بیماری با میزان تولید این آنتی‌بیوتیک در ریزوسفر که تحت تأثیر ترشحات گیاه میزبان قرار دارد تعیین می‌شود.

بیوسنتز آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر ترکیبات ضدقارچی در سودومونادهای فلورسنت به وسیله حسگرها<sup>۱</sup> و تنظیم‌کنندگان پاسخ<sup>۲</sup> کد شده به وسیله ژن‌های *lemA* و *gacA* (Gaffeny et al., 1994; Corbell & Loper, 1995) و *rpoD* (Sarniguet et al., 1995) و *rpoS* (Schnider et al., 1995) و خودالقاءهایی<sup>۴</sup> نظیر ان-اسیل-هموسرین لاکتون‌ها<sup>۵</sup> (Pierson et al., 1998) تنظیم می‌شوند. تعیین سیگنال‌های محیطی خارجی که بر بیوسنتز متابولیت‌های ضد قارچی تأثیر می‌گذارند پیشرفت اندکی داشته است زیرا جداسازی و تعیین کمیت متابولیت‌های تولید شده در خاک بسیار مشکل است (Thomashow & Weller, 1996). غربال در محیط کشت مایع، روشی جالب برای شناسایی سیگنال‌های محیطی رایج است زیرا نیازمند اطلاعاتی مختصر از جایگاه‌های ژنی بوده و همچنین شناسایی همزمان چندین متابولیت را امکان‌پذیر می‌سازد. مورد اخیر

6. High-Performance Liquid Chromatography  
7. King'S B broth  
8. Glycerol-Casaminoacids-Medium  
9. Yeast-Malt

1. Sensor  
2. Response regulators  
3. Sigma factors  
4. Autoinducer  
5. N- acyl-homoserine lactone

جدول ۱- سودوموناس‌های فلورسنت مورد بررسی در این تحقیق، مشخصات میزبان و محل یا منبع جمع‌آوری آنها

نام جدایه	گیاه میزبان	منبع یا محل جمع‌آوری
Pf-100	آفتابگردان	کاشان
Pf-101	آفتابگردان	کاشان
Pf-G	آفتابگردان	کاشان
Pf-F	آفتابگردان	کاشان
Pf-C	آفتابگردان	کاشان
Pf-D18	لوبیا	مزرعه پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
UTPf81	برنج	کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران
UTPf32	گندم	کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران
Pf-68	کلزا	کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران

گرفت. جهت دستیابی به پیک استاندارد ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های خالص هر آنتی‌بیوتیک در ۵۰۰ میکرولیتر متانل مخصوص HPLC حل شد. ۱۰ میکرولیتر از نمونه‌ها با سه شیب خطی متانل از ۱۸-۲۳٪ (صفر تا ۵ دقیقه)، از ۲۳-۵۳٪ (۵ تا ۶ دقیقه)، و از ۵۳-۶۸٪ (۶-۱۵ دقیقه) در ۴۳٪ اورتو فسفریک اسید آنالیز شده و سرعت جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. DAPG، MAPG و Plt به وسیله جذب اشعه ماوراء بنفش در طول موج‌های ۲۷۰، ۲۹۰ و ۳۳۰ ردیابی شدند. زمان تأخیر<sup>۱</sup> برای آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر به ترتیب ۸/۷، ۷/۴ و ۱/۸ دقیقه بود. کمیت آنتی‌بیوتیک‌ها بر اساس پیک استاندارد و زمان تأخیر، بر حسب میکرومول در میلی لیتر محیط کشت محاسبه گردید. این آزمایش در قالب آزمایش فاکتوریل سه فاکتوره (جدایه، محیط کشت و زمان) با طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. داده‌های به دست آمده از آزمایش (میزان آنتی‌بیوتیک) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن ( $p \leq 0.05$ ) انجام شد.

### نتایج و بحث

سودومونادهای فلورسنت قادر به تولید انواع متابولیت‌های ضد میکروبی در ریزوسفر گیاهان میزبان می‌باشند که در کنترل بیمارگرهای گیاهی نقش بسزایی را ایفا می‌کنند. از میان نه جدایه سودوموناد فلورسنت مورد آزمایش، سه جدایه Pf-68، Pf-100، Pf-101

لیتر آب مقطر و محیط YM حاوی ۳ گرم عصاره مالت، ۳ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم باکتو پپتون و ۱۰ گرم گلوکز در یک لیتر آب مقطر بود.

نمونه‌گیری و استخراج آنتی‌بیوتیک‌ها از ۳۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت فوق پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت صورت گرفت. حجم خاصی از اسیدکلریدریک دو نرمال به محیط‌های کشت افزوده شد تا اسیدیتته محیط به دو الی سه برسد. سپس اتیل‌استات به نسبت یک به یک به محیط کشت اضافه شد. درب ارلن‌های حاوی محیط کشت و اتیل‌استات به وسیله درپوش بسته و به مدت ۳۰ ثانیه به شدت تکان داده شدند. فاز آلی (حاوی آنتی‌بیوتیک‌ها) از فاز مایع روئی (حاوی باکتری‌ها و مواد معدنی) به وسیله فیلترهای با پوشش سیلیکونی (Macherey-Nagel 5160 Düren, Germany) جدا شد. اتیل‌استات در دستگاه روتاری (HETO VAC; Heto Lab Equipment, Allerød, Denmark) به طور کامل تبخیر گردید و باقیمانده در یک میلی‌لیتر متانل مخصوص HPLC حل شد. این محلول پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در  $20^{\circ}\text{C}$ ، به مدت ۱۰ دقیقه در  $13000$  دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس فاز مایع رویی به فلاسک‌های HPLC منتقل گردید.

### ردیابی و تعیین کمیت آنتی‌بیوتیک‌ها

ردیابی و اندازه‌گیری کمی آنتی‌بیوتیک‌ها به وسیله دستگاه HPLC مجهز به شناساگر (Hewlett packard) استفاده از ستون به ابعاد  $4 \times 100$  میلی‌لیتر از نوع nucleosil 120-5-C18 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) با روش فاز معکوس در دمای  $45^{\circ}\text{C}$  صورت

1. Retention time

باکتری‌ها بود. محیط YM از نظر آماری ( $p \leq 0.05$ ) دارای بیشترین تأثیر بر میزان تولید DAPG بود. در محیط کشت KB، فقط جدایه Pf-100 پس از ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۲/۹ و ۰/۶۵ میکرومول آنتی‌بیوتیک DAPG تولید کرد. در محیط KBG تولید DAPG سه جدایه مشاهده گردید (شکل ۱). تولید آنتی‌بیوتیک در جدایه Pf-68 در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت افزایش یافت و پس از ۹۶ ساعت کاهش تولید مشاهده گردید. جدایه Pf-101 میزان آنتی‌بیوتیک بیشتری را در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت نسبت به ۴۸ و ۹۶ ساعت تولید کرد (شکل ۱). تولید این آنتی‌بیوتیک در جدایه Pf-100 تنها در زمان ۲۴ ساعت و به میزان ۱/۳ میکرومول در میلی‌لیتر محیط کشت مشاهده شد. در محیط GCM دو جدایه Pf-101 و Pf-68 در زمان ۲۴ ساعت آنتی‌بیوتیک DAPG تولید کردند (به ترتیب ۰/۵ و ۰/۶ میکرومول در میلی‌لیتر محیط کشت).

تولید MAPG در محیط کشت KB در هیچ‌کدام از جدایه‌ها مشاهده نشد ولی در محیط KBG میزان تولید بالای این آنتی‌بیوتیک در جدایه‌های Pf-68 و Pf-101 مشاهده گردید که میزان آن با گذشت زمان کاهش یافت (شکل ۱).

نتایج این بررسی نشان داد که در محیط کشت KB که دارای منبع کربن گلیسرول است تولید آنتی‌بیوتیک Plt توسط هر سه جدایه به میزان قابل توجهی افزایش یافت ولی وجود گلوکز به عنوان تنها منبع کربن در KBG موجب کاهش تولید این آنتی‌بیوتیک و افزایش تولید آنتی‌بیوتیک DAPG گردید. طبق یافته‌های سایر محققین، منابع کربنی که در ترشحات ریشه یافت می‌شوند دارای اثرات متفاوتی بر طیف آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط استرین‌های بیوکنترل هستند. مثلاً در *P. fluorescens* استرین‌های Pf-5، CHA0 و F113 گلوکز موجب ممانعت از تولید Plt می‌شود (Shanahan et al., 1992; Kraus & Loper, 1995; Duffy & Défago, 1999). ولی در جدایه HV37a گلوکز تولید این آنتی‌بیوتیک را افزایش می‌دهد (Douglas & Gutterson, 1986). Duffy & Défago (1999) نشان دادند که در استرین CHA0 تولید DAPG با  $Zn^{2+}$ ،  $NH_4Mo^{2+}$  و گلوکز تحریک می‌شود. تولید Plt با  $Zn^{2+}$

آنتی‌بیوتیک تولید کردند که میزان آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده بر حسب نوع محیط کشت و زمان متفاوت بود. Keel et al. (1996) نشان دادند که استرین‌های *P. fluorescens* مولد DAPG از نظر تولید آنتی‌بیوتیک به دو گروه فنوتیپی مشخص تفکیک می‌شوند: گروه اول قادر به تولید DAPG، Plt و HCN بوده و گروه دوم DAPG و HCN را تولید نموده ولی قادر به تولید Plt نمی‌باشد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جدایه‌های Pf-100، Pf-101، Pf-68 متعلق به گروه اول می‌باشند و هر سه متابولیت ضد میکروبی را تولید می‌کنند (این سه جدایه قادر به تولید HCN نیز می‌باشند، نتایج منتشر نشده). گزارش شده است که جدایه‌های *P. fluorescens* در محیط‌های کشت مایع ۲۰-۰/۱ میکروگرم در میلی‌لیتر Plt یا DAPG تولید می‌کنند (Shanahan et al., 1992; Kraus & Loper, 1995; Schneider et al., 1995).

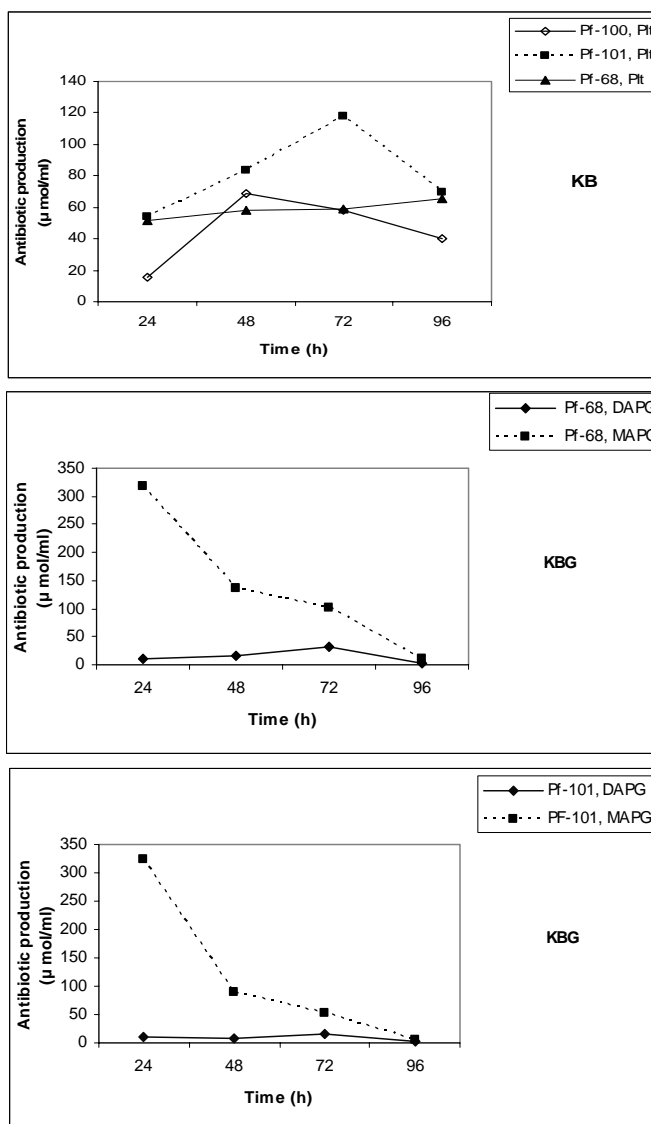
آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که محیط کشت و زمان دارای تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید Plt توسط سه جدایه مورد آزمایش بود. محیط KB از نظر آماری ( $p \leq 0.05$ ) دارای بیشترین تأثیر بر میزان تولید Plt بود و سایر محیط‌های کشت از نظر تأثیر بر میزان تولید این آنتی‌بیوتیک با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند. میزان تولید Plt در محیط کشت KB در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب برای جدایه‌های Pf-100، Pf-101 و Pf-68 به حداکثر میزان خود رسید (به ترتیب ۶۸، ۱۱۸ و ۶۵ میکرومول در میلی‌لیتر محیط کشت) (شکل ۱). در محیط کشت KBG که دارای گلوکز به عنوان تنها منبع کربن بود، تولید Plt توسط جدایه‌ها در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مشاهده گردید ولی میزان آن نسبت به محیط KB بسیار کاهش یافت. میزان تولید این آنتی‌بیوتیک در KBG برای جدایه‌های Pf-100 و Pf-101 در زمان ۷۲ ساعت به حداکثر میزان خود رسید که به ترتیب پنج و هفت برابر نسبت به محیط KB کاهش نشان داد (شکل ۱). تولید Plt در محیط‌های GCM، Malt و YM مشاهده نگردید.

تولید آنتی‌بیوتیک DAPG نیز در هر سه جدایه مشاهده گردید و محیط کشت و زمان دارای تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید این آنتی‌بیوتیک توسط

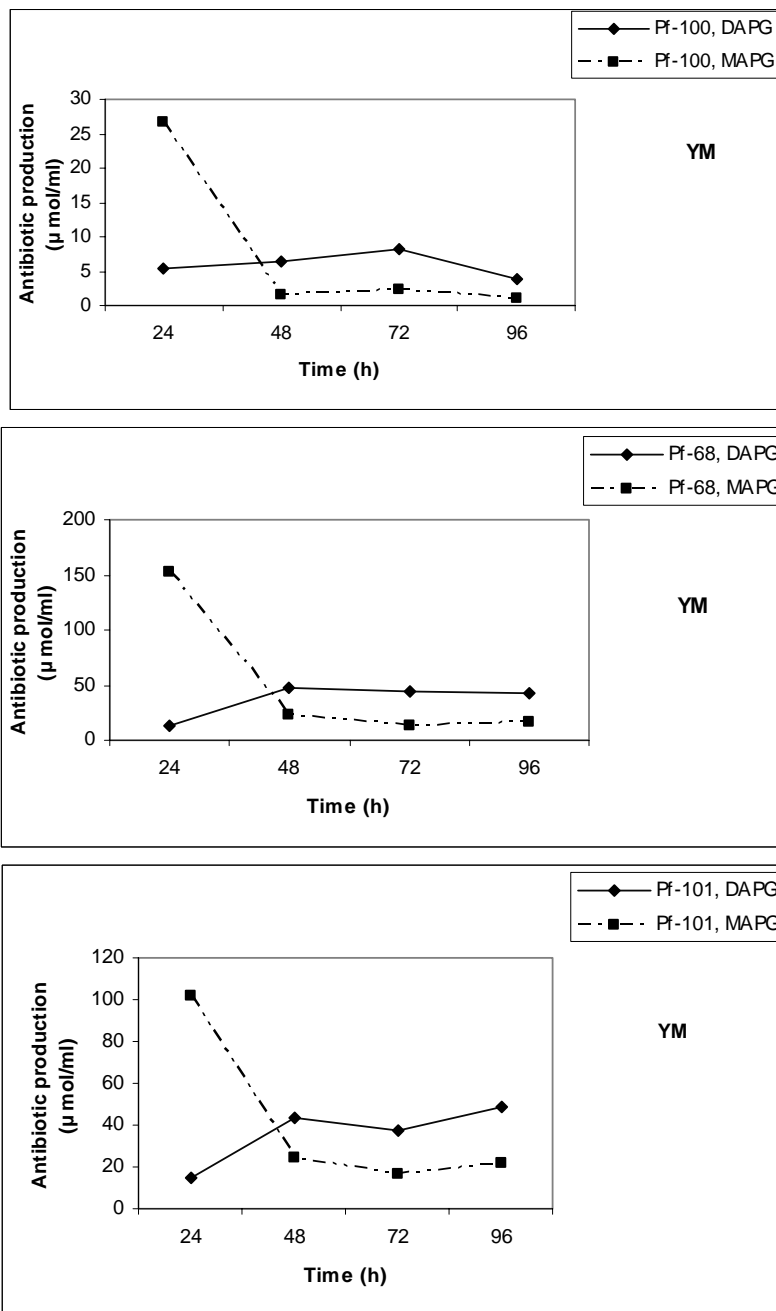
ولی در جدایه Pf-101 تولید آنتی‌بیوتیک با گذشت زمان افزایش نشان داد. در این محیط هر سه جدایه MAPG تولید کردند که میزان آن در جدایه‌های Pf-68 و Pf-101 بسیار بیشتر از Pf-100 بود (شکل ۲). محیط YM در مقایسه با محیط مالت دارای پنج برابر مالت کمتر و نیز گلوکز به عنوان منبع کربن است. به نظر می‌رسد مالت تأثیر ممانعت‌کنندگی بر تولید آنتی‌بیوتیک‌ها داشته باشد ولی گلوکز موجود در YM موجب تحریک تولید آنتی‌بیوتیک‌های DAPG و MAPG می‌گردد. از طرف دیگر عدم تولید Plt در محیط

$Co^{2+}$  و گلیسرول تحریک شده ولی گلوکز از تولید آن ممانعت می‌کند. همچنین تولید هر دو آنتی‌بیوتیک در استرین CHA0 توسط فسفات غیرآلی کاهش یافت (Duffy & Défago, 1999).

نتایج حاکی از این بود که محیط YM که دارای منبع کربن گلوکز بود موجب تحریک تولید DAPG و MAPG گردید و اثر ممانعت‌کنندگی بر تولید Plt داشت ولی در محیط مالت هیچکدام از جدایه‌ها آنتی‌بیوتیک تولید نکردند. در محیط YM تولید DAPG در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت بیش از زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعت بود



شکل ۱- تأثیر محیط‌های کشت KB و KBG بر میزان تولید آنتی‌بیوتیک‌های *P. fluorescens* Pf-100, Pf-101, Pf-68 توسط جدایه‌های MAPG, DAPG و Plt در زمان‌های مختلف. \* اعداد نمایش داده شده در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری، میانگین سه تکرار می‌باشند.



شکل ۲- تأثیر محیط کشت YM بر میزان تولید آنتی‌بیوتیک‌های DAPG و MAPG توسط جدایه‌های *P. fluorescens* Pf-100, Pf-101, Pf-68 در زمان‌های مختلف \* اعداد نمایش داده شده در زمان‌های مختلف نمونه‌گیری، میانگین سه تکرار می‌باشند.

دارد. طبق تحقیقات Duffy & Défago (1999)، فسفات غیر آلی موجب بازدارندگی از تولید DAPG و به میزان کمتری Plt می‌گردد. همچنین Keel et al. (1996) دریافتند که تنها برخی از استرین‌های *P. fluorescens* در محیط KB که حاوی  $K_2HPO_4$  می‌باشد DAPG تولید می‌کنند. در تحقیق حاضر نیز به نظر می‌رسد

این حدس را بر می‌انگیزد که در این محیط نیز نوع منبع کربن موجود یعنی گلوکز موجب ممانعت از تولید Plt شده است.

نتایج دیگر این تحقیق نشان داد که در محیط KB آنتی‌بیوتیک Plt به میزان قابل ملاحظه‌ای تولید می‌شود ولی این محیط بر تولید DAPG اثر ممانعت‌کنندگی

توسط متابولیت‌های خارج سلولی، به باکتری اجازه سازگاری و تنظیم سطوح این متابولیت‌ها در پاسخ به تغییرات محیطی را اعطا می‌کند.

ترشحات ریشه حاوی دامنه وسیعی از ترکیبات آلی نظیر آمینواسیدها، قندها و اسیدهای آلی است (Benizri *et al.*, 1998). تغییر و مصرف این ترکیبات دارای تأثیر چشمگیری بر تولید متابولیت‌های ثانویه توسط باکتری‌ها می‌باشد. نسبت بالای منابع کربن به نیتروژن و نیز محدودیت ایجاد شده به وسیله فسفات غیر آلی از جمله عواملی هستند که بر تولید DAPG و Plt در استرین *P. fluorescens* S272 تأثیر می‌گذارند (Yuan *et al.*, 1998). از سوئی دیگر تفاوت‌های کمی و کیفی در ترکیبات قندی ترشحات ریشه می‌تواند مکانیسم غالب بیوکنترول در سیستم‌های بیمارگر-میزبان را تعیین نماید؛ به عنوان مثال، DAPG در بیوکنترول بیماری در گندم و خیار نقش دارد و Plt نقش مهمی را در ممانعت از بیماری ایفا نمی‌کند ولی در کرفس و توتون آنتی‌بیوتیک Plt نقش کلیدی را در بیوکنترول بازی می‌کند (Maurhofer *et al.*, 1994b; Lemanceau *et al.*, 1995).

#### نتیجه‌گیری کلی

با یافتن محیط کشت مناسب برای رشد باکتری‌ها و تنظیم تولید آنتی‌بیوتیک‌ها توسط آنها، می‌توان کیفیت مایه تلقیح باکتریایی را بهبود بخشید. کاهش تولید Plt و DAPG با انتخاب محیط کشت مناسب از مشکلات گیاه‌سوزی ایجاد شده توسط این آنتی‌بیوتیک‌ها ممانعت خواهد کرد. از طرف دیگر افزایش میزان آنتی‌بیوتیک‌ها با رشد باکتری‌ها روی یک محیط کشت خاص موجب حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرهایی می‌شود که بسیار سریع استقرار یافته و مانع از استقرار رایزوباکتری‌ها و تولید متابولیت‌های ضد میکروبی توسط آنها می‌شوند.

$K_2HPO_4$  موجود در محیط KB موجب ممانعت از تولید DAPG شده است در حالی که بر تولید Plt تأثیری نداشت.

نتایج نشان داد که در محیط‌های YM و KBG که میزان تولید بالای DAPG مشاهده می‌گردد میزان تولید MAPG نیز بالاست. از طرف دیگر، با توجه به اینکه MAPG پیش ماده DAPG می‌باشد مقدار آن در زمان ۲۴ ساعت بالا بوده و سپس همزمان با افزایش تولید DAPG غلظت پیش ماده آن کاهش می‌یابد (شکل‌های ۱ و ۲). طبق نظر Duffy & Défago (1999) عواملی که موجب تحریک تولید DAPG می‌شوند بر تولید ترکیب MAPG که پیش ماده آنتی‌بیوتیک DAPG و یا حاصل تجزیه این آنتی‌بیوتیک می‌باشد نیز تأثیر مثبت دارند.

در تحقیق حاضر مشاهده شد که در محیط KB که غلظت Plt بسیار بالا بود تولید DAPG مشاهده نشد و یا در محیط KBG هر دو آنتی‌بیوتیک DAPG و Plt در سطح متعادلی نسبت به هم دیده شدند. همچنین در محیط YM که DAPG و MAPG به میزان زیادی تولید شدند آنتی‌بیوتیک Plt تولید نشد. این مشاهدات با نتایج Maurhofer *et al.* (1994b) نیز هماهنگ بود. آنان مشاهده کردند که استرین CHA0 در محیط KB میزان Plt بسیار بالایی تولید می‌کند و سطوح DAPG به طور معکوس با غلظت Plt مرتبط است.

طبق تحقیقات Schnider-Keel *et al.* (2000) در استرین CHA0، پاپولوتورین و سالیسیلیک اسید (متابولیت‌های خارج سلولی تولید شده توسط این استرین و سایر سودومونادها) و نیز فوزاریک اسید (توکسین تولید شده توسط قارچ *Fusarium oxysporum*) موجب توقف مدار خود القایی در تولید DAPG می‌گردند. طبق نظر این پژوهشگران واکنش‌های خود القایی و بازدارندگی از تولید DAPG

#### REFERENCES

1. Banger, M. G. & Thomashow, L. S. (1999). Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, 4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *Journal of Bacteriology*, 181(10), 3155-3163.
2. 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 & Biochemistry*, 30(10, 11), 1481-1484.
3. Bonsall, R. F., Weller, D. M. & Thomashow, L. S. (1997). Quantification of 2, 4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Applied &*



- Environmental Microbiology*, 63(3), 951-955.
4. Cook, R. J. (1993). Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 53-80.
  5. Corbell, N. & Loper, J. E. (1995). A global regulator of secondary metabolite production in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Journal of Bacteriology*, 177(21), 6230-6236.
  6. De Meyer, G., Capieau, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J. & Höfte, M. (1999). Nanogram amount of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 12(5), 450-458.
  7. Douglas, W. J. & Gutterson, N. I. (1986). Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose. *Applied & Environmental Microbiology*, 52(5), 1183-1189.
  8. Dowling, D. N. & O'Ggara, F. (1994). Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*, 12(44), 133-141.
  9. Duffy, B. K. & Défago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied & Environmental Microbiology*, 65(6), 2429-2438.
  10. Duffy, B. K., Ownley, B. H. & Weller, D. M. (1997). Soil chemical and physical properties associated with suppression of take-all of wheat by *Trichoderma koningii*. *Phytopathology*, 87(11), 1118-1124.
  11. Fenton, A. M., Stephens, P. M., 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(12), 3873-3878.
  12. Gaffney, T. D., Lam, S. T., Ligon, J., Gates, K., Frazelle, A., Di Maio, J., Hill, S., Goodwin, S., Torkewitz, N., Allshouse, A. M., Kempf, H. J. & Becker, J. O. (1994). Global regulation of expression of antifungal factors by a *Pseudomonas fluorescens* biological control. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 7(4), 455-463.
  13. Haas, D. & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307-319.
  14. Haas, D. & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 117-153.
  15. Howell, C. R. & Stipanovic, R. D. (1980). Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*, 70(8), 712-715.
  16. Jamali, F. (2009). *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. dissertation. University of Tehran, University College of Agricultural and Natural Resources, Iran. (In Farsi).
  17. Keel, C. & Défago, G. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. In: A. C. Gange & V. K. Brown (Eds.), *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. (pp. 27-46). The 36<sup>th</sup> Symposium of the British Ecological Society, Royal Holloway College, University of London, UK, Blackwell Science.
  18. 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(1), 4-13.
  19. Keel, C., Weller, D. M., Natsch, A., Défago, G., Cook, R. J. & Thomashow, L. S. (1996). Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Applied & Environmental Microbiology*, 62(2), 552-563.
  20. Kraus, L. & Loper, J. E. (1992). Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber. *Phytopathology*, 82(3), 264-271.
  21. Kraus, J. & Loper, J. E. (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(3), 849-854.
  22. Leeman, M., Den Ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Dirx, F. P., Steijl, M., H., Bakker, P. A. H. M. & Schippers, B. (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to *Fusarium* wilt of radish in commercial greenhouse trials by seed treatment with *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *Phytopathology*, 86(2), 149-155.
  23. Lemanceau, P., Corberand, T., Gardan, L., Latour, L., Laguerre, G., Boeufgras, J. M. & Albouvette, C. (1995). Effect of two plant species flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum*

- Mill.) on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Applied & Environmental Microbiology*, 61(3), 1004-1012.
24. Lugtenberg, B. J. J. & Dekkers, L. C. (1999). What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*, 1(1), 9-13.
  25. Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Mètraux, J. P. & Défago, G. (1994a). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, 84(2), 139-146.
  26. Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C. & Défago, G. (1992). Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82(2), 190-195.
  27. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. (1994b). 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(3, 4), 221-232.
  28. Mazzola, M., Cook, R. J., Thomashow, L. S., Weller, D. M. & L. S. Pierson. (1992). Contribution of phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied & Environmental Microbiology*, 58(8), 2616-2624.
  29. Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D. & Défago, G. (2001). Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology*, 91(9), 873-881.
  30. Nowak-Thompson, B., Gould, S. J., Kraus, J. & Loper, J. E. (1994). Production of the 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(12), 1046-1066.
  31. Pierson, L. S., Wood, D. W., Pierson, E. A. & Chancey, S. T. (1998). *N*-acyl-homoserine lactone-mediated gene regulation in biological control by fluorescent pseudomonads: current knowledge and future work. *European Journal of Plant Pathology*, 104(1), 1-9.
  32. Raaijmakers, J. M., Bonsall, R. F. & Weller, D. M. (1999). Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 89(6), 470-475.
  33. Raaijmakers, J. M. & Weller, D. M. (1998). Natural plant protection by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 11(2), 144-152.
  34. Ramette, A., Moënne-Loccoz, Y. & Défago, G. (2003). Prevalence of fluorescent pseudomonads producing antifungal phloroglucinol and/or hydrogen cyanide in soils naturally suppressive or conducive to tobacco black root rot. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 35-43.
  35. Sarniguet, A., Kraus, J., Henkels, M. D., Muehlchen, A. M. & Loper, J. E. (1995). The sigma factor  $\sigma^S$  affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(26), 12255-12259.
  36. Schnider, U., Keel, C., Blumer, C., Troxler, J., Défago, G. & Haas, D. (1995). Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *Journal of Bacteriology*, 177(18), 5387-5392.
  37. Schnider-Keel, U., Seematter, A., Maurhofer, M., Blumer, C., Duffy, B., Gigot-Bonnefoy, C., Reimann, C., Notz, R., Défago, G., Haas, D. & Keel, C. (2000). Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1215-1225.
  38. Shanahan, P., O'Sullivan, D. J., Simpson, P., Glennon, J. D. & O'Gara, F. (1992). Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied & Environmental Microbiology*, 58(1), 353-358.
  39. Thomashow, L. S. & Weller, D. M. (1996). Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In G. Stacey & N. T. Keen (Eds.), *Plant-microbe interactions*, (pp. 187-235). Chapman & Hall, New York, N. Y.
  40. Yuan, Z., Cang, S., Matsufuji, M., Nakata, K., Nagamatsu, Y. & Yoshimoto, A. (1998). High production of pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol by *Pseudomonas fluorescens* S272 grown on ethanol as a sole carbon source. *Journal of Fermentation & Bioengineering*, 86(6), 559-563.