دانش گیاهپزشکی ایران
دورهٔ ۴۶، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴ (ص ۱۲۹-۱۱۹)

اثر سه سویهٔ *Pseudomonas fluorescens* بر کلروفیل، کارتنویید و سه عنصر غذایی در ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی تلقیح‌شده با ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*)

عبدالله معصومی[۱]، ثمین حسینی[۲*]، روح‌الله صابری ریسه[۳] و احمد حسینی[۴]
۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیاران، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، کرمان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۱۲/۲)

چکیده

ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) یکی از ویروس‌های مهم خسارت‌زاست که مدیریت آن به علت دامنهٔ میزبانی وسیع و ناقلان زیاد، همواره مشکل‌زا بوده است. در این پژوهش برای کنترل این ویروس در ۱۶ ژنوتیپ مختلف لوبیای معمولی از سه سویهٔ CHA0، VUPF5 و ΔVUPF5 باکتری *Pseudomonas fluorescens* استفاده شد. بذرهای لوبیا قبل از کشت با سوسپانسیونی به میزان 10^8 cfu/cc از سویه‌های باکتری آغشته شدند. این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار انجام گرفت. در همهٔ تیمارها به‌جز شاهد سالم، بوته‌ها در مرحلهٔ دوبرگی با یک سویهٔ BYMV به طریق مکانیکی مایه‌زنی شدند و پس از برداشت بوته‌های لوبیا، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کارتنوییدها و سه عنصر غذایی روی، منیزیم و آهن ارزیابی شد. نتایج نشان داد که سویه‌های باکتریایی توانستند در بسیاری از ژنوتیپ‌ها میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل، کارتنوییدها، روی، منیزیم و آهن را به‌صورت معناداری نسبت به شاهد آلوده به ویروس افزایش دهند. در مجموع در میان سه سویه، ΔVUPF5 و CHA0 مؤثرتر از VUPF5 بودند و بهترین اثر مربوط به سویهٔ ΔVUPF5 بود.

واژه‌های کلیدی: کلروفیل و سودوموناس فلورسنت، لوبیای معمولی، ویروس موزاییک زرد لوبیا.

مقدمه

تعدادی از ویروس‌های گیاهی در شرایط مزرعه و آزمایشگاه خسارت زیادی به لوبیای معمولی (*Phaseolus vulgaris* L.) وارد می‌کنند و در مناطق تولید لوبیای معمولی به عنوان عوامل بازدارندهٔ مهمی عمل می‌کنند (Schwartz *et al.*, 2005). در بین ویروس‌های خسارت‌زا، ویروس موزاییک زرد لوبیا (*Bean yellow mosaic virus*, BYMV) یکی از ویروس‌های مهم در کاهش عملکرد محصول لوبیا محسوب می‌شود. در برخی مناطق، بسته به نوع رقم و زمان آلودگی میزان خسارت بین ۴۰ تا ۶۱ درصد متغیر است و روی گیاهان مختلف علائم متفاوتی از جمله خم شدن برگ‌های جوان، حلقه‌های کوچک یا برجستگی‌های سبزرد، بافت مردگی، ابلقی شدن و موزاییک برگ‌ها ایجاد می‌کند (Dasgupta *et al.*, 2003). این ویروس اولین بار در ایالات متحدهٔ آمریکا از روی لوبیای فرانسوی گزارش شده است (Doolittle & Jones, 1977; Jones, 1925). پیکرهٔ ویروس، رشته‌ای به طول ۷۵۰ نانومتر و عرض ۱۵ نانومتر و ژنوم آن یک قطعه RNA تک‌رشته‌ای با قطبیت مثبت است (King *et al.*, 2012). بیش از ۵۰ گونه شته قادرند این ویروس را از طریق ناپایا منتقل کنند. این ویروس در لوبیای

* تلفن: ۰۹۱۳۲۹۰۴۱۰۷
E-mail: s.hosseini@vru.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

معمولی و سویا بذربرد نیست ولی از طریق بذر باقلا انتقال می‌یابد (McKirdy *et al.*, 2000).

با توجه به دامنهٔ میزبانی وسیع و شته‌های ناقل متعدد، مدیریت این بیماری همواره مشکل بوده است. یکی از روش‌های مؤثر برای کنترل این بیماری بر اساس پژوهش‌های محدود انجام‌گرفته در دنیا، استفاده از باکتری *Pseudomonas fluorescens* به عنوان یکی از رایزوباکترهای مهم محرک رشد گیاهان (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) است که بخش شایان توجهی از جمعیت بومی را در خاک‌های بازدارنده و دیگر خاک‌ها تشکیل می‌دهد (Haas & Défago, 2005).

در پژوهش Elbardy *et al.* (2006)، با تیمار باکتری *P. fluorescens* به ژنوتیپ‌های باقلای آلوده به ویروس موزاییک زرد لوبیا، مشاهده شد که برخی از سویه‌های این باکتری علاوه بر رشد و تقویت گیاه، باعث کاهش چشمگیر غلظت ویروس در گیاه آلوده در مقایسه با گیاه شاهد می‌شوند و در شرایط گلخانه‌ای تلقیح سودوموناس به بذور باعث کاهش شایان توجه درصد ایجاد بیماری و کاهش غلظت ویروس در گیاهان آلوده می‌شود (Elbardy *et al.*, 2006).

رایزوباکترهای محرک رشد گیاهان به‌طور مستقیم از طریق تسهیل منبع گیرش یا تغییر سطح هورمون‌های گیاهی موجب افزایش رشد گیاهان و به‌طور غیرمستقیم از طریق مکانیسم‌های بیوکنترل باعث ناسازگاری عوامل بیمارگرهای گیاهی می‌شوند (Glick, 2012).

در پژوهش حاضر اثر سه سویهٔ CHA0، VUPF5 و سویهٔ ΔVUPF5 (موتانت *gacA* در VUPF5) باکتری *P. fluorescens* بر میزان کلروفیل، کارتنویید، غلظت عناصر روی، منیزیم و آهن در ژنوتیپ‌های مایه‌زنی‌شده با یک جدایهٔ BYMV بررسی شد. در پژوهش‌های پیشین سویهٔ VUPF5 در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای خاک‌برد از قبیل پاخورهٔ گندم، ریزوکتونیا و برخی نماتدها موفقیت چشم‌گیری داشته است (Lagzian *et al.*, 2013).

مواد و روش‌ها

تکثیر جدایهٔ J2 ویروس موزاییک زرد لوبیا

یک جدایهٔ ویروس موزاییک زرد لوبیا با نام J2 (جمع‌آوری‌شده از مزارع شهرستان جیرفت) از کلکسیون بخش ویروس‌شناسی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان انتخاب شد. این جدایه روی گیاه لوبیا در مرحلهٔ دوبرگی مایه‌زنی مکانیکی شد. برای مایه‌زنی از بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار با اسیدیته هفت استفاده شد. گیاهان مایه‌زنی‌شده در گلخانه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجهٔ سلسیوس و دورهٔ روشنایی ۱۶ ساعت در شبانه‌روز نگهداری شدند. برای اطمینان از تکثیر ویروس از آزمون داس الیزا با استفاده از آنتی‌بادی چندهمسانه‌ای اختصاصی BYMV (As-0471, DSMZ, Germany) و بر اساس دستورالعمل کلارک و آدامز استفاده شد (Clark and Adams, 1977). نتایج پس از گذشت حدود ۳۰ دقیقه با دستگاه الیزاخوان (BioTek ELX-808, USA) با طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شدند. نمونه‌هایی که میزان جذب نوری‌شان بیشتر از دو برابر میانگین جذب نوری نمونه‌های منفی بود، به‌عنوان مثبت در نظر گرفته شدند.

سویه‌های باکتری سودوموناس فلورسنت

سویه‌های VUPF5، ΔVUPF5 و CHA0 از باکتری *P. fluorescens* موجود در کلکسیون بخش کنترل بیولوژیک دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان انتخاب شدند. سویه‌های باکتریایی انتخابی ۴۸ ساعت قبل از کشت لوبیا، به‌صورت انبوه روی محیط کشت King B کشت داده شدند. سپس یک سوسپانسیون باکتریایی به میزان 10^8 cfu/cc (OD_{540}=۰/۵) تهیه شد. برای آغشته‌سازی بذور ژنوتیپ‌های لوبیا به هر سویهٔ باکتری، کربوکسی‌متیل‌سلولز به نسبت ۰/۵٪ به سوسپانسیون‌ها افزوده شد (Ownley *et al.*, 2003).

آغشته کردن بذور لوبیا با سوسپانسیون سویه‌های باکتری

بذور ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا با نام‌های چیتی صدری، چیتی Ks، چیتی خمین، چیتی عراقی، چیتی تلاش، سفید دانشکده، سفید درسا، سفید دهقان، سفید پاک، سفید شکوفا، قرمز صیاد، قرمز گلی، قرمز دهاقان، قرمز اختر، قرمز درخشان و قرمز ناز به‌مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم دو درصد ضدعفونی سطحی شدند و

Archive of SID

www.SID.ir

با آب مقطر سترون سه بار شسته شدند و سپس درون سوسپانسیون باکتری به‌مدت نیم ساعت روی شیکر ۷۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. در نهایت بذور در شرایط سترون به‌مدت ۱۵ دقیقه روی کاغذ صافی خشک و آماده کشت شدند.

طرح آزمایشی

این آزمایش در قالب فاکتوریل به‌صورت طرح کاملاً تصادفی و در بستر کشت حاوی کوکوپیت و خاک سترون در شرایط گلخانه انجام گرفت. ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا در تیمار اول (T1) و دوم (T2)، که به‌ترتیب مربوط به گیاهان شاهد سالم بدون مایه‌زنی به ویروس و تیمار شاهد آلوده مربوط به بذور لوبیای مایه‌زنی‌شده به ویروس بدون آغشته شدن به باکتری تحت بررسی بود، در چهار تکرار کشت شد. در تیمار سوم (T3)، چهارم (T4) و پنجم (T5)، برای ارزیابی اثر سویه‌های باکتریایی بر میزان کلروفیل، کارتنویید و غلظت عناصر روی، منیزیم و آهن بر ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای تحت بررسی، آغشته‌سازی با روش ذکرشده به‌ترتیب با سویه‌های VUPF5، ΔVUPF5 و CHA0 باکتری *P. fluorescens* انجام گرفت. حدود ۱۵ روز بعد از تاریخ کشت، به‌طور هم‌زمان ژنوتیپ‌های مختلف لوبیا در طرح‌های آماری دو تا پنج در مرحلهٔ دوبرگی کوتیلدونی به روش مکانیکی با جدایهٔ J2 ویروس موزاییک زرد لوبیا مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی، نمونه‌های آلوده به ویروس به نسبت ۱ به ۱۰ در بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵مولار با اسیدیته ۷، عصاره‌گیری شدند و با کمک پودر کاربراندوم به برگ‌های گیاهان محک، مایه‌زنی و سپس در شرایط گلخانه با دمای ۳۰-۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند. تیمار اول به عنوان شاهد سالم نگهداری شد و به ویروس آلوده نشد. بعد از ظهور علائم در گیاهان شاهد آلوده، بوته‌های موجود در تیمارهای مختلف با آزمون داس الیزا و آنتی‌بادی اختصاصی BYMV بررسی شدند (Clark & Adams, 1977).

سنجش غلظت کلروفیل و کارتنویید گیاه

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل a، b، مجموع کلروفیل و مجموع کارتنوییدها، از روش آرنون استفاده شد. میزان جذب نور محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل T80UV/VIS spectrometer PG) در طول موج‌های ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵، ۶۴۶ و ۶۶۳ نانومتر قرائت شد و در نهایت غلظت کلروفیل و کارتنویید با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (Arnon, 1949).

کلروفیل a ($mg.g^{-1}fw$) =

$$[[(۱۲/۷ \times OD\ ۶۶۳) - (۲/۶۹ \times OD\ ۶۴۵\ ] \times V] \div [۱۰۰۰ \times W]$$

کلروفیل b ($mg.g^{-1}fw$) =

$$[[(۲۲/۹ \times OD\ ۶۴۵) - (۴/۶۸ \times OD\ ۶۳۳\ ] \times V] \div [۱۰۰۰ \times W]$$

کلروفیل کل ($mg.g^{-1}fw$) =

$$[[(۸/۰۲ \times OD\ ۶۶۳) - (۲۰/۲ \times OD\ ۶۴۶\ ] \times V] \div [۱۰۰۰ \times W]$$

کارتنوییدها ($mg.g^{-1}fw$) =

$$[[(۷/۶ \times OD\ ۴۸۰) - (۱/۴۹ \times OD\ ۵۱۰\ ] \times V] \div [۱۰۰۰ \times W]$$

OD: میزان جذب نور

V: حجم نهایی عصاره (۱۰ میلی‌لیتر)

W: وزن تر نمونه

اندازه‌گیری مقدار عناصر غذایی در گیاهان

عناصر غذایی آهن، منیزیم و روی در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در طرح‌های مختلف اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری این عناصر از روش چاپمن و همکاران استفاده شد (Chapman *et al.*, 1983). غلظت عناصر غذایی آهن، روی و منیزیم در عصاره با استفاده از دستگاه جذب اتمی (GBC Avanta ساخت استرالیا) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. مقایسهٔ میانگین‌ها نیز به طریق آزمون دانکن در سطح پنج درصد انجام گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

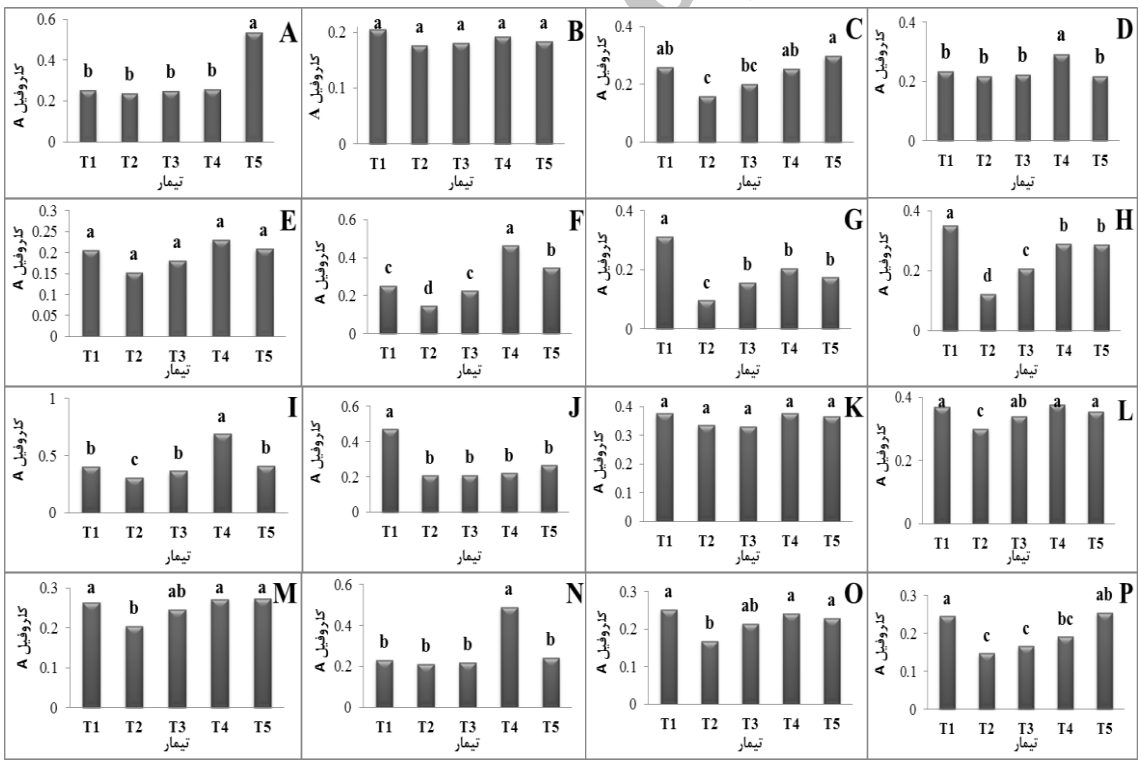
نتایج و بحث

ردیابی ویروس موزاییک زرد لوبیا در بوته‌های مایه‌زنی‌شده

در این آزمون قبل از برداشت برگ‌ها برای اندازه‌گیری پارامترهای مختلف، با استفاده از روش داس الیزا و آنتی بادی اختصاصی BYMV همهٔ بوته‌ها بررسی شدند و بوته‌های غیرآلوده به ویروس حذف شدند و تنها سه تکرار آلوده به ویروس برای بررسی‌های بعدی به‌کار گرفته شد.

تعیین میزان کلروفیل و رنگیزه‌های گیاه

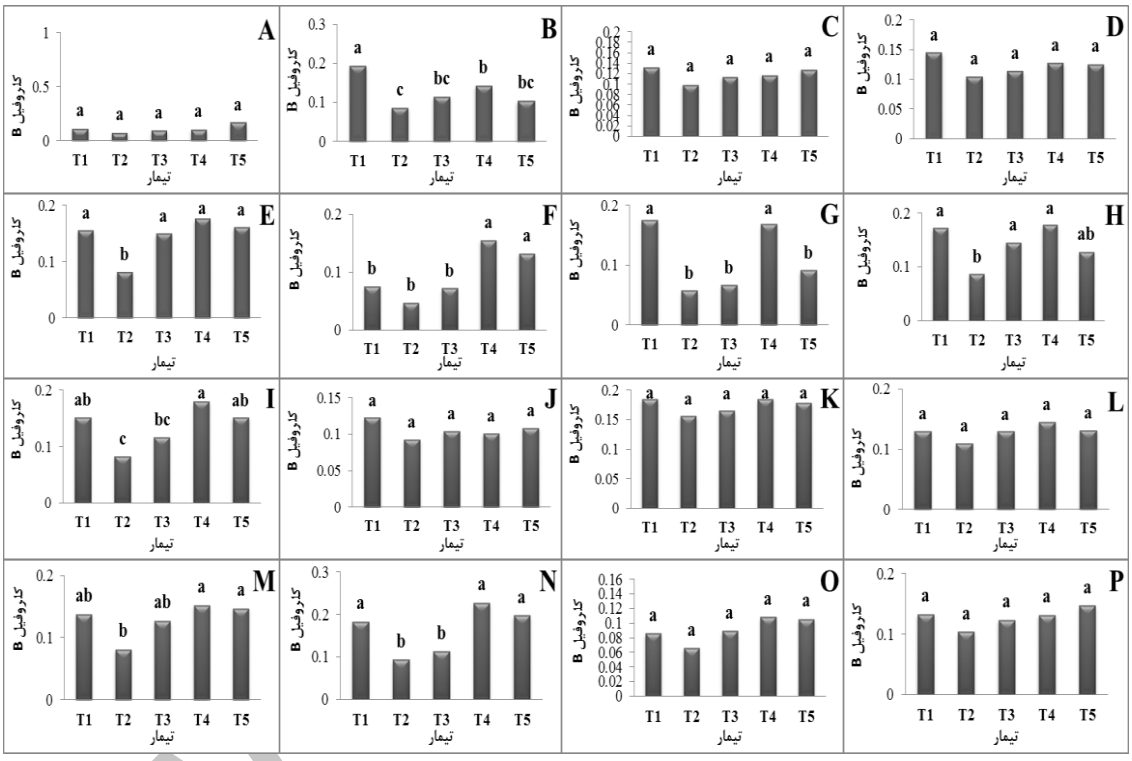
مقایسهٔ نتایج غلظت کلروفیل a در ژنوتیپ‌های شاهد سالم و آلوده به ویروس نشان داد که در همهٔ ژنوتیپ‌ها به جز ۶ ژنوتیپ (چیتی صدری، چیتی خمین، سفید درسا، سفید دانشکده، قرمز اختر و قرمز درخشان) میزان کلروفیل a در گیاهان مایه‌زنی‌شده به ویروس به‌صورت معناداری کاهش یافته است. به عبارتی، ویروس در این ژنوتیپ‌ها باعث کاهش غلظت میزان کلروفیل a شده است. همان‌گونه که در شکل ۱ ملاحظه می‌شود، در این آزمون سویه‌های باکتریایی در بیشتر موارد توانسته‌اند خسارت واردشده توسط ویروس بر کاهش میزان کلروفیل را کاهش دهند. افزایش معنادار غلظت کلروفیل a نسبت به شاهد آلوده به ویروس، در پنج ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ VUPF5 (قرمز صیاد، سفید دهقان، قرمز گلی، چیتی عراقی و سفید پاک)، ۱۰ ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ ΔVUPF5 (قرمز صیاد، سفید دهقان، قرمز گلی، چیتی عراقی و سفید پاک، چیتی Ks، چیتی تلاش و سفید شکوفا، چیتی خمین و قرمز درخشان) و ۱۰ ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ CHA0 (قرمز صیاد، سفید دهقان، قرمز گلی، چیتی عراقی و سفید پاک، چیتی Ks، چیتی تلاش و سفید شکوفا، چیتی صدری و قرمز ناز)، مشاهده می‌شود. بهترین عملکرد مربوط به سویهٔ ΔVUPF5 و سپس CHA0 است (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسهٔ پارامتر غلظت کلروفیل a در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در تیمارهای مختلف ((A: چیتی صدری، B: سفید دانشکده، C: چیتی Ks، D: چیتی خمین، E: سفید درسا، F: قرمز صیاد، G: سفید دهقان، H: قرمز گلی، I: چیتی عراقی، J: قرمز دهقان، K: قرمز اختر، L: سفید پاک، M: چیتی تلاش، N: قرمز درخشان، O: سفید شکوفا، P: قرمز ناز) T1: شاهد سالم، T2: شاهد آلوده به ویروس، T3: بوته‌های تیمارشده با VUPF5، T4: بوته‌های تیمارشده با ΔVUPF5، T5: بوته‌های تیمارشده با سویهٔ CHA0)

www.SID.ir

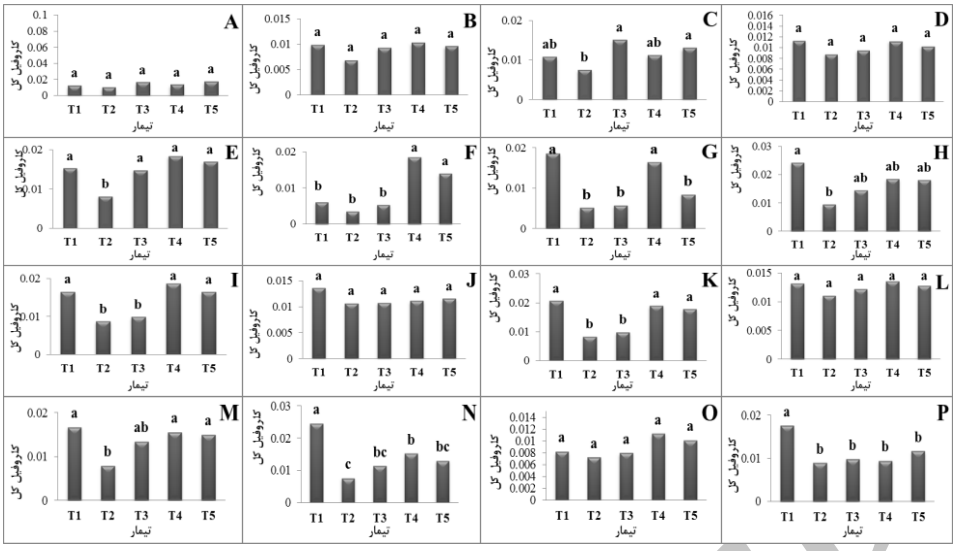
نتایج مقایسهٔ میزان کلروفیل b در تیمارهای مختلف نشان داد که میزان کلروفیل b در هفت ژنوتیپ سفید دانشکده، سفید درسا، سفید دهقان، چیتی عراقی، چیتی تلاش و قرمز درخشان در اثر آلودگی به ویروس نسبت به شاهد سالم به‌صورت معناداری کاهش یافته است. افزایش معنادار غلظت کلروفیل b نسبت به شاهد آلوده به ویروس، در دو ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ VUPF5 (سفید درسا و قرمز گلی)، هشت ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ ΔVUPF5 (سفید درسا، قرمز گلی، قرمز صیاد، چیتی عراقی، چیتی تلاش، قرمز درخشان، سفید دانشکده و سفید دهقان) و پنج ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ CHA0 (سفید درسا، قرمز صیاد، چیتی عراقی، چیتی تلاش، قرمز درخشان) مشاهده شد. در این آزمون سویهٔ ΔVUPF5 بهترین عملکرد را در افزایش غلظت کلروفیل b نسبت به شاهد آلوده به ویروس داشت (شکل ۲).



شکل ۲. مقایسهٔ پارامتر غلظت کلروفیل b در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در تیمارهای مختلف ((A: چیتی صدری، B: سفید دانشکده، C: چیتی Ks، D: چیتی خمین، E: سفید درسا، F: قرمز صیاد، G: سفید دهقان، H: قرمز گلی، I: چیتی عراقی، J: قرمز دهقان، K: قرمز اختر، L: سفید پاک، M: چیتی تلاش، N: قرمز درخشان، O: سفید شکوفا، P: قرمز ناز) T1: شاهد سالم، T2: شاهد آلوده به ویروس، T3: بوته‌های تیمارشده با VUPF5، T4: بوته‌های تیمارشده با ΔVUPF5، T5: بوته‌های تیمارشده با سویهٔ CHA0)

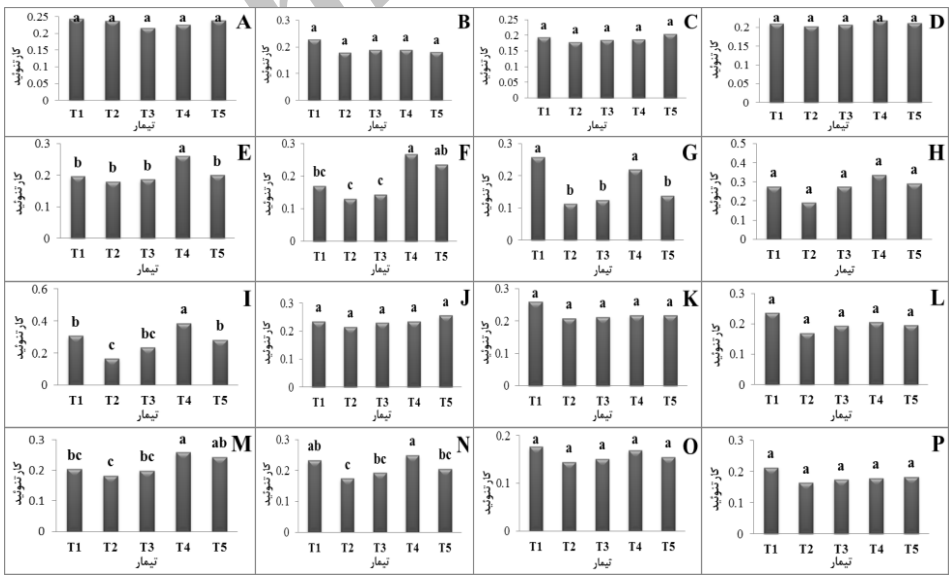
در آزمون بررسی غلظت کلروفیل کل مشاهده شد که BYMV در هفت ژنوتیپ (سفید درسا، سفید دهقان، قرمز گلی، قرمز اختر، قرمز درخشان، چیتی عراقی و چیتی تلاش) باعث کاهش معنادار میزان غلظت کلروفیل کل نسبت به شاهد سالم شده است. افزایش معنادار غلظت کلروفیل کل نسبت به شاهد آلوده به ویروس، در دو ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ VUPF5 (سفید درسا و چیتی Ks)، هفت ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ ΔVUPF5 (سفید درسا، قرمز صیاد، سفید دهقان، چیتی عراقی، قرمز اختر، چیتی تلاش و قرمز درخشان) و در شش ژنوتیپ تیمارشده با سویهٔ CHA0 (سفید درسا، قرمز صیاد، چیتی Ks، چیتی عراقی، قرمز اختر، چیتی تلاش) مشاهده شد و سویهٔ ΔVUPF5 بهترین عملکرد را داشت (شکل ۳).

www.SID.ir



شکل ۳. مقایسهٔ پارامتر غلظت کلروفیل کل در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در تیمارهای مختلف ((A: چیتی صدری، B: سفید دانشکده، C: چیتی Ks، D: چیتی خمین، E: سفید درسا، F: قرمز صیاد، G: سفید دهقان، H: قرمز گلی، I: چیتی عراقی، J: قرمز دهقان، K: قرمز اختر، L: سفید پاک، M: چیتی تلاش، N: قرمز درخشان، O: سفید شکوفا، P: قرمز ناز) T1: شاهد سالم، T2: شاهد آلوده به ویروس، T3: بوته‌های تیمارشده با VUPF5، T4: بوته‌های تیمارشده با ΔVUPF5، T5: بوته‌های تیمارشده با سویهٔ CHA0)

در آزمون سنجش میزان کارتنوییدها، BYMV تنها باعث کاهش معنادار غلظت کارتنوییدها در سه ژنوتیپ سفید دهقان، چیتی عراقی و قرمز درخشان نسبت به شاهد سالم شد. در بین ژنوتیپ‌های تیمارشده با سویه‌های باکتریایی افزایش معنادار میزان کارتنوییدها نسبت به شاهد آلوده توسط سویهٔ CHA0 در سه ژنوتیپ (قرمز صیاد، چیتی‌عراقی، چیتی‌تلاش) و توسط سویهٔ ΔVUPF5 در شش ژنوتیپ (سفید درسا، قرمز صیاد، چیتی عراقی، چیتی تلاش، سفید دهقان و قرمز درخشان) ایجاد شد. بهترین عملکرد مربوط به سویهٔ ΔVUPF5 بود (شکل ۴).



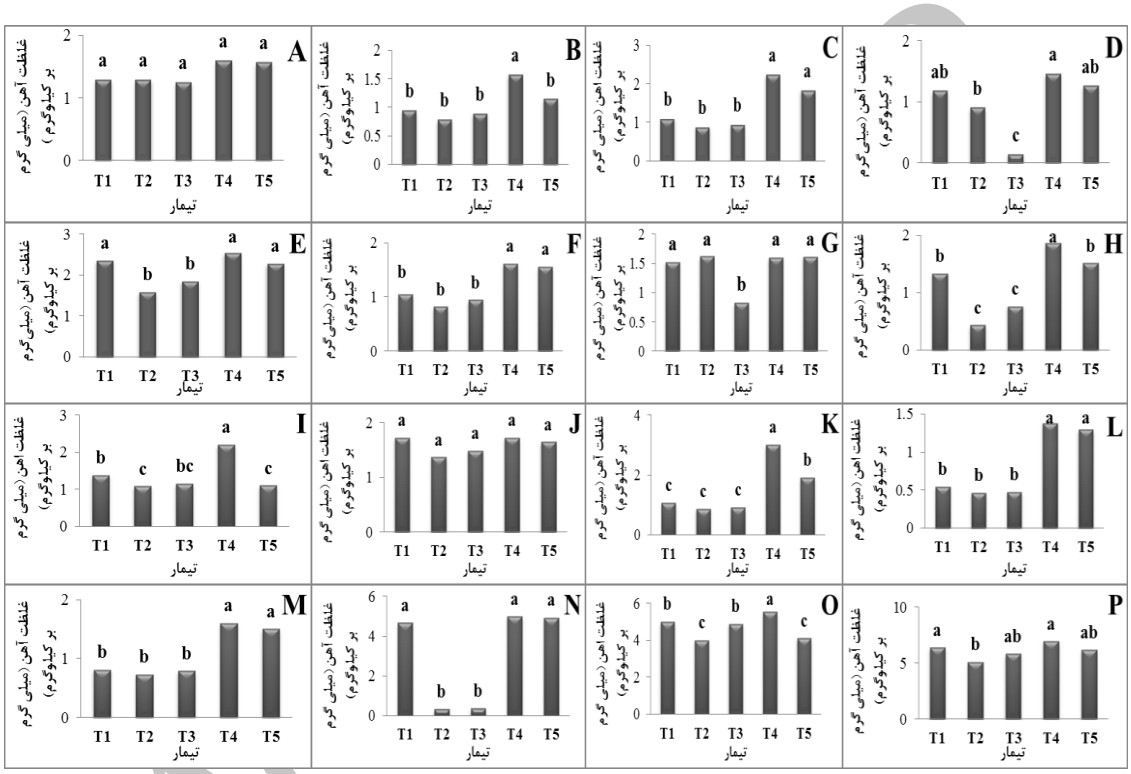
شکل ۴. مقایسهٔ پارامتر کارتنوییدها در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در تیمارهای مختلف ((A: چیتی صدری، B: سفید دانشکده، C: چیتی Ks، D: چیتی خمین، E: سفید درسا، F: قرمز صیاد، G: سفید دهقان، H: قرمز گلی، I: چیتی عراقی، J: قرمز دهقان، K: قرمز اختر، L: سفید پاک، M: چیتی تلاش، N: قرمز درخشان، O: سفید شکوفا، P: قرمز ناز) T1: شاهد سالم، T2: شاهد آلوده به ویروس، T3: بوته‌های تیمارشده با VUPF5، T4: بوته‌های تیمارشده با ΔVUPF5، T5: بوته‌های تیمارشده با سویهٔ CHA0)

Archive of SID

www.SID.ir

اندازه‌گیری غلظت سه عنصر غذایی روی، منیزیم و آهن

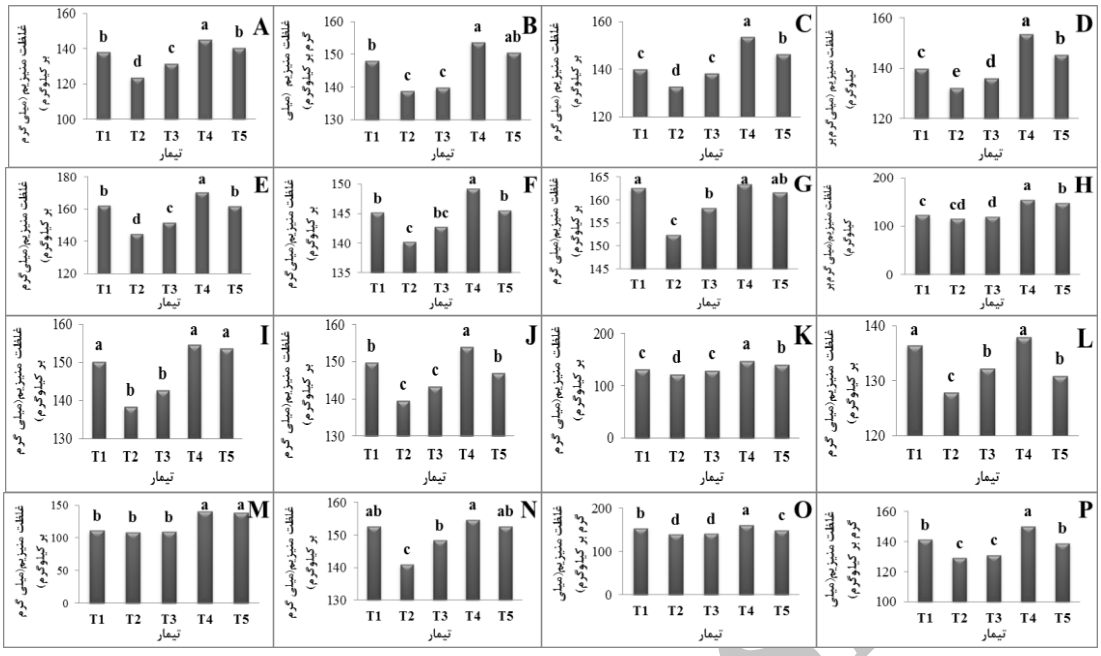
غلظت عناصر روی، منیزیم و آهن در ژنوتیپ‌های تحت بررسی تیمارهای مختلف ارزیابی شد. مقایسهٔ نتایج غلظت آهن در تیمار ۱ و ۲ نشان داد که غلظت آهن در ژنوتیپ‌های آلوده به ویروس سفید درسا، قرمز گلی، چیتی عراقی، قرمز درخشان، سفید شکوفا و قرمز ناز نسبت به شاهد سالم به‌صورت معناداری کاهش یافته است. سویهٔ باکتری VUPF5، ΔVUPF5 و CHA0 به‌ترتیب باعث افزایش معنادار غلظت آهن در یک (سفید شکوفا)، ۱۲ (سفید شکوفا، چیتی عراقی، چیتی Ks، سفید درسا، قرمز صیاد، قرمز گلی، قرمز اختر، سفید پاک، چیتی تلاش، قرمز درخشان، سفید دانشکده، قرمز ناز و چیتی خمین) و هشت ژنوتیپ تیمارشده (چیتی Ks، سفید درسا، قرمز صیاد، قرمز گلی، قرمز اختر، سفید پاک، چیتی تلاش، قرمز درخشان) در مقایسه با شاهد آلوده به ویروس شدند. در بین سویه‌های باکتری تحت بررسی، سویهٔ ΔVUPF5 بهترین عملکرد را داشت (شکل ۵).



شکل ۵. مقایسهٔ پارامتر غلظت آهن در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در تیمارهای مختلف ((A: چیتی صدری، B: سفید دانشکده، C: چیتی Ks، D: چیتی خمین، E: سفید درسا، F: قرمز صیاد، G: سفید دهقان، H: قرمز گلی، I: چیتی عراقی، J: قرمز دهقان، K: قرمز اختر، L: سفید پاک، M: چیتی تلاش، N: قرمز درخشان، O: سفید شکوفا، P: قرمز ناز) T1: شاهد سالم، T2: شاهد آلوده به ویروس، T3: بوته‌های تیمارشده با VUPF5، T4: بوته‌های تیمارشده با ΔVUPF5، T5: بوته‌های تیمارشده با سویهٔ CHA0)

نتایج مقایسهٔ غلظت منیزیم در ژنوتیپ‌های شاهد سالم و شاهد آلوده نشان داد که ویروس موزاییک زرد لوبیا باعث کاهش معنادار غلظت منیزیم در همهٔ ژنوتیپ‌های تحت بررسی به‌جز ژنوتیپ قرمز گلی و چیتی تلاش نسبت به شاهد سالم شده است. مقایسهٔ نتایج این پارامتر در شاهد آلوده به ویروس و ژنوتیپ‌های تیمارشده با سویه‌های باکتریایی (تیمارهای ۳، ۴ و ۵) نشان داد که سویهٔ VUPF5 در هشت ژنوتیپ تیمارشده (چیتی صدری، چیتی KS، چیتی خمین، سفید درسا، سفید دهقان، قرمز اختر، سفید پاک و قرمز درخشان)، سویه‌های ΔVUPF5 و CHA0 در همهٔ ژنوتیپ‌های تیمارشدهٔ تحت بررسی باعث افزایش معنادار غلظت منیزیم نسبت به شاهد آلوده شده‌اند (شکل ۶).

www.SID.ir



شکل ۶. مقایسهٔ پارامتر غلظت منیزیم در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در تیمارهای مختلف ((A: چیتی صدری، B: سفید دانشکده، C: چیتی Ks، D: چیتی خمین، E: سفید درسا، F: قرمز صیاد، G: سفید دهقان، H: قرمز گلی، I: چیتی عراقی، J: قرمز دهقان، K: قرمز اختر، L: سفید پاک، M: چیتی تلاش، N: قرمز درخشان، O: سفید شکوفا، P: قرمز ناز) T1: شاهد سالم، T2: شاهد آلوده به ویروس، T3: بوته‌های تیمارشده با VUPF5، T4: بوته‌های تیمارشده با ΔVUPF5، T5: بوته‌های تیمارشده با سویهٔ CHA0)

در آزمون بررسی میزان غلظت روی مشاهده شد که در همهٔ ژنوتیپ‌های آلوده به ویروس به‌جز پنج ژنوتیپ (چیتی Ks، چیتی خمین، قرمز صیاد، سفید پاک و چیتی تلاش) میزان غلظت این عنصر در مقایسه با شاهد سالم به‌طور معناداری کاهش یافته است. در بین ژنوتیپ‌های تیمارشده با سویه‌های باکتریایی افزایش معنادار غلظت روی نسبت به شاهد آلوده توسط سویهٔ VUPF5 در شش ژنوتیپ (چیتی صدری، سفید دانشکده، سفید درسا، سفید دهقان، قرمز اختر و قرمز دهاقان)، سویهٔ ΔVUPF5 در ۱۴ ژنوتیپ (چیتی صدری، سفید دانشکده، سفید درسا، سفید دهقان، قرمز اختر، قرمز دهاقان، چیتی خمین، قرمز صیاد، قرمز گلی، چیتی عراقی، چیتی تلاش، قرمز درخشان، سفید شکوفا و قرمز ناز) و سویهٔ CHA0 در ۱۵ ژنوتیپ (چیتی صدری، سفید دانشکده، سفید درسا، سفید دهقان، قرمز اختر، چیتی خمین، قرمز صیاد، قرمز گلی، چیتی عراقی، چیتی تلاش، قرمز درخشان، سفید شکوفا، قرمز ناز، چیتی KS و سفید پاک) مشاهده شد (شکل ۷).

با توجه به نتایج مقایسهٔ شاهد سالم و شاهد آلوده به ویروس در بیشتر ژنوتیپ‌ها، ویروس موزاییک زرد لوبیا باعث کاهش میزان پارامترهای تحت بررسی (کلروفیل، کارتنویید و عناصر غذایی روی، آهن و منیزیم) شده است. این نتایج با تحقیقات Jones (2012) روی تأثیر ویروس موزاییک زرد لوبیا بر گیاهان محک کار می‌کرد مطابقت دارد.

در این پژوهش سویه‌های باکتریایی به‌کاررفته به‌ویژه ΔVUPF5 و CHA0، توانستند در بیشتر ژنوتیپ‌های آلوده به ویروس تیمارشده با این سویه‌ها باعث افزایش میزان کارتنوییدها، کلروفیل a، b و کلروفیل کل نسبت به ژنوتیپ‌های آلوده به BYMV شوند. در برخی ژنوتیپ‌ها میزان پارامترهای اندازه‌گیری‌شده حتی نسبت به شاهد سالم نیز افزایش پیدا کرده بود.

در آزمون‌های بررسی غلظت عناصر غذایی نیز سویه‌های باکتری تحت بررسی توانستند نسبت به شاهد آلوده به ویروس در بیشتر ژنوتیپ‌های تیمارشده باعث افزایش غلظت عناصر شوند که در این بین سویهٔ ΔVUPF و CHA0 اثر بیشتری نسبت به سویهٔ VUPF داشتند.

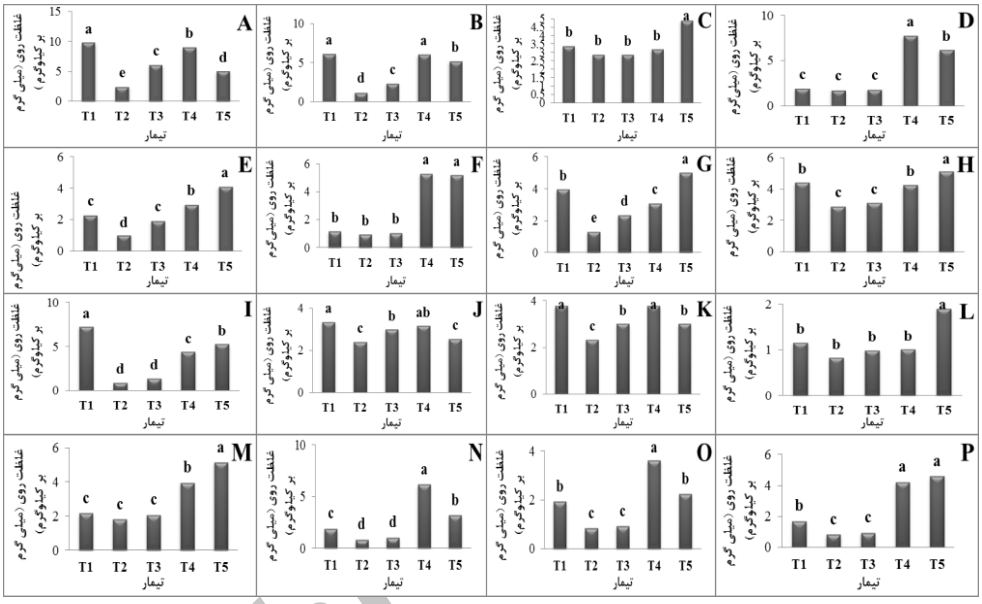
نتایج این تحقیق با نتایج پژوهش Elbardy *et al.* مطابقت دارد. در پژوهش مذکور سویهٔ FB11 باکتری

Archive of SID

www.SID.ir

P. fluorescens توانسته بود باعث تقویت و رشد گیاهان آلوده به BYMV شود.

بیشتر متابولیست‌های ثانویه که نقش مهمی در بیوکنترل دارند، تحت سیستم تنظیمی GacS/GacA بیان می‌شوند (Heeb & Haas, 2001). در برخی موارد در اثر جهش‌هایی که در این سیستم تنظیمی اتفاق می‌افتد، تولید متابولیت‌های ثانویه مختل می‌شود و از آنجا که تولید سیدروفور تحت کنترل این سیستم تنظیمی نیست، در باکتری‌های موتانت، سیدروفور زیادی تولید می‌شود. به نظر می‌رسد سویه‌های باکتریایی انتخابی از طریق مکانیسم‌های غیرمستقیم از قبیل تولید سیدروفور می‌توانند باعث افزایش سطح جذب آهن، منیزیم و روی توسط گیاه شوند. در این میان سویهٔ موتانت ΔVUPF که احتمالاً سیدروفور بیشتری تولید می‌کند، در جذب آهن نقش فعال‌تری دارد (Lagzian *et al*., 2013).



شکل ۷. مقایسهٔ پارامتر غلظت روی در ژنوتیپ‌های مختلف لوبیای معمولی در تیمارهای مختلف ((A: چیتی صدری، B: سفید دانشکده، C: چیتی Ks، D: چیتی خمین، E: سفید درسا، F: قرمز صیاد، G: سفید دهقان، H: قرمز گلی، I: چیتی عراقی، J: قرمز دهقان، K: قرمز اختر، L: سفید پاک، M: چیتی تلاش، N: قرمز درخشان، O: سفید شکوفا، P: قرمز ناز) T1: شاهد سالم، T2: شاهد آلوده به ویروس، T3: بوته‌های تیمارشده با VUPF5، T4: بوته‌های تیمارشده با ΔVUPF5، T5: بوته‌های تیمارشده با سویهٔ CHA0)

کلروفیل مهم‌ترین رنگیزهٔ فتوسنتزی در گیاه محسوب می‌شود که نقش فیزیولوژیک گوناگونی در گیاه ایفا می‌کند و از نظر جذب و به‌کارگیری انرژی نورانی در فتوسنتز نقش اساسی و اولیه دارد. بنابراین هر گونه تأثیر روی کلروفیل به‌طور مستقیم بر فتوسنتز نیز تأثیر دارد. سه عنصر آهن، روی و منیزیم نقش مهمی در ساختار کلروفیل دارند. آهن در سنتز کلروفیل، ساختار کمپلکس سیتوکروم، انتقال الکترون در زنجیرهٔ انتقال الکترون، ساختار فرودوکسین و در تولید مجدد ریبولوز بیس فسفات نقش دارد. منیزیم و روی نیز به عنوان دو عنصر اساسی در ساختار کلروفیل حضور دارد و نقش مهمی در فعالیت چندین آنزیم و تشکیل کلروفیل ایفا می‌کنند (Khosh-Goftarmanesh, 2007). بنابراین به نظر می‌رسد در پژوهش حاضر سویه‌های باکتریایی به‌کاررفته با افزایش جذب عناصر تشکیل‌دهنده در ساخت کلروفیل باعث افزایش غلظت کلروفیل و در نتیجه افزایش راندمان فتوسنتز، تقسیم سلولی و رشد برگ و گیاه می‌گردند. این نتایج با پژوهش‌های قبلی که روی مکانیسم سیدروفورهای جنس سودوموناس انجام گرفته است مطابقت دارد (Shippers *et al*., 1986).

نتیجه‌گیری کلی

لوبیای معمولی به عنوان یک غذای غنی از پروتئین در بسیاری از کشورها کشت می‌شود. ویروس موزاییک زرد

Archive of SID

www.SID.ir

لوبیا یکی از عوامل مهم در کاهش این محصول بوده که با توجه به دامنهٔ میزبانی وسیع و ناقلین فراوان این بیماری ویروسی مدیریت آن مشکل است (Agrios, 2005). امروزه با استفاده از برخی عوامل محرک رشد گیاهان (PGPR) موفقیت‌های بسیاری در جهت مدیریت پاتوژن‌های گیاهی حاصل شده است (Kaymak, 2011; Glick *et al*., 2012). سویه‌های CHA0، VUPF5 و ΔVUPF5 باکتری *P. fluorescens* که PGPR محسوب می‌شوند، در این پژوهش برای مدیریت ویروس موزاییک زرد لوبیا به‌کار گرفته شدند. نتایج نشان داد که در بیشتر ژنوتیپ‌های تحت بررسی در این پژوهش، BYMV باعث کاهش میزان کلروفیل، کارتنویید، آهن، روی و مس شده است که این تغییرات به‌صورت علائم موزاییک در گیاه قابل مشاهده است. با توجه به نتایج، سویه‌های باکتریایی ذکرشده توانستند در اغلب ژنوتیپ‌های آلوده به ویروس تیمارشده با این سویه‌ها باعث افزایش معنادار میزان کلروفیل، کارتنویید و عناصر غذایی نسبت به شاهد آلوده شوند. در مجموع آزمایش‌ها، سویهٔ ΔVUPF5 بهترین عملکرد را در افزایش پارامترهای تحت بررسی داشت. این سویهٔ موتانت که از طریق جهش در ژن *gacA* سویهٔ VUPSF5 به‌وجود آمده است، نسبت به سویهٔ وحشی خود از لحاظ پارامترهای اندازه‌گیری‌شده برتری داشت. بر اساس این مشاهدات احتمالاً سیدروفور نقش مهمی در به‌دست آوردن این نتایج داشته است، بنابراین برخلاف پژوهش‌های پیشین که موتانت‌های ژن *gacA* در سویه‌های سودوموناس فلورسنت یک بیوکنترل ناموفق در بیمارگرهای قارچی خاک‌برد قلمداد می‌گردد (Lagzian *et al*., 2013)، در این پژوهش عملکرد موفقی در کاهش تأثیرات ویروس بر ژنوتیپ‌های لوبیای معمولی تحت بررسی به‌دست آمد.

REFERENCES

1. Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. 5th ed. Academic Press, San Diego. CA.
2. Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1
3. Chapman, B., Jones, D. & Jung, R. (1983). Processes controlling metal ion attenuation in acid mine drainage streams. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47, 1957-1973.
4. Clark, M. F. & Adams, A. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34: 475-483.
5. Dasgupta, I., Malathi, V. & Mukherjee, S. (2003). Genetic engineering for virus resistance. *Current Science Bangalore*, 84, 341-354.
6. Doolittle, S. & Jones, F. (1925). The mosaic disease in the garden pea and other legumes. *Phytopathology*, 15, 763-772.
7. Elbardy, M., Taha, R. M., El-Dougdoug, K. A. & Gamal-Eldin, H. (2006). Induction of systemic resistance in faba bean to *Bean yellow mosaic potyvirus* (BYMV) via seed bacterization with plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 113, 247-251.
8. Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012, 1-15.
9. Haas, D. & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonads fluorescent*. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307-319.
10. Heeb, S. & Haas, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 1351-1363.
11. Jones, R. (1977). Serologically and biologically distinct *Bean yellow mosaic virus* strains. *Phytopathology*, 67, 831-838.
12. Jones, R. A. (2012). Virus diseases of annual pasture legumes: incidences, losses, epidemiology, and management. *Crop and Pasture Science*, 63, 399-418.
13. Kaymak, H. C. (2011). Potential of PGPR in agricultural innovations. In D. K. Maheshwari (Ed.), *Plant growth and health promoting bacteria*. (pp. 45-79). Springer.
14. Khosh-Goftarmanesh, A. (2007). *Principles of plant nutrition*. Univerity of Technology Publication.
15. King, A. M. Q., Adams, A. J., Carstens, E. B. & Lefkowits, E. J. (2012). *Virus Ttaxonomy*: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press.
16. Lagzian, A., Saberi Riseh, R., Khodaygan, P., Sedaghati, E. & Dashti, H. (2013). Biocontrol performance evaluation of spontaneous mutants of *Pseudomonas fluorescens* VUPf5 generated during proliferation. *Archives of Phytopathology And Plant Protection*, 1-9.

Archive of SID

www.SID.ir

17. McKirdy, S., Jones, R., Latham, L. & Coutts, B. (2000). *Bean yellow mosaic potyvirus* infection of alternative annual pasture, forage, and cool season crop legumes: susceptibility, sensitivity, and seed transmission. *Crop and Pasture Science*, 51, 325-346.
18. Ownley, B., Duffy, B. & Weller, D. (2003). Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 150, 3333-3343.
19. Schwartz, H. F., Steadman, J. R., Hall, R. & Forster, R. L. (2005). Compendium of Bean Diseases.
20. Schippers, B., Bakker, A. W. & Bakker, P. A. H. M. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 339-358.

Archive of SID

www.SID.ir