

تعیین و معرفی خصوصیات بیولوژیک و بیوشیمیایی سویه *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 به عنوان یک باکتری پروبیوتیک گیاهی در ایران

نگار باقری^۱، مسعود احمدزاده^۱، روح الله شریفی^۲، روح الله صابری ریشه^۳، احسان محمدخانی^۴

۱- گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲- گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

۳- گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان

۴- گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

مسئول مکاتبات: مسعود احمدزاده، پست الکترونیک: ahmadz@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۷/۲۱

۱۷-۱ (۲) ۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۰۱

چکیده

یافتن سویه های جدیدی از باکتری های پروبیوتیک گیاهی با قابلیت تجاری سازی در کشاورزی از اهمیت زیادی برخوردار است. در این تحقیق، خصوصیات بیولوژیک و بیوشیمیایی سویه *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 به عنوان یک باکتری مهم در ایران، مورد ارزیابی قرار گرفته است. تولید متابولیت های مختلف از جمله اکسین، سیانید هیدروژن، سیدروفور، فنازین، دی استیل فلورو گلوکوسینول و تشکیل بیوفیلم و سیستم های تنظیمی مورد بررسی قرار گرفت. مقدار بازدارندگی این سویه از رشد قارچ *Rhizoctonia solani* تعیین شد. نتایج، تولید بسیاری از متابولیت های یوکنترلی به استثناء فنازین را نشان داد. وجود آهن باعث کاهش تولید سیدروفور و افزایش سیانید هیدروژن شد. سویه UTPF5 قادر به تولید سیگنال، جهت راه اندازی مسیر Gac/Rsm می باشد و اثر قابل توجهی در بیان *hcnA* و *RsmZ* دارد. این سویه قادر به تولید سیگنال هموسرین لاکتون نیست. در بررسی های گلخانه ای توانایی یوکنترل بیمارگر هدف و افزایش رشد گیاهان آفتابگردان، ارزن، لوبیا و کلزا به اثبات رسید.

واژه های کلیدی: بیوفیلم، دی استیل فلورو گلوکوسینول، سیانید هیدروژن، سیستم های تنظیمی، *Pseudomonas fluorescens* UTPF5

مقدمه

مؤثر در مقابل بیمارگرهای گیاهی و ممانعت از استقرار باکتری ها روی سیستم ریشه ای (Weller, 1988)، ترشح و تولید متابولیت های ممانعت کننده از رشد پاتوژن های خاکزاد، افزایش عملکرد و تولید محصول اهمیت دارند. *Pseudomonas fluorescens* بخش مهمی از جمعیت باکتری های ریزوسفر را تشکیل می دهند (Picard et al., 1998; Benizri et al., 2000)، که به طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم کننده های رشد گیاه به خصوص اندول استیک اسید (Oberhansli et al., 1991) و نیز به طور غیرمستقیم از طریق کنترل بیولوژیک بیمارگرها باعث افزایش رشد آنها می شوند (Weller, 1988) و با تولید متابولیت ۲-۴ دی استیل فلورو گلوکوسینول توجه زیادی را به دلیل کنترل بیولوژیک طیف وسیعی از بیماری های ریشه به خود جلب کرده است (Siddiqui & Shaukat, 2003). باکتری های

استفاده از میکروارگانسیم های پروبیوتیک گیاهی یکی از روش هایی است که برای توسعه کشاورزی ارگانیک بسیار مورد توجه قرار گرفته است و تاکنون با موفقیت های قابل ملاحظه ای همراه بوده است. از آنجا که ریزوسفر گیاه غنی از عوامل میکروبی است و باکتری های کلنیزه کننده ریشه، نقش برجسته ای در این ناحیه دارند (Schipper et al., 1987)، میکروارگانسیم هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می کنند گزینه مناسبی برای استفاده در روش های بیولوژیک هستند (Baker, 1987). ریزوباکتری ها از جهت حضور در میکروفلور خاک، افزایش رشد گیاه، فعال کردن مکانیسم های مقاومت در میزبان (Nakkeeran et al., 2005)، کلنیزاسیون مؤثر ریشه (به عنوان پیش نیاز یک کنترل بیولوژیک موفق، بازدارندگی

پروبیوتیک گیاهی از طریق آنتی‌بیوز، آنزیم‌های تجزیه کننده نظیر کیتیناز و پروتاز، پارازیتیسیم، تحریک سیستم دفاعی گیاه، تحریک و تقویت رشد گیاه عمل می‌کنند (Ahmadzadeh, 2014). این باکتری‌ها می‌توانند باعث افزایش رشد گیاه به‌طور مستقیم، مثل تثبیت نیتروژن، تقویت میکوریزی، تنظیم تولید اتیلن در ریشه‌ها و سنتز فیتوهورمون‌ها مثل جبرلین و ایندول استیک اسید، کاهش سمیت فلزات سنگین و افزایش موادغذایی برای گیاهان شوند. تشکیل بیوفیلم روی سطوح گیاهی و در نهایت استقرار مناسب باکتری جهت بروز فعالیت بیوکنترلی مناسب اهمیت فراوانی دارند (Ahmadzadeh, 2014). جمعیت‌هایی متشکل از یک گونه یا گونه‌های متنوع باکتری به‌صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطوح زنده و غیرزنده در زمینه‌ای از پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، بیوفیلم نامیده می‌شوند (Davey & O Toole, 2000). تشکیل بیوفیلم روی سطوح زنده و غیرزنده در نتیجه تحریکات محیطی انجام می‌گیرد، با این تفاوت که در سطوح زنده، خود سطح به‌عنوان منبع غذایی باکتری‌ها محسوب می‌شود. زمانی که باکتری‌ها فاکتورهای محیطی را احساس می‌کنند تشکیل بیوفیلم آغاز می‌شود و در تمام مراحل تشکیل بیوفیلم فاکتورهای ژنتیکی و محیطی دخالت دارند.

فوائد تشکیل بیوفیلم برای باکتری‌ها شامل حفاظت در مقابل شرایط محیطی از طریق ایجاد سد فیزیکی، کلاته کردن کاتیون‌ها و سموم، حفاظت در مقابل تنوع استرس‌های محیطی توسط EPS، دسترسی به موادغذایی از طریق وجود کانال‌های آب قابل نفوذ درون بیوفیلم، همکاری متابولیکی توسط ایجاد رابطه سینتروفیک، اکتساب ویژگی‌های جدید ژنتیکی و کلنیزاسیون است (Morris & Monier, 2003; Branda et al., 2005). از میان باکتری‌ها، *Pseudomonas fluorescens* در بیشتر شرایط آزمایش شده تشکیل بیوفیلم می‌دهد. این باکتری مسیرهای ژنتیکی مختلفی را برای آغاز تشکیل بیوفیلم استفاده می‌کند (Davey & O Toole, 2000) همچنین از جمله عوامل بیمارگر مهم گیاهان به‌خصوص لوبیا، کلزا و آفتاب‌گردان، عواملی قارچی از جمله *Sclerotinia sclerotiorum*

مواد و روش‌ها

تهیه مایه‌ی تلقیح باکتری *P. fluorescens* UTPF5

و قارچ *Rhizoctonia solani*

یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته باکتری روی محیط NA به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط NB منتقل شد و ۴۸ ساعت روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۷ درجه قرار گرفت. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفیوژ انجام گرفت و محلول رویی دور ریخته شده و سلول‌های باکتری که در اثر سانتریفیوژ ته‌نشین شده‌اند، دو بار در آب مقطر دوبار استریل، سوسپانسیون شده و توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به غلظت نهایی 10^8 CFU/ml رسانده شد. قارچ *Rhizoctonia solani* از کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران دریافت شد.

تولید برخی متابولیت‌های *P. fluorescens* UTPF5

تعیین میزان تولید اکسین توسط جدایه UTPF5 و

تعیین همبستگی آن با افزایش رشد گیاه

در این مرحله از روش (Gordon & Weber, 1950) برای تعیین میزان تولید اکسین تولیدشده توسط این جدایه استفاده شد و با استفاده از اسپکتروفتومتر، جذب نوری

هاله نارنجی رنگ اطراف پرگنه باکتری است. قطر این هاله در سه روز متوالی ثبت شد و میانگین سه روز نیز محاسبه شد.

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات، به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. داده‌های حاصله با استفاده از فرمول $A = \epsilon BC$ و با استفاده از ضریب مولی پایوریدین این ایزوله، میزان تولید پایوریدین به صورت کمی به دست آمد (Sharifi et al., 2008).

نقش روی و آهن در تولید سیدروفور

غلظت‌های مختلف روی (۷۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول و شاهد همراه یا بدون افزودن ۵۰ میکرومول آهن)، آهن (۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول) از استوک این عناصر که با فیلتر ۰/۲ میکرون و با دستگاه میلی‌پور استریل شده بود تهیه شده و به ارلن‌های حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت سوکسینات اضافه شدند. برای تلقیح، سویه UTPF5 به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت سوکسینات در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس و ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط به محیط‌های جدید حاوی تیمارها منتقل شد و در شرایط مشابه بالا و به مدت ۴۰ ساعت نگهداری شدند (Sharifi et al., 2008).

تولید آنتی‌بیوتیک فنازین

به منظور بررسی تولید آنتی‌بیوتیک فنازین-۱-کروکسیلیک اسید (PCA) از روش (Thomashow & Weller, 1988) استفاده شد. ابتدا جدایه باکتری روی محیط TSA (Tryptic Soy Agar) کشت داده شد و به مدت یک شب در انکوباتور نگهداری شد. سپس به روی محیط PDA

سوسپانسیون باکتری در طول موج نوری ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. میزان تولید اکسین توسط این جدایه با مقایسه جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده از ایندول استیک اسید با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

تولید سیانید هیدروژن

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش پیشنهادی (Lork, 1948)، اصلاح شده توسط (Alstrom & Burns, 1989) انجام گرفت. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به ترتیب کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و در نهایت آجری تغییر رنگ می‌یابد. رنگ کرم حداقل میزان تولید HCN و رنگ آجری حداکثر تولید HCN را نشان می‌دهد.

نقش آهن در تولید سیانید هیدروژن

مطابق روش بررسی سیانید هیدروژن از روش (Alstrom & Burns, 1989) استفاده شد. منتهی غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومول آهن از استوک یک میلی‌مول $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ که با فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شده بود تهیه شد، در پتری‌ها ریخته شد و ارزیابی‌ها انجام گرفت (Sharifi et al., 2008).

آزمایش پروتاز

به منظور بررسی تولید آنزیم پروتاز توسط باکتری از محیط SMA (Skim Milk Agar) مطابق روش (Maurhofer et al., 1995) با کمی تغییر استفاده شد. تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف کلونی باکتری نشانه فعالیت پروتاز است.

اندازه‌گیری مقدار تولید سیدروفور- روش CAS agar

بدین منظور از روش (Alexander & Zuberer, 1991) استفاده شد. محیط CAS-agar آگار از چهار محلول که هر کدام به صورت جداگانه‌ای استریل شدند تهیه شد. که این چهار محلول عبارتند از: محلول معرف Fe-CAS، محلول بافر، محلول غذایی، محلول کازامینو اسید. تولید سیدروفور باعث جدا شدن آهن از CAS می‌شود که نتیجه آن تولید

برده شد و در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس به مدت چهار روز نگهداری شد. رنگدانه‌های سبز تیره و یا رسوبات کریستالی در مرکز کلونی‌ها نشانه تولید فنازین است.

مقایسه‌ی میزان تشکیل بیوفیلم در این جدایه باکتری با استفاده از روش میکروتیتر پلیت

مقایسه‌ی کمی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت (Fletcher, 1977) انجام شد. جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر و با اسپکتروفوتومتر تنظیم شد. بیوفیلم به صورت حلقه‌های ارغوانی بر روی چاهک‌ها قابل مشاهده هستند. سپس سنجش کمی تولید بیوفیلم به وسیله‌ی اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسیداستیک ۳۳ درصد به هر چاهک صورت گرفت و جذب نوری رنگ کریستال و بوله موجود در حلال رنگ‌بر در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد.

بررسی اثر سیگنال فعال کننده مسیر Gac/Rsm در بیان ژن های hcnA و rsmZ با استفاده از فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز

پلاسمید pME3219 (حاوی ژن الحاقی hcnA-lacZ) و pME7402 (حاوی ژن الحاقی rsmZ-CHA0) به صورت جداگانه به‌استرین CHA0 منتقل شدند. سپس استرین‌های گزارشگر CHA0/pME3219 و CHA0/pME7402 در محیط NYB کشت داده شدند و در شیکرانکوباتور (۳۰ °C و ۱۸۰ rpm) به مدت ۲۴ ساعت قرار داده و سانتریفوژ به مدت ۲ دقیقه (۹۰۰۰ rpm) انجام شد. به هر کدام از ارلن‌های حاوی NYB، ۱۵ میکرولیتر از عصاره باکتریایی حاوی سیگنال استفاده گردید از متانول نیز به‌عنوان شاهد برای مقایسه با تأثیر سیگنال‌ها استفاده گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از محلول برداشته و کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی گردید (OD600)، به ۸۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باقی مانده در هر اپندورف، ۴۰ میکرولیتر تولوئن اضافه، سپس در دمای ۳۷ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه گذاشته شد، سپس به مدت ۱۰ دقیقه داخل یخ گذاشته و پس از آن به هم زده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به لوله‌های آزمایش منتقل و سپس ۹۰۰ میکرولیتر بافر Z (۱۶/۱) گرم Na₂HPO₄، ۵/۵ گرم MgSO₄، ۰/۷۵ گرم KCl، ۰/۲۴۶ گرم NaH₂PO₄·H₂O در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل) به آن‌ها اضافه گردید. لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه در حمام آبی قرار

استخراج و تشخیص دی استیل فلوروگلوکوسینول (DAPG)

استرین UT5 از نظر تولید آنتی بیوتیک با استفاده از HPLC در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت. استخراج آنتی بیوتیک به روش (Maurhofer et al., 1992) و (Notz et al., 2001) انجام شد. بدین منظور از HPLC مجهز به شناساگر Hewlett-Packard 1090; Hewlett-Packard Co., Pal Alto, CA) و از ستون به ابعاد ۴×۱۰۰ میلی‌لیتر از نوع-Nucleosil 120-5-C18 (Macherey-Nagel, Düren, Germany) با روش فاز معکوس در دمای ۴۵ درجه‌ی سلسیوس استفاده شد. دی استیل فلوروگلوکوسینول (DAPG) به وسیله‌ی جذب اشعه‌ی ماوراء بنفش در طول موج ۲۷۰ ردیابی شد. کمیت آنتی‌بیوتیک بر اساس پیک استاندارد و زمان تأخیر، بر حسب میکرومول در میلی لیتر محیط کشت محاسبه شد. نمونه‌گیری و استخراج آنتی بیوتیک از ۳۰ میلی لیتر از محیط کشت GCM پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت صورت گرفت. pH محیط با استفاده از HCl دو نرمال بین دو و سه تنظیم گردید. سپس اتیل استات به نسبت ۱:۱ به محیط کشت اضافه شد. درب ارلن‌های حاوی محیط کشت و اتیل استات به وسیله‌ی

میکرولیتر X-Gal به عنوان سوسترای آنزیم بتاگالاکتوزیداز اضافه شد. در این آزمایش نیز از استوک odDHI و عصاره‌ی *Pseudomonas aeruginosa* PAO₁ به عنوان استاندارد و شاهد مثبت و استرین CHA0 به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. ایجاد لکه آبی رنگ در صفحه TLC حاوی محیط کشت، نشان دهنده تولید هموسرین لاکتون از نوع odDHL بود.

اثر برخی منابع کربن بر رشد استرین و بیان *gfp* با استفاده از پلاسمید گزارشگر *rsmZ-gfp*

در این پژوهش از برخی منابع کربن شامل گلیسرول، سوکسینات و فومارات استفاده شد. در ابتدا محیط OS شامل OSA، OSB، OSC، OSD₁، OSD₂، OSD₃، OSE و تریتون به عنوان محیط پایه تهیه گردید. سه ارلن از این محیط کشت تهیه گردید، به یکی از ارلن‌ها گلیسرول به میزان ۱۰۰ میلی مولار افزوده و pH آن ۷ تنظیم شد، به ارلن دیگر ۱۰۰ میلی مولار سوکسینات (pH = ۷) و در ارلن سوم ۱۰۰ میلی مولار فومارات (pH = ۷) اضافه گردید. در این آزمایش از محیط کشت GCM یا CSM نیز به عنوان یک تیمار مقایسه‌ای استفاده گردید. بنابراین محیط‌های به کار رفته در این آزمایش عبارت بودند از: گلیسرول + OS، فومارات + OS، سوکسینات + OS و محیط GCM. پلاسمید گزارشگر *rsmZ-gfp* به صورت جداگانه به استرین UTPF5 منتقل گردید. ۲۰ میلی لیتر از هر کدام از محیط‌های تهیه شده به داخل ارلن‌های ۵۰ میلی لیتر ریخته شد، پس از افزودن دو کلونی از استرین *rsmZ-UTPF5* با *gfp*، *gfp*، *UTPF86/rsmZ-gfp* و *CHA0/rsmZ-gfp*، ارلن‌ها به شیکرانکوباتور (۱۸۰ rpm، ۳۰ درجه‌ی سلسیوس) قرار داده شدند و پس از حدود ۶ تا ۲۴ ساعت جمعیت باکتری با استفاده از کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر و بیان *gfp* با استفاده از دستگاه *gfp reader* بررسی شد.

بررسی تحمل به خشکی استرین

بررسی تحمل به خشکی استرین UTPF5، از روش (Lichstein & van de Sand, 2005) با کمی تغییرات استفاده شد.

داده شد و سپس به آن‌ها میزان ۲۰۰ میکرولیتر سوسترای آنزیم بتاگالاکتوزیداز (ONPG) اضافه شد. پس از افزودن سوسترا، زمان گرفته شد و هنگامی که مخلوط واکنش به دلیل تأثیر آنزیم بتاگالاکتوزیداز بر ONPG و شکسته شدن سوسترا به رنگ زرد در آمد، واکنش با افزودن ۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم (Na₂CO₃) یک مولار به عنوان متوقف کننده واکنش، متوقف شد. کدورت ۸۰۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گردید (OD₄₂₀). فعالیت بتاگالاکتوزیداز با استفاده از فرمول میسر محاسبه شد:

واحدهای میسر = حجم نمونه (میلی لیتر) × زمان (دقیقه) × کدورت در طول موج ۶۰۰ نانومتر / کدورت در ۴۲۰ نانومتر × ۱۰۰۰

بررسی تولید سیگنال هموسرین لاکتون (AHL_s) - تولید سیگنال (N-Butanoyl-L-homoserine BHL lactone)

برای انجام این آزمایش از باکتری *Chromobacterium violaceum* CV026 به عنوان گزارشگر استفاده و مطابق روش (Gottesman & Stout, 2001) انجام شد. در این پژوهش از عصاره استخراج شده استرین UTPF5 و از عصاره‌ی استخراج شده *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 و استاندارد BHL (به عنوان شاهد) استفاده شد. استرین CHA0 به عنوان کنترل منفی (عدم تولید BHL) استفاده شد. وجود لکه صورتی رنگ نشان دهنده‌ی تولید هموسرین لاکتون از نوع BHL در تیمارهای آزمایشی بود.

تولید سیگنال (N-(3-Oxododecanoyl)-L- odDHL homoserine lactone)

برای انجام این پژوهش از *Agrobacterium tumefaciens* NT₁ به عنوان گزارشگر استفاده شد. این آزمایش نیز مطابق آزمایش تولید سیگنال BHL از روش TLC در بند قبل انجام گرفت (Gottesman & Stout, 2001)، با این تفاوت که به جای محیط LB از محیط ABG (شامل ۲ گرم NH₄Cl، ۰/۶ گرم MgSO₄.7H₂O، ۰/۳ گرم KCl، ۰/۰۲ گرم CaCl₂، ۲/۳ گرم NaH₂PO₄، ۶ گرم K₂HPO₄، ۱۰ میلی لیتر گلوکز ۱۰٪ و ۰/۰۵ گرم FeSO₄.7H₂O و ۶۵۰ میلی لیتر آب مقطر) استفاده شد و به این محیط ۴۰۰

به هر قسمت یک درصد از منابع کربنی گلیسرول، سوکروز، گلوکز، فروکتوز و آسپاراژین اضافه شد. بعد از اتوکلاو کردن محیط، یک میلی لیتر از محلول استریل $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ یک مولار اضافه شد. جدایه UTPF5 را به صورت نقطه‌ای در تشتک‌های پتری کشت داده، بعد از چهار روز حلقه‌ای از کشت ۴۸ ساعت قارچ در مرکز تشتک پتری قرار داده، در دمای ۲۷ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. بعد از اینکه ریشه قارچ در پتری شاهد به لبه تشتک پتری رسید قطر هاله بازدارندگی اندازه‌گیری شد.

تهیه فرمولاسیون باکتری

برای تهیه‌ی فرمولاسیون باکتری از روش (Bora et al., 2004) استفاده شد. سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ به مدت پنج دقیقه در ۶۰۰۰g از بافر نمک جداسازی شده و در محلول ۰/۱ مولار سولفات منیزیم سوسپانسیون تهیه شد. گلیسرول به نسبت ده درصد به این سوسپانسیون اضافه شد. به سوسپانسیون حاصل هم حجم آن، محلول سدیم آلجینات اتوکلاو شده اضافه و یک دقیقه در دمای اتاق ورتکس شد. مخلوط باکتری - سدیم آلژینات به پودر تالک سترون مخلوط با چسباننده به نسبت یک به چهار اضافه و کاملاً با هم مخلوط شدند. در این بررسی از سه چسباننده استفاده شد. صمغ عربی به نسبت پنج درصد، کربوکسی متیل سلولز به نسبت یک درصد و صمغ زانتان به نسبت دو درصد نسبت به حجم پودر تالک اضافه شدند. مخلوط حاصل درون پتری در زیر هود به مدت ۱۲ ساعت خشک شد تا رطوبت آن برای آسیاب کردن مناسب شود. پس از پودر کردن فرمولاسیون، درون ظروف پلاستیکی در دمای ۴ درجه و دمای اتاق (۲۵ درجه‌ی سلسیوس) نگهداری شد.

ماندگاری فرمولاسیون پودر تالک در طی مرحله

انبارداری

ماندگاری باکتری آنتاگونیست در حامل پودر تالک که در شرایط تاریکی در دمای یخچال و دمای اتاق نگهداری شدند، هر ۳۰ روز یکبار در طی دوره زمانی ۱۵۰ روزه طبق روش (Sabaratnam & Traquair, 2002)

بررسی قدرت بازدارندگی جدایه UTPF5 *P. fluorescens* از رشد قارچ‌های بیمارگر درون ظرف پتری (Plate assay) - برای بررسی قدرت بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه از روش (Hagedorn et al., 1989) استفاده شد.

تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی باکتری بر وزن خشک توده میسلومی *R. solani*

محیط‌های مایع حاوی میسلوم قارچ از کاغذهای صافی که قبلاً توزین شده بودند، عبور داده شدند. سپس کاغذهای صافی واجد میسلوم به منظور خشک شدن در دمای ۵۵ درجه‌ی سلسیوس در طول شب و سپس مجدداً وزن شدند.

بررسی مکانیسم تأثیر جدایه باکتریایی UTPF5 *P. fluorescens* روی *R. solani* در آزمایشگاه

به منظور بررسی مکانیسم تأثیر جدایه باکتریایی روی رشد قارچ *R. solani* و اثبات نقش آن در فعالیت ضدقارچی، جدایه UTPF5 که علاوه بر دارا بودن خاصیت آنتاگونیستی علیه این قارچ در شرایط آزمایشگاه، توانایی تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن را نیز داشت، اثر ترکیبات فرار، سیدروفور و آنتی‌بیوتیک آن روی رشد قارچ مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

نقش مواد فرار و غیر فرار ضد قارچی روی رشد *R. solani*

این آزمایش با کمی تغییر در روش (Cross & Luper, 1990) انجام شد.

نقش سیدروفور روی رشد قارچ *R. solani*

به منظور بررسی تأثیر سیدروفور از دو محیط KB حاوی ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) و محیط KB فاقد آهن استفاده شد.

تأثیر منابع مختلف کربن روی اثر بازدارندگی جدایه UTPF5 علیه قارچ *R. solani*

برای انجام این آزمایش از محیط NBYA (Nutrient Broth Yeast Agar) مطابق روش (Duffy & De'fago, 1999) استفاده شد. این محیط به پنج قسمت تقسیم شد،

بررسی قدرت کلینزاسیون ریشه کلزا توسط جدایه UTPF5 در گلخانه

بذور کلزا توسط سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری در میلی لیتر تلقیح شدند و در گلدان های حاوی خاک سترون با بافت شنی لومی کاشته شدند. برطبق روش (YAN *et al.*, 2003)، نمونه گیری از ریشه ها از چهار هفته صورت گرفت. پس از نگهداری در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه ی سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت شمارش باکتری ها صورت گرفت که موید جمعیت باکتری روی ریشه بود.

اثر فرمولاسیون های تهیه شده از *P. fluorescens* UTPF5 در کنترل *R. solani*

برای این منظور از روش (Nandakumar *et al.*, 2001) استفاده شد. در این روش ابتدا از هر فرمولاسیون به ازای هر گرم بذر لویبای رقم ناز که در آب مقطر سترون شستشو شده بودند، به مقدار 10^8 سلول باکتری در پتری دیش اضافه شد و به مدت سه ساعت در شرایط استریل نگهداری شدند.

بررسی خواص بیوکنترل UTPF5 *P. fluorescens* در گلخانه علیه *R. solani*

تیمارها شامل شاهد سالم، شاهد آلوده، باکتری خالص (10^8 در میلی لیتر)، باکتری آنتاگونیست همراه با اینوکولوم قارچ بیمارگر، مواد فرمولاسیون بدون باکتری و نه فرمولاسیون شامل ترکیب سه محیط کشت MI، KB و NBY و سه چسباننده کربوکسی متیل سلولز (CMC)، صمغ زانتان (XG) و صمغ عربی (AG) بودند. تعداد نهال های سالم و آلوده شمارش و درصد کاهش بیماری پس از شش هفته مطابق فرمول محاسبه شد.

درصد گیاهچه های سالم در تیمار = تعداد گیاهچه های سالم در شاهد سالم - تعداد گیاهچه های سالم در تیمار / تعداد گیاهچه های سالم در شاهد سالم $\times 100$

آزمایش ها همه در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت و داده های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

محاسبه شد. جمعیت باکتری یک بار پس از تهیه ی فرمولاسیون و نیز یک بار به فاصله ی دو هفته از انجام فرمولاسیون انجام گرفت. یک گرم از هر فرمولاسیون باکتری به نه میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس شد. سپس ده سری رقت تهیه شد. از رقت های ۷، ۸ و ۹ سوسپانسیون پودر تالک UTPF5 روی محیط NA به مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر در هر تشتک پتری پخش شد و در دمای ۲۷ درجه ی سلسیوس قرار گرفت تا کلونی ها ظاهر شدند. سه تکرار برای هر رقت به کار رفت و تعداد سلول زنده باکتری در گرم فرمولاسیون با شمارش کلونی ها و سپس معدل گیری آن ها محاسبه شد.

آزمایش های گلخانه ای

تعیین اثر اکسین تولید شده توسط UTPF5 بر افزایش رشد گیاه

در این آزمون گلخانه ای بذره ای آفتاب گردان تیمار شده با جدایه UTPF5 سودوموناس فلورسنت (قرارگیری بذور به مدت ۳ ساعت درون سوسپانسیون جدایه باکتری) و بذور فاقد باکتری به عنوان شاهد درون گلدان ها کاشته شدند. پس از ۳۰ روز گیاهان را از خاک خارج کرده و طول ریشه، اندام هوایی و وزن تر و خشک گیاهچه اندازه گیری شدند. در نهایت همبستگی فاکتورهای رشدی گیاهان تیمار شده جدایه با میزان تولید اکسین توسط آن جدایه بررسی شد.

اثر جدایه UTPF5 در کاهش بیماری توسط *R. solani*

بدین منظور از دو گرم مایه تلقیح بذر ارزن آلوده به قارچ برای تلقیح یک کیلوگرم خاک استفاده شد. پس از تیمار بذور ارزن با جدایه UTPF5 و کاشت آن ها، شدت بیماری آن ها براساس مقیاس صفر تا پنج و با استفاده از روش (Kim *et al.*, 1997) پس از سه هفته ارزیابی شدند. شاخص بیماری برحسب درصد و با استفاده از فرمول محاسبه شد.

نتایج

بررسی برخی متابولیت‌های *P. fluorescens* UTPF5 و تعیین مقدار اکسین *P. fluorescens* UTPF5 و تعیین همبستگی آن با افزایش رشد گیاه

نتایج حاصل از بررسی توان تولید اکسین باکتری نشان می‌دهد که این جدایه دارای توانایی تولید اکسین است و با طول ساقه، ریشه و وزن تر گیاهچه دارای همبستگی مثبت هستند.

بررسی اثر سویه UTPF5 بر ممانعت از رشد قارچ و تعیین میزان تولید برخی متابولیت‌های مرتبط با آن

باکتری UTPF5 با میانگین ۱۵، ۲۲/۵ و ۲۸ میلی‌متر قطر هاله نارنجی در اطراف کلونی باکتری روی محیط CAS در سه روز متوالی قادر به تولید سیدروفور بود و قطر هاله پروتاز متوسط هفت میلی‌متر و در میزان تولید سیانید هیدروژن، بیشترین تغییر رنگ کاغذ صافی را داشته و در مورد قطر هاله بازدارندگی متوسط ۱۰/۶۶ میلی‌متر بازدارندگی را نشان داد. در مورد آنتی‌بیوتیک فنازین، این جدایه نتوانست روی محیط کشت TSA، آنتی‌بیوتیک فنازین را با روش شرح داده شده تولید کند. تولید فنازین با این روش به اثبات نرسید.

اندازه‌گیری میزان تولید سیدروفور

در این روش به صورت اختصاصی، مقدار تولید سیدروفور نوع پایوردین قابل ارزیابی است. در نتیجه از روی اختلاف موجود بین داده‌های روش CAS آگار می‌توان به تولید و مقدار سیدروفورهای غیر از پایوردین پی برد. مقدار تولید پایوردین در این جدایه ۴۸۷/۰۵ میکرومول تعیین شد.

نقش آهن و روی در تولید سیدروفور

وجود آهن در محیط کشت باعث کاهش معنی‌داری در تولید سیدروفور شد به طوری که در غلظت‌های بالای ۵۰ میکرومول تولید سیدروفور به صفر رسید. در حالی که افزایش غلظت آهن به صورت معنی‌داری باعث افزایش رشد باکتری می‌شد. عنصر روی بر خلاف آهن، به صورت معنی‌داری باعث افزایش تولید سیدروفور شد. حتی در

حضور ۵۰ میکرومول آهن که بازدارنده تولید سیدروفور است تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف روی میزان سیدروفور بالایی تولید کردند و در عین حال تولید بیومس نیز در مقایسه با تیمارهای فاقد آهن بالاتر بود.

نقش آهن در تولید سیانید هیدروژن

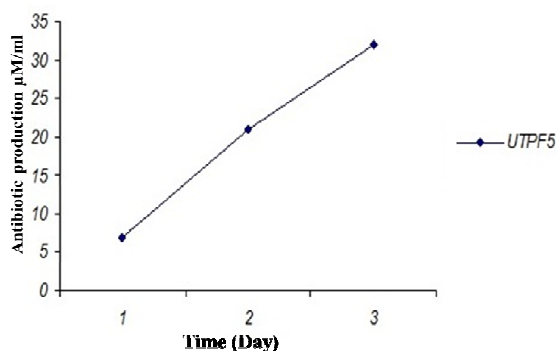
میزان تولید سیانید هیدروژن در این سویه به شدت تحت تأثیر میزان آهن محیط بود به طوری که با افزایش غلظت آهن میزان تغییر رنگ کاغذ صافی به وضوح قابل تمایز بود.

تشکیل بیوفیلم

در مقایسه تشکیل بیوفیلم در باکتری UTPF5 با استفاده از روش میکروتیترپلیت غلظت نوری این جدایه ۰/۰۴۷ به دست آمد.

تولید دی استیل فلوروگلوکوسینول (DAPG)

تولید DAPG در سویه UTPF5 مشاهده شد. این ترکیب در سویه UTPF5 در زمان‌های ۲۴ تا ۷۲ ساعت روند افزایشی داشت (شکل ۱).



شکل ۱- تولید آنتی‌بیوتیک DAPG توسط استرین UTPF5.

Fig. 1. DAPG production by UTPF5.

بررسی تولید سیگنال فعال کننده‌ی مسیر *Gac/Rsm* و اثر آن‌ها در بیان *hcnA* و *RsmZ* با استفاده از فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز

تأثیر سیگنال‌ها بر سویه‌های گزارشگر 3219 CHA0/pME و HA0/pME6530 نشان داد سویه UTPF5 قادر به تولید سیگنال، جهت راه اندازی مسیر *Gac/Rsm* می‌باشد. اثر سیگنال تولید شده توسط سویه UTPF5 در بیان *hcnA* و *RsmZ* زیاد می‌باشد (شکل‌های ۲ و ۳).

نوع BHL نیست. تولید لکه‌های صورتی رنگ در صفحه‌ی TLC نشان‌دهنده‌ی تولید BHL بود.

تولید سیگنال odDHL

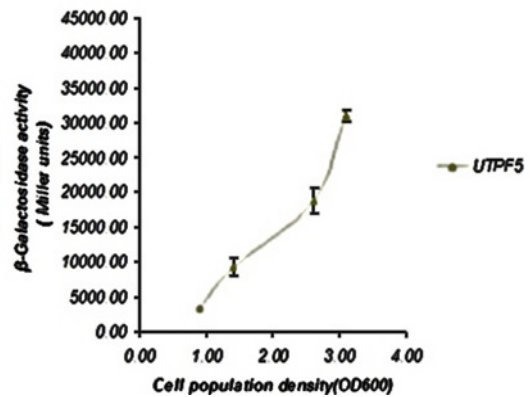
با استفاده از سویه گزارش‌گر *Agrobacterium tumefaciens* NT1 نشان داده شد که سویه UTPF5 قادر به تولید سیگنال هموسرین لاکتون (AHL_s) از نوع odDHL نیست. تولید لکه‌های آبی در صفحه TLC نشان‌دهنده‌ی تولید odDHL بود. سویه *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 به‌عنوان شاهد مثبت قادر به تولید odDHL اما سویه CHA0 به‌عنوان شاهد منفی قادر به تولید این نوع هموسرین لاکتون نبود.

بررسی اثر برخی منابع کربن بر بیان *gfp* با استفاده از پلاسمید گزارشگر حاوی ژن الحاقی *rsmZ-gfp*

در محیط کشت حاوی فومارات بیان *gfp* در سویه UTPF5 زیاد بود. در محیط کشت حاوی سوکسینات نیز سویه در بیان *gfp* اختلاف معنی‌داری نشان داد. در محیط کشت حاوی گلیسرول و محیط GCM نیز وضعیت به‌همین صورت بود با این تفاوت که میزان بیان *gfp* در محیط GCM و محیط حاوی گلیسرول نسبت به محیط حاوی سوکسینات و فومارات بیشتر بود و در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری نشان داد. به‌طور کلی صرف نظر از تأثیر محیط کشت GCM بر بیان *gfp*، در بین منابع کربن استفاده شده در این پژوهش (سوکسینات، فومارات و گلیسرول) بیشترین تأثیر در مورد هر سه سویه مربوط به محیط حاوی گلیسرول بود.

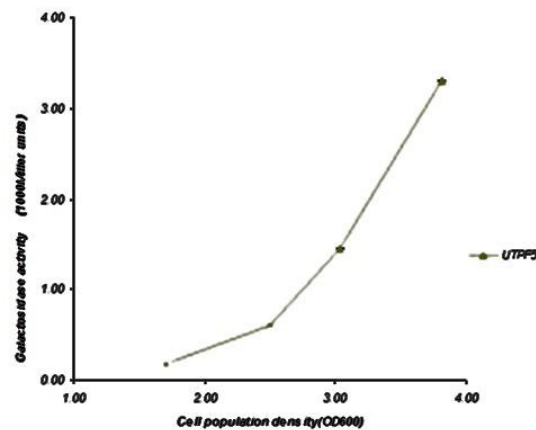
بررسی تحمل به خشکی سویه در آزمایشگاه

آزمایش تحمل به خشکی سویه‌ها پس از ۱،۴،۷ و ۱۰ روز بررسی شد. سویه UTPF5 توانست پس از ۱۰ روز زنده‌مانی خود را در جمعیتی حدود 6×10^5 CFU حفظ نماید. جمعیت اولیه این سویه (در زمان صفر) حدود 5×10^7 CFU محاسبه شد. پس از یک روز، جمعیت به 5×10^7 کاهش پیدا کرد. در روز چهارم جمعیت این سویه به 2×10^7 و ۷ روز پس از قرار دادن در شرایط تنش، زنده‌مانی این سویه به 6×10^6 CFU رسید. این سویه پس از



شکل ۲- تولید سیگنال فعال‌کننده مسیر Gac/Rsm و اثر آن در بیان ژن *hcnA-lacZ* در استرین UTPF5.

Fig. 2. Activation signal of Gac/Rsm path and effect of this on expression of *hcnA-lacZ* gene in UTPF5.



شکل ۳- تولید سیگنال فعال‌کننده مسیر Gac/Rsm و اثر آن در بیان ژن *rsmZ-lacZ* در استرین UTPF5.

Fig. 3. Activation signal of Gac/Rsm path and effect of this on expression of *rsmZ-lacZ* gene in UTPF5.

بررسی تولید سیگنال هموسرین لاکتون (AHL_s) با استفاده از کروماتوگرافی با لایه‌ی نازک (TLC)- تولید سیگنال BHL

در این پژوهش با استفاده از سویه گزارش‌گر *Chromobacterium violaceum* CV026 نشان داده شد که سویه UTPF5 قادر به تولید سیگنال هموسرین لاکتون از

جدول ۲- تأثیر ترکیبات غیر فرار جدایه UTPF5 در جلوگیری از رشد میسلیم *Rhizoctonia solani* روی محیط KB حاوی آهن.

Table 2. Effect of UTPF5 nonvolatile compound in prevention *Rhizoctonia solani* growth on KB with Fe.

Strain	Prevention of fungi growth (%)	Average of fungi colony growth (mm)	Treatment (0.05)
UTPF5	87	5/2	B
control	0	40	A

تأثیر منابع مختلف کربن روی اثر بازدارندگی

جدایه UTPF5 علیه قارچ *Rhizoctonia solani*

محیط NBYA حاوی ۱٪ سوکروز دارای بیشترین قطر هاله بازدارندگی بین میسلیم قارچ و جدایه UTPF5 است (۲۱/۳۳ میلی متر) که با شاهد و با سایر تیمارها اختلاف معنی داری را نشان داد. محیط NBYA حاوی ۱٪ گلوکز هیچ گونه هاله بازدارندگی ایجاد نکرد.

تأثیر نوع محیط کشت در بقا باکتری در نوع

فرمولاسیون

جدایه ی UTPF5 باکتری سودوموناس فلورسنت در محیط کشت M1 با $10^{11} \times 1/1$ سلول باکتری در میلی لیتر محیط کشت، بیشترین میزان جمعیت باکتریایی را نشان داد. محیط کشت های NBY و KB به ترتیب با $10^{10} \times 9/9$ و $10^{10} \times 4$ سلول باکتری در میلی لیتر محیط کشت، در مرتبه بعدی بودند. محیط کشت M1 طی دوره ی پنج ماهه بیشترین میزان جمعیت باکتریایی را نشان داد.

بررسی تأثیر نوع چسباننده در بقا باکتری در

فرمولاسیون

جدایه ی UTPF5 با چسباننده صمغ عربی بیشترین میزان جمعیت باکتری را نشان داد و چسباننده های کربوکسی متیل سلولز و صمغ زانتان در رتبه بعدی بودند.

تأثیر دماهای نگهداری فرمولاسیون در بقای

باکتری

تمامی فرمولاسیون های این جدایه پس از نگهداری به مدت پنج ماه در دمای اتاق میزان جمعیت باکتری بیشتری را نسبت به دمای یخچال نشان دادند.

۱۰ روز نیز با جمعیتی حدود $10^5 \times 6$ زنده مانی خود را حفظ کرد.

بررسی نقش ترکیبات فرار ضد قارچی روی رشد

قارچ *Rhizoctonia solani*

جدایه UTPF5 توانست با تولید ترکیبات فرار و از جمله سیانید هیدروژن از رشد قارچ روی محیط KB حاوی گلايسین جلوگیری نمایند و در سطح ۵٪ تفاوت معنی داری را با شاهد داشتند. جدایه UTPF5 با ۸۰ درصد اثر بازدارندگی بیشترین تأثیر را داشت و اختلاف معنی داری را با شاهد نشان داد.

جدول ۱- تأثیر ترکیبات فرار جدایه UTPF5 در جلوگیری از رشد میسلیم *Rhizoctonia solani* روی محیط KB حاوی گلايسین.

Table 1. Effect of UTPF5 volatile compound in prevention *Rhizoctonia solani* growth on KB whit Glycine.

Strain	Prevention of fungi growth (%)	Average of fungi colony growth (mm)	Treatment (0.05)
UTPF5			
Contro	80	8/33	B
1	0	40	A

بررسی نقش ترکیبات غیر فرار ضد قارچی

(آنتی بیوتیک) روی رشد قارچ *Rhizoctonia solani*

جدایه UTPF5 قادر به تولید آنتی بیوتیک روی محیط KB حاوی ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن بود و براساس آزمون چند دامنه ای دانکن از نظر قطر کلونی تفاوت معنی داری را در سطح ۵٪ با شاهد داشتند. این جدایه توانست ۸۷ درصد از رشد قارچ جلوگیری کنند.

بررسی نقش سیدروفور روی رشد قارچ

Rhizoctonia solani

در هر دو محیط KB حاوی آهن (۸۰ درصد بازدارندگی) و KB فاقد آهن (۸۸ درصد بازدارندگی) این جدایه توانست از رشد قارچ جلوگیری به عمل آورد. درصد بازداری از رشد قارچ با اضافه کردن آهن به محیط کشت، کاهش یافت. بنابراین نقش سیدروفور در جلوگیری از رشد قارچ در جدایه UTPF5 به اثبات رسید.

خشک گیاهچه جزء شش جدایه برتر انتخاب شد. سویه UTPF5 در سرعت جوانه زنی جزء ده جدایه برتر قرار گرفت.

اثر جدایه باکتریایی در کاهش بیماری توسط *R. solani*

جدایه ی UTPF5 به صورت معنی داری باعث کاهش بیماری در سطح ۰/۰۱ درصد شدند.

بررسی قدرت کلنیزاسیون ریشه های کلزا توسط جدایه UTPF5

شمارش کلونی باکتری های رشد یافته روی محیط کشت S1 پس از چهار هفته نشان داد که قدرت کلنیزاسیون ریشه در مورد این جدایه $2/05 \times 10^4$ بود و جزء ده جدایه برتر قرار گرفت.

بررسی خواص بازدارندگی UTPF5 *P. fluorescens* از رشد *Rhizoctonia solani*

نتایج حاصل از بررسی نه فرمولاسیون از این باکتری در جلوگیری از رشد *Rhizoctonia solani* در گلخانه نشان داد که بین فرمولاسیون ها و همچنین اثر متقابل محیط کشت و چسباننده اختلاف معنی داری وجود دارد. فرمولاسیون انجام شده در محیط کشت M1 با چسباننده صمغ عربی با ۷۵ درصد کنترل در کاهش پژمردگی گیاهچه لویا بیشترین تأثیر را نشان داد و فرمولاسیون های انجام شده در محیط کشت NBY و KB به ترتیب با چسباننده های زانتان و کربوکسی متیل سلولز با ۶۲/۵ درصد کنترل پس از فرمولاسیون AG=M1 بیشترین تأثیر را نشان دادند. بقیه فرمولاسیون ها در درصد کنترل تفاوت معنی داری نشان ندادند.

تأثیر UTPF5 *P. fluorescens* فرموله شده در پودر تالک بر فاکتورهای رشدی گیاهچه لویا در گلخانه علیه *Rhizoctonia solani*

تأثیر فرمولاسیون های مختلف پودر تالک جدایه آنتاگونیست بر فاکتورهای رشدی گیاهچه لویا شامل طول ساقه، طول ریشه، وزن تر ساقه، وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه و وزن خشک ریشه پس از شش هفته در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. فرمولاسیون KB-CMC

اثر متقابل محیط کشت و چسباننده - جدایه UTPF5 فرموله شده در سه محیط کشت M1, KB, NBY با سه چسباننده CMC, XG و AG، فرمولاسیون M1-AG بیشترین تأثیر را نشان داده و با شاهد سالم تفاوت معنی داری نشان داد.

اثر متقابل محیط کشت و دما

بین سطوح باکتری، محیط کشت، دمای فرمولاسیون و اثر متقابل بین آن ها در سطح یک درصد اختلاف معنی دار وجود دارد. در پایان شش هفته نگهداری، جدایه UTPF5 فرموله شده در سه محیط کشت و دو دما، محیط کشت M1 در دمای اتاق بیشترین تأثیر را داشته و با شاهد سالم تفاوت معنی داری را نشان می دهد.

بررسی ماندگاری باکتری فرموله شده در حامل پودر تالک

بررسی ماندگاری جدایه UTPF5 فرموله شده در حامل پودر تالک در شرایط تاریکی نشان می داد که جمعیت اولیه این باکتری در فرمولاسیون های مختلف طی مدت نگهداری حفظ نشده بود و جمعیت باکتری کاهش یافته بود. بجز در فرمولاسیون M1-AG که در دمای اتاق نگهداری شد، کاهش زیاد نبوده و در طی دوره ۱۵۰ روزه جمعیت آن از $2/1 \times 10^{11}$ به $1/3 \times 10^{10}$ سلول زنده باکتری در گرم فرمولاسیون کاهش پیدا کرد. همچنین در فرمولاسیون تهیه شده از NBY-XG و KB-CMC در دمای اتاق، جمعیت باکتری به ترتیب از $9/9 \times 10^{10}$ و 4×10^{10} به $3/3 \times 10^8$ و $3/4 \times 10^8$ سلول زنده باکتری در گرم فرمولاسیون کاهش پیدا کرد. در نتیجه این دو فرمولاسیون در دمای اتاق جمعیت قابل قبولی از باکتری را در خود حفظ کردند.

بررسی های گلخانه ای

بررسی اثر جدایه های UTPF5 روی افزایش رشد

گیاه بر اثر تولید اکسین

فاکتورهای رشدی شامل طول اندام هوایی، طول ریشه، وزن تر و خشک گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. جدایه UTPF5 در شاخص طول اندام هوایی جزء ۱۵ جدایه برتر و در وزن تر گیاهچه جزء نه جدایه برتر و در وزن

فسفات غیر آلی عاملی کلیدی برای تشکیل بیوفیلم توسط *P. fluorescens* است که توسط سیستم تنظیمی PhoR/PhoB تنظیم می‌شود (Davey & O, 2000). رابطه‌ی مستقیمی میان تولید آنتی‌بیوتیک فنازین با تشکیل بیوفیلم وجود دارد. منبع نیتروژن برای رشد باکتری‌ها و به دنبال آن تشکیل بیوفیلم اهمیت فراوانی دارد. نقش فسفر در تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد که افزایش KH_2PO_4 به محیط پایه منجر به کاهش تشکیل بیوفیلم می‌شود. برای یک بیوکنترل موفق توسط سودوموناس‌ها نیاز به دانستن فاکتورهای محیطی تأثیرگذار بر تشکیل بیوفیلم و چگونگی تأثیر گذاری آن‌ها داریم.

ریشه‌ی گیاهان ظرفیت معینی از نظر میزان کلنیزاسیون را دارند. سودوموناس‌ها ریشه گندم را در جمعیت 10^5 تا 10^6 سلول باکتری در هر گرم ریشه کلنیزه می‌کنند (Vincent *et al.*, 1991). دینامیک جمعیت باکتری در ریزوسفر و ریزوپلان توسط مقدار جمعیت اولیه تعیین می‌گردد (Fukui *et al.*, 1991). آغشته نمودن بذور چغندر با سوسپانسیون باکتری‌های *P. fluorescens* باعث افزایش عملکرد محصول می‌شود. ولر و کوک در سال ۱۹۸۳ با تیمار بذور گندم با *P. fluorescens* بیماری پاخوره را در گندم بهاره و زمستانه در گلخانه و مزرعه کنترل نمودند (Weller & Cook, 1983).

Hagedorn (1989) سودوموناس‌های جداسازی شده از ریزوسفر گیاهان مختلف را به‌عنوان مؤثرترین آنتاگونیست‌ها علیه *Pythium ultimum* و *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی معرفی نمودند. باکتری‌های آنتاگونیست باید قادر به کلنیزه کردن ریزوسفر باشند تا بتوانند در فرایندهایی از قبیل افزایش رشد گیاه و بیوکنترل موفق نقش مؤثری ایفا نمایند (De Weert & Bloemberg, 2006).

در این تحقیق خاصیت آنتاگونیستی *P. fluorescens* UTPF5 روی *Rhizoctonia solani* به اثبات رسیده است. به‌منظور کاربرد عملی این آنتاگونیست بر علیه عامل بیماری‌زا ضروری است که آن را به وفور تکثیر کرده، به شکل مناسبی فرموله کرده، در محل مناسبی نگهداری نمود تا موقعی که مبارزه لازم باشد و شرایط جوی نیز برای مبارزه

روی طول ساقه از سایر فرمولاسیون‌ها اثر بیشتری داشت اما از میان فرمولاسیون‌های بررسی شده، فرمولاسیون MI-AG در مجموع بهترین اثر را داشت و به‌عنوان بهترین فرمولاسیون شناخته شد.

بحث

سودوموناس‌های فلورسنت بخش مهمی از جمعیت باکتری‌های ریزوسفری را تشکیل می‌دهند (Benizri *et al.*, 1998; Picard *et al.*, 2000)، که به‌طور مستقیم با تولید بعضی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه به‌خصوص اندول استیک اسید (Oberhansli *et al.*, 1991) و نیز به‌طور غیرمستقیم از طریق کنترل بیولوژیک بیمارگرها باعث افزایش رشد آنها می‌شوند (Weller, 1988) و با تولید دی‌استیل فلوروگلوکوسینول توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Siddiqui & Shaukat, 2003).

از بین ۴۱ جدایه باکتریایی جدا شده از ریزوسفر لوبیا و گندم، پنج جدایه دارای اثر مطلوبی در کنترل بیماری مرگ گیاهچه لوبیا بودند و با سویه CHA0 در یک گروه قرار گرفتند (Ahmadzadeh, 2014). ۶۱ درصد جدایه‌های باکتریایی دارای اثر مطلوبی در کنترل مرگ گیاهچه لوبیا بودند. از بین جدایه‌ها UTPF5 بیشترین اثر را داشت اما با افزودن آهن به محیط کشت توان بازدارندگی آن حذف شد که گواه بر نقش سیدروفور در کنترل بیماری بود. تاکنون بیش از ۳۳ فراورده از PGPRها برای استفاده تجاری در گلخانه‌ها و مزارع در شمال آمریکا به ثبت رسیده‌اند (Nakkeeran *et al.*, 2005).

مطالعات مولکولی مشخص کرده است که بیان ژن‌های تولید سیدروفور تحت تنظیم میزان آهن محیط است لذا افزودن آهن نیاز به تولید سیدروفور در این باکتری را مرتفع می‌سازد (Sharifi *et al.*, 2008). با توجه به نتایج به‌دست آمده و گزارش شریفی و همکاران (Sharifi *et al.*, 2008)، می‌توان تا حدودی علت تأثیر عنصر روی در بالا بردن کارایی سودوموناس‌های بیوکنترلی را به نقش تنظیمی مثبت آن در تولید سیدروفور نسبت داد.

کاربرد فرمولاسیون پودر تالک جدایه UTPF5 بصورت تیمار بذر در کاهش بیماری پوسیدگی طوقه و پژمردگی گیاهچه لویا و همچنین افزایش فاکتورهای رشدی آن موثر است. مواد همراه در این فرمولاسیون باعث حفظ اثر جدایه آنتاگونیست در کنترل پوسیدگی طوقه و پژمردگی گیاهچه لویا شده و بر روی رشد گیاه تأثیر مثبت گذاشت. در این بررسی تأثیر فرمولاسیون‌های مختلف پودر تالک جدایه UTPF5 بر فاکتورهای رشدی گیاهچه لویا نشان داد که سه فرمولاسیون برتر ذکر شده بر تمامی فاکتورهای رشدی تأثیر مثبتی گذاشته‌اند.

با توجه به بررسی‌های جامعی که در یک دوره پنج ساله روی باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 انجام گرفته است، این سویه قابلیت زیادی برای تجاری سازی و کاربرد در سطح گلخانه‌ها، مزارع و باغات را دارد. کاربرد این باکتری در توسعه کشاورزی ارگانیک سهم بسزایی خواهد داشت.

سپاس‌گزاری

از آقای محمد عسکری‌نیا به دلیل تأمین بخشی از امکانات مورد نیاز برای این تحقیق، صمیمانه تشکر می‌شود.

مساعد باشد، مبارزه صورت گیرد. تحقیقات در این زمینه نشان داده است که فرمولاسیون پودری (Schisler *et al.*, 2004) و به‌خصوص پودر تالک (Bora *et al.*, 2004) بهترین تأثیر را در بقا و پایداری این باکتری آنتاگونیست داشته است. از خواص خوب پودر تالک این است که از نظر شیمیایی بی اثر بوده و توازن رطوبتی بسیار کمی دارد و ضمن افزایش شدت اثر باکتری‌های آنتاگونیست، دوره انبارداری محصول فرموله شده را افزایش داده و همچنین در دسترس است. بررسی جزء به جزء فاکتورها نشان داد که کیت نگهداری و مهم‌تر از آن بقا باکتری فرموله شده در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به مراتب بیشتر از دمای چهار درجه‌ی سلسیوس است که نتایج به‌دست آمده با نتایج (Bora *et al.*, 2004) و (Farzane, 2008) متفاوت بود. ممکن است علت بقای بیشتر باکتری در دمای ۲۵ درجه تکثیر باکتری آنتاگونیست موجود در فرمولاسیون باشد زیرا نرخ تکثیر باکتری‌ها در دماهای پایین به شدت کاهش می‌یابد. همچنین در این بررسی، از چسباننده‌های تجاری در فرمولاسیون استفاده شد و چسباننده‌های آزمایشگاهی با وجود برتری کیفی در سطح آزمایشگاه استفاده نشدند که این نیز می‌تواند به بقا باکتری در دمای اتاق کمک کند.

References

- Ahmadzadeh, M. 2014. Biological Control of Plant Diseases Plant Probiotic Bacteria (2th). University of Tehran Institute Publications (In Persian).
- Alstrom, S. & Burns, R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology of Fertility Soil*, 7: 232-238.
- Alexander, D.B. & Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology of Fertility Soils*, 12: 39-45.
- Baker, K.F. 1987. Envolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25: 67-85.
- Benizri, E., Courtade, A., Picard, C. & Guckert, A. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxin by *Pseudomonas fluorescens* M.3.3. *Soil Biology and Biochemistry*, 30: 481-484.
- Bora, T., Ozaktan, H., Gore, E. & Aslan, E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wetttable powder formulations of the two strains of *Pseudomonas putida*. *Journal of Phytopathology*, 152: 471-475.
- Branda, S.S., Ashild, V., Friedman, L. & Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Microbiology*, 13: 20-24.

- Davey, M.E. & O Toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbial and Molecular Biology Reviews*, 64: 847-867.
- De Weert, S. & Bloemberg, G.V. 2006. Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontrol. *Plant Associated Bacteria*, 317-333.
- Duffy, B.K. & De'fago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied Environment Microbiology*, 65: 2429-2438.
- Edens, W.A., Goins, T.Q., Dooley, D. & Henson, J.M. 1999. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Applied Environment Microbiology*, 65: 3071-3074.
- Farzane, M., 2008. Effect of antagonist bacterial in controlling *Phytophthora cactorum* crown and root rot of apple trees. MSc Thesis. University of Tehran (In Persian with English summary).
- Fletcher, M. 1977. The effect of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Canadian Journal of Microbiology*, 23: 1-6.
- Fukui, R., Poiner, E.I. & Schorth, M.N. 1991. Bacterial growth on inoculated sugar beet seed in soil and its effect in controlling infection by *Pythium* spp. (Abstr.) *Phytopathology*, 81:344.
- Gordon, S.A. & Weber, R.P. 1950. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 30(1): 86-8.
- Gottesman, S. & Stout, V. 2001. Regulation of capsular polysaccharide synthesis in *Escherichia coli* K-1. *Molecular Microbiology*, 5: 159-164.
- Hagedorn, C., Gould, W.D. & Bradinelli, R.T. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environment Microbiology*, 55: 2793-2797.
- Kim, D.S., Cook, R.J. & Weller, D.M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of tree root disease of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology*, 87: 551-558.
- Lichstein, H.C. & Van De Sand, V.F. 2005. Violacin, an antibiotic pigment produced by *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Infect Disease*, 55: 123-142.
- Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L. & Bloemberg, G.V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 461-490.
- Maddula, V.S.R.K., Zhang, Z., Pierson, E.A. & Pierson, L.S. 2006. Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (aureofaciens) strain 30-84. *Microbial Ecology*, 52: 289-301.
- Maurhofer, M., Keel, C., Hass, D. & Defago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology*, 44: 40-50.
- Maurhofer, M., Keel, C., Schnider, U., Voisard, C. & De'fago, G. 1992. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity. *Phytopathology*, 82: 190-195.
- Morris, C.E. & Monier, J.M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 41: 429-453.
- Morrissey, J.P. & Osbourn, A.E. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology Molecular Biology Review*, 63: 708- 724.

- Nakkeeran, S., Dilantha Feenando, W.G. & Siddiqui, Z.A. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria formulation and its scope in commercialization for the management of pests and disease. Z.A. Siddiqui (ed.), PGPR: Biocontrol and Biofertilization, Springer, Dordrecht, the Netherland, 257-296.
- Nandakumar, R., Babu, S., Viswanathan, R., Sheela, J., Raguchander, T. & Samiyappan, R. 2001. A new bioformulation containing plant growth promoting rhizobacterial mixture for the management of sheath blight and enhanced grain yield in rice biocontrol, 46: 493-510.
- Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D. & De'fago, 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: 873-881.
- Oberhansli, T., Defago, G. & Hass, D. 1991. Indol-3-acetic acid (IAA) synthesis in the biocontrol strain CHA0 of *Pseudomonas fluorescens*: role of tryptophan side chain oxidase. Journal of General Microbiology, 137: 2273-2276.
- Picard, C.F.D., Cello, I., Ventura, M., Fani, R. & Guckert, A. 2000. Frequency and biodiversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol production bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stage of plant growth. Applied Environment Microbiology, 66: 948-955.
- Sabaratnam, s. & Traquair, A.J. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping off in tomato transplants. Biological Control, 23: 245-253.
- Schippers, B., Bakker, A.W. & Bakker, P.A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganism and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology, 25: 339-358.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J., Behle, R.W. & Jackson, M.A. 2004. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant disease. Phytopathology, 94: 1267-1271.
- Sharifi, R., Ahmadzadeh, M., Sharifi-Tehrani, A. & Fallahzadeh, V. 2008. Competition for iron uptake by *Pseudomonas fluorescens* to control of *Rhizoctonia solani* Kuhen causing agent of bean damping off disease. Journal of Plant Protection, 22(2): 183-195
- Siddiqui, I.A. & Shaukat, S.S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylphloroglucinol. Soil Biology and Biochemistry, 35: 1615-1623.
- Thomashow, L.S. & Weller, D.M. 1988. Role of a Phenazine Antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in Biological Control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Journal of Bacteriology, 170 (8): 3499-3508.
- Vanetten, H., Temporini, E. & Wasman, C. 2001. Phytoalexin (and Phytoanticipin) tolerance as a virulence trait: Why is it not required by all pathogens? Physiology Molecular Plant Pathology, 59: 83-93.
- Vincent, M.N., Harrison, L.A., Brackin, J., Kovacevich, P., Mukerji, P., Weller, D.M. & PIERSON, E.A. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soil borne *Pseudomonas aureofaciens* strain. Applied Environment Microbiology, 48: 897-899.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soil born plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology, 26: 379-407.
- Weller, D.M. & Cook, R.J. 1983. Suppression of take all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonadas. Phytopathology, 73: 463-469.

Yan, Z., Reddy, M.S. & Kloepper, J.W. 2003. Survival and colonization of rhizobacteria in tomato transplant system. Canadian Journal of Microbiology, 49: 383-389.

Determination and introduction of biological and biochemical features of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 as plant probiotic bacterial in Iran

Negar Bagheri¹, Masoud Ahmadzadeh¹, Rouhallah Sharifi², Roholah Saberi-Rise³, Ehsan Mohammadkhani⁴

1. Plant Protection Department, University of Tehran, Iran

2. Agricultural college Kermanshah Razi University, Iran

3. Plant Protection Department, Rafsanjan Valiasr University, Iran

4. Zabol University, Iran

Corresponding author: Masoud Ahmadzadeh, email: ahmadz@ut.ac.ir

Received: Feb., 20, 2015

3 (2) 1-17

Accepted: Oct. 13, 2015

Abstract

Finding new strains of plant probiotic bacteria is an important step in commercialization process. In this study, the biological and biochemical features of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 is evaluated as an important bacterial in Iran. This strain produces metabolite such as auxin, hydrogen cyanide, siderophore and DAPG, but not phenazin. Biofilm formation, regulator systems examined. Also inhabitation of fungi growth such *Rhizoctonia solani* is determined. Addition of Fe²⁺ reduces the production of siderophore but increases hydrogen cyanide. The strain UTPF5 produces Gac/Rsm signal and increases hcnA and RsmZ expression. It produces no AHL signal. Biocontrol potential and plant growth promotion in sunflower, millet, canola and bean is described by application of the bacterium in greenhouse trials.

Keywords: biofilm, DAPG, hydrogen cyanide, regulator systems, *Pseudomonas fluorescens* UTPF5
