Archive of SID

بیان ژنهای کیتیناز (*nag1* و *ech42*) در قارچ *Trichoderma atroviride* در برهمکنش با باکتری *Pseudomonas fluorescens*

The expression of chitinase genes (*nag1* and *ech42*) of *Trichoderma atroviride* in interaction with *Pseudomonas fluorescens*

اکبر شیرزاد*، عباس شریفی تهرانی، مسعود احمدزاده، کیوان بهبودی و محمد جوان‌نیکخواه

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران و گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان

دریافت ۱۳۸۷/۱۲/۳ پذیرش ۱۳۸۸/۲/۲۳

چکیده

بکارگیری مخلوطی از چند عامل بیوکنترل، به عنوان راهکاری برای افزایش میزان کارآیی کنترل، ممکن است اثرات مثبت یا منفی در بیان ژنهای بیوکنترلی این عوامل داشته باشد. در این تحقیق، اثر چندین جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens* در بیان ژن‌های *nag1* و *ech42* قارچ *Trichoderma atroviride* استرین P1 با استفاده از سیستم بیان ژن گزارشگر گلوکز اکسیداز، نشان داد که برهم‌کنش بین *T. atroviride* و *P. fluorescens* باعث کاهش بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* می‌گردد. کاهش بیان ژن در حضور جدایه‌های باکتریایی اعم از $DAPG^+$ (2,4- diacetylphloroglocinol) یا $DAPG^-$ مشاهده شد. این نشان می‌دهد که DAPG نقشی در این کاهش بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* ندارد. برعکس، بیان ژن *nag1* در تعامل با جدایه‌های $DAPG^+$ افزایش نشان داد، ولی در حضور جدایه‌های $DAPG^-$ تغییر معنی‌داری در بیان این ژن مشاهده نشد. میزان رشد میسلیومی *T. atroviride* در تعامل با باکتری‌ها کاهش پیدا کرد. کاهش رشد در حضور جدایه‌های $DAPG^+$ در مقایسه با جدایه‌های $DAPG^-$، بیشتر بود که نشان دهنده نقش احتمالی آنتی‌بیوتیک DAPG در کاهش رشد قارچ می‌باشد. بطور خلاصه،

* مسئول مکاتبه

www.SID.ir

Archive of SID

این نتایج نشان داد که برهمکنش اختصاصی بین آنتاگونیستهای مورد مطالعه، می تواند در بیان ژنهای مهم بیوکنترلی آنها تاثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، کیتیناز، ژنهای *ech42* و *nag1*، *Trichoderma atroviride*، *Pseudomonas fluorescens*

مقدمه

استفاده از عوامل بیولوژیکی از جمله گونه‌های مختلف تریکودرما و سودوموناد‌های فلورسنت، یکی از مهمترین پتانسیل‌های جایگزین در مدیریت بیماریهای گیاهی میباشد. متاسفانه کارایی متغیر عوامل بیوکنترل در مناطق و فصول مختلف، موجب کندی این عوامل در مدیریت بیماریهای گیاهی شده است (Duffy *et al*. 1996, Lorito *et al*. 1996). یکی از راههای فایق آمدن بر این مشکل، بکارگیری همزمان چند عامل بیوکنترل می‌باشد (Genowati 2001). بکارگیری مخلوطی از چند عامل بیوکنترل باعث نزدیکتر شدن جمعیت خاک به شرایط طبیعی شده و به عنوان یک استراتژی مناسب‌تر و با ثبات تر و یک راهکار برای افزایش میزان کارآیی تیمارهای بیوکنترل در دامنه محیطی وسیع‌تر پیشنهاد شده است (Pierson & Weller 1994, Duffy & Weller 1995, Duffy *et al.* 1996, Raupach & Klopper 1998, Genowati 2001, Rini & Sulochana 2006) البته این موضوع همیشه صادق نیست و گزارشهایی نیز نشانگر این است که کاربرد ترکیب برخی از عوامل بیوکنترل، تأثیری درکاهش بیماری نداشته و یا حتی توان کنترل کنندگی کمتری نسبت به کاربرد جدایه منفرد داشته‌اند (Dandurand & Knudsen 1993, Duffy *et al*. 1996, de Boer *et al*. 1999; Ryder *et al*. 1999, Genowati 2001; Molina *et al*. 2003) بنابراین، مطالعه دقیق اینکه در هر سیستم، آیا عوامل بیوکنترل مورد نظر بصورت انفرادی بهتر عمل میکنند و یا در حالت تلفیق با همدیگر، ضروری می‌باشد. یک پیش‌نیاز اساسی و مهم در ترکیب عوامل بیوکنترل، انتخاب جدایه‌هایی میباشد که بجای مداخله، توان آنتاگونیستی همدیگر را تکمیل کنند (Lutz *et al.* 2004). از جمله عوامل بیوکنترلی که در سطح وسیع مطالعه شده و کاربرد تجارتی هم پیدا کرده‌اند، سودوموناد‌های فلورسنت و گونه‌های مختلف تریکودرما میباشند که کاربرد این عوامل بصورت تلفیقی نیز مطالعه شده و هر دو حالت کاهش (Duffy *et al*.1996, Rini & Sulochana 2006) و افزایش میزان بیماری (Dandurand & Knudsen 1993, Duffy *et al*. 1996) گزارش شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

علی‌رغم مطالعات متعدد در ارتباط با کاربرد دو یا چند عامل بیوکنترل در مدیریت بیماری، گزارشها در سطح مولکولی بسیار محدود می‌باشند. وقتی عوامل بیوکنترل بصورت مخلوط بکار برده شوند، ممکن است در بیان ژنهای بیوکنترلی یکدیگر اثر مثبت یا منفی داشته باشند. گونه‌های مختلف جنس تریکودرما آنزیمهای تجزیه‌کننده کیتین (کیتیناز) ترشح می کنند که میتوانند دیواره سلولی آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها را تجزیه کنند (Mach *et al*. 1999). آنزیمهای کیتیناز تولیدشده توسط گونه‌های تریکودرما، مورد توجه زیادی قرار گرفته اند، زیرا کیتین یکی از ترکیبات اصلی ساختار دیواره سلولی بسیاری از قارچها می‌باشد (Viswanathan *et al.* 2006) و به همین دلیل، کیتینازها در کنترل تعداد زیادی از عوامل بیماریزای گیاهی نقش مهمی دارند (Collinge *et al.* 1993, Lorito *et al*. 1998, Gokul *et al.*) . 2000 گونه *Trichoderma atroviride*) استرین P1، چندین آنزیم تجزیه کننده دیواره سلولی تولید می‌کند که کیتیناز ECH42 (کد شده توسط ژن *ech42*) و N-acetyl-ß-D-glucosaminidase (کد شده توسط ژن *nag1*) از مهمترین آنها می‌باشند (Mach *et al*. 1999, Woo *et al*. 1999). در این تحقیق، اثر چندین جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens* در بیان ژن‌های *nag1* و *ech42* قارچ *T. atroviride* استرین P1 با استفاده از سیستم بیان ژن گزارشگر گلوکز اکسیداز (Mach *et al*. 1999)، و RT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه و نگهداری میکروارگانیسم ها

قارچ *Trichoderma atroviride* استرین P1 و مشتقات آن که حامل ژن گزارشگر *goxA* (ژن کد کننده گلوکز اکسیداز) در ترکیب با ژنهای *ech42* (مشتق *ech42-gox*) و یا *nag1* (*nag1-gox*) (اهدایی دکتر Lutz از موسسه علوم گیاهی، دانشگاه پلی‌تکنیک زوریخ، سوییس (ETH)) بودند، بطور مرتب در طول آزمایشها روی محیط PDA در ۲۵°C تکثیر شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت این استرین‌ها، سوسپانسیون اسپور قارچ در گلیسرول ۲۰٪ تهیه و در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید (Lutz *et al*. 2004). این استرین‌ها، با بیان ژن گلوکز اکسیداز، می‌توانند الگوی فعالیت ژنهای *ech42* و *nag1* را تحت شرایط مختلف نشان دهند (Mach *et al.* 1999).

تعداد ۲۶ جدایه *Pseudomonas fluorescens* از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک

www.SID.ir

Archive of SID

دانشگاه تهران تهیه و پس از بررسی‌های آزمایشگاهی اولیه در مورد قدرت بازدارندگی آنها از رشد میسلیومی قارچ عامل پاخوره گندم، *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx & Olivier var. *tritici* Walker (Ggt) تعداد هفت جدایه شامل CHA0، B119 و Z7 (دارای خاصیت بازدارندگی بالا)، P4 و P17 (با خاصیت بازدارندگی متوسط)، P21 و P6 (با خاصیت بازدارندگی ضعیف) جهت بررسی اثرات احتمالی آنها در بیان ژنهای *ech42* و *nag1* تریکودرما انتخاب شدند (جدول ۱). از استرین CHA0 بعنوان شاهد استاندارد جهت ارزیابی فعالیت بیوکنترلی استرین‌های دیگر استفاده شد. باکتری‌ها بطور معمول در محیط King's B (KMB) یا S_1 کشت شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت، جدایه‌ها در گلیسرول ۴۰٪ سترون و در دمای ۲۰°C- قرار داده شدند (McSpadden *et al*. 2000, Duffy *et al*. 1996).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* مورد مطالعه

Table 1. *Pseudomonas fluorescens* strains selected for study

Pseudomonas strain	Origin	Location
CHA0	Tobacco rhizosphere	Switzerland
B119	Sunflower rhizosphere	Orumieh
Z7	Wheat rhizosphere	Tabriz
P17	Wheat rhizosphere	Karaj
P4	Wheat rhizosphere	Karaj
P6	Wheat rhizosphere	Karaj
P21	Wheat rhizosphere	Karaj

ردیابی جدایه‌های باکتریایی واجد ژنهای کلیدی سنتز آنتی‌بیوتیک‌های 2,4-diacetylphloroglocinol (Phl) و phenazine-1-carboxylic acid (PCA) با استفاده از PCR

۱- ردیابی ژن *phlD*

بمنظور شناسایی جدایه‌های باکتریایی تولید کننده آنتی‌بیوتیک 2,4- diacetylphloroglocinol (DAPG)، ژن *PhlD* بعنوان یک ژن کلیدی در مسیر سنتز این آنتی‌بیوتیک، با استفاده از آغازگرهای phl2b (5'-ACC GCA GCA TCG TGT ATG AG-3') و phl2a (5'-GAG GAG GTC

www.SID.ir

Archive of SID

GAA GAC CAC CA-3') (ساخت شرکت Sigma) مورد ردیابی قرار گرفت (Keel *et al.*1996, Raaijmakers *et al*. 1997, McSpadden *et al*. 2000). این آغازگرها که براساس توالی ژن *phlD* باکتری *P. fluorescens* Q2-87 (کد دسترسی بانک ژن U41818) طراحی شده‌اند، قطعه‌ای از DNA را بطول ۷٤۵ جفت باز تکثیر می‌کنند (Raaijmakers *et al*. 1997).

استخراج DNA، بر اساس روش *وانگ* و همکاران (Wang *et al*. 2001) انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR، شامل ۱۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی (BSA)، ۵ درصد دی متیل سولفوکسید (DMSO)، ۲/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرومول از هر یک از نوکلئوتیدهای dATP، dTTP، dCTP و dGTP، ۱/۵ واحد DNA پلی مراز *Taq* و ٤ میکرولیتر DNA باکتری (حدود ۵۰ نانوگرم)، در 1X بافر PCR بود.

عمل تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل TGRADIENT (ساخت شرکت Biometra آلمان) انجام گرفت. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه ۹٤ °C به‌مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای با هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹٤ °C؛ ۳۰ ثانیه در ٦۵ °C و ٦۰ ثانیه در ۷۲ °C، و در پایان یک چرخه ۷۲ °C برای ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵درصد در ۸۰ ولت به مدت دو ساعت الکتروفورز شده و نتایج، با استفاده از دستگاه Gel-Documentation مدل Bio Doc Analyze (شرکت Whatman Biometra آلمان) بررسی گردید.

۲- ردیابی ژنهای تولیدکننده فنازین (PCA)

آزمایش PCR، مطابق روش تکثیر ژن *phlD* و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PCA2a (5'- CCGCGTTGTTCCTCGTTCAT-3') و PCA3b (5'- TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC-3')، برای ردیابی ژنهای *phzC* و *phzD* (که در مسیر بیوسنتز فنازین دخالت دارند)، مورد استفاده قرار گرفت (Raaijmakers *et al.* 1997). این آغازگرها، به‌ترتیب با استفاده از توالی ژنهای *phzC* و *phzD* در جدایه *P. fluorescens* 2-79 (کد دسترسی بانک ژن L48616) طراحی شده‌اند (Raaijmakers *et al.* 1997). برنامه سیکل حرارتی PCR شامل یک مرحله ۹٤ °C به مدت ۱۲۰ ثانیه و یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای (هر چرخه شامل ۹٤ °C، ٦۰ ثانیه؛ ٦۷ °C، ٤۵ ثانیه؛ ۷۲ °C، ٦۰ ثانیه) و یک مرحله ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه در پایان بود.

استخراج و اندازه‌گیری آنتی بیوتیک 2,4-diacetylphloroglocinol (DAPG)

برای تایید نتایج حاصل از PCR، جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* از نظر تولید DAPG با

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از روش HPLC مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا جدایه ها در محیط LB (۲۷°C، ۱۶۰rpm) به مدت یک شب رشد داده شدند و سپس با آب مقطر سترون تا حدود OD_{600} = 0.001 رقیق گردیدند. ۴۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط yeast-malt extract (YME) (Schnider *et al*. 2000) کشت شده و در روی شیکر با ۱۶۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷°C قرار داده شد. بعد از ۷۲ ساعت، آنتی‌بیوتیک DAPG با استفاده از روش دافی و دفاگو (Duffy & Defago, 1999) استخراج شد. بدین ترتیب که، ۱۵ میلی‌لیتر از هر نمونه در داخل لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و اسیدیته آن با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال، به ۲ تا ۲/۵ رسانده شد. پس از اضافه کردن اتیل استات به نسبت ۱ به ۱ (حجم به حجم)، محلول به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز آلی به داخل ظروف شیشه ای ته گرد انتقال یافته و در زیر هود لامینار قرار گرفت. پس از تبخیر، باقیمانده در ۱ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC حل گردید و برای تایید حضور آنتی‌بیوتیک، با استفاده از دستگاه HPLC مدل Shimadzu-SPD-6VA مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های ۱۰ میکرولیتری در ستون HPLC به ابعاد ۱۵۰×۴/۶ میلی‌متر از نوع Nucleosil 120-5- C18 با روش فاز معکوس در دمای اتاق، تزریق شدند. سرعت فاز متحرک (شامل ۶۰٪ فسفات پتاسیم ۰/۱ میلی‌مولار و ۴۰ ٪ استونیتریل با pH=۵/۸) یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. پیک استاندارد برای آنتی بیوتیک DAPG، ۲۸۳ نانومتر و زمان تاخیر ۹/۲ دقیقه بود. بر این اساس، مقدار آنتی بیوتیک تولید شده توسط جدایه‌های *P. fluorescens* بر حسب میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت محاسبه گردید.

بررسی میزان بیان ژن کیتیناز قارچ *T. atroviride* در برهمکنش با باکتری *P. fluorescens* با استفاده از سیستم گزارشگر گلوکز اکسیداز

بمنظور بررسی اثر احتمالی *P. fluorescens* در بیان ژن *ech42* (کدکننده آنزیم کیتیناز ECH42) و *nag1* (کد کننده آنزیم N-acetyl-ß-D-glucosaminidase) در *T. atroviride*، از یک سیستم گزارشگر بر اساس بیان ژن گلوکز اکسیداز (*gox*) (Mach *et al*. 1999) استفاده شد. برای این کار، استرین *ech42-gox* (حامل ژن گزارشگر *goxA* در ترکیب با ژن *ech42*) و استرین *nag1-gox* (حامل ژن گزارشگر *goxA* در ترکیب با ژن *nag1*) بکار برده شدند

www.SID.ir

Archive of SID

(Mach *et al*. 1999, Lutz *et al.* 2004). اثر هفت جدایه باکتری *P. fluorescens* ، در بیان این دو ژن مهم بیوکنترلی *T. atroviride* مطابق روش لوتز و همکاران (Lutz *et al*. 2004) بررسی گردید. بدین منظور، جدایه‌های باکتریایی در محیط سترون LB (۲۷°C، ۱٦۰rpm) به مدت یک شب رشد داده شده و سپس با آب مقطر سترون تا حدود 10^8cfu/ml (OD_{600} = 0.125) رقیق شد. از این سوسپانسیون باکتریایی، چهار لکه ۲۰ میکرولیتری پیرامون یک دایره به شعاع ۳ سانتیمتر با فواصل مساوی در یک تشتک پتری حاوی محیط کشت مالت آگار ۱/۵ درصد مایه‌زنی گردید. سپس، یک قرص از کشت تازه‌ی قارچ تریکودرمای حامل گزارشگر *ech42-gox* و یا *nag1-gox* به طور وارونه در وسط محیط کشت گذاشته شده و در تاریکی در دمای ۲٤°C نگهداری شد. بعد از ٦٦ ساعت، ناحیه سطح میسلیوم قارچ توسط یک پلانی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (شامل ۱/۲ گرم در لیتر KH_2PO_4، ۲/٦ گرم در لیتر K_2HPO_4، pH=۷/۱) به هر تشتک پتری اضافه شده و تشتک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در ۸۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. مایع حاصل هر تشتک که حاوی قطعات میسلیومی قارچ نیز بود، در یک لوله سانتریفیوژ جمع‌آوری و در ۱۸۰۰ دور بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از برداشتن محلول رویی، از روش گیزن (Geisen 1995) و ماخ و همکاران (Mach *et al.* 1999) برای اندازه گیری میزان فعالیت گلوکز اکسیداز، استفاده گردید. ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی مربوط به هر یک از تیمارها با ۱۸۰ میکرولیتر از محلول واکنش (شامل ۵ میلی‌لیتر گلوکز ۱ مولار، ۲ میلی‌لیتر آنزیم Horseradish Peroxidase (Roche، آلمان) با غلظت (10U/ml)، ۱۰ میلی‌لیتر ABTS ([2,2´-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) ۲ میلی‌مولار (Roche، آلمان)، یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۱۱ میلی‌مولار با pH = ۵/۸) مخلوط شده و در هر چاهک پلیت الیزا ریخته شد. پس از یک دقیقه، میزان افزایش جذب نوری در ٤۲۰ نانومتر در سه مرتبه با فاصله زمانی سه دقیقه توسط دستگاه ELISA Reader Sunrise اندازه گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز بصورت میزان آنزیم مورد نیاز برای اکسیداسیون یک میکرومول گلوکز در دقیقه در دمای ۲۵ °C (pH=۵/۸) تعیین گردید. این آزمایش برای هر یک از ژنهای *ech42* و *nag1* بطور جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار (شامل هفت جدایه باکتری همراه با قارچ و قارچ تنها) در شش تکرار انجام گرفت. همچنین، آزمایش سه بار در

www.SID.ir

Archive of SID

طی زمانهای مختلف تکرار گردید. نهایتاً تجزیه آماری داده‌ها بصورت اسپلیت پلات در زمان در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS13 صورت گرفت. بدلیل معنی‌دار نبودن اثر متقابل زمان در تیمار، داده‌های حاصل از زمانهای مختلف برای هر کدام از تیمارها ادغام شدند. مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

بررسی میزان بیان ژن کیتیناز قارچ *T. atroviride* در تعامل با باکتری *P. fluorescens* از طریق RT-PCR

بمنظور تایید نتایج حاصل از بررسی اثر *P. fluorescens* در بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* (تیپ وحشی) با استفاده از گزارشگر *gox*، از روش RT-PCR استفاده شد. در این آزمایش، نحوه کشت قارچ و باکتری همانند روش بالا بود، و پس از ٦٦ ساعت نگهداری، ناحیه سطح میسلیوم قارچ توسط یک پلانی‌متر اندازه‌گیری و سپس با استفاده از یک تیغه سترون جمع‌آوری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از جمع‌آوری میسلیومها، RNA با استفاده از Tri-Reagent (Sigma) طبق روش پیشنهادی کارخانه سازنده استخراج گردید. رسوب RNA ی حاصل با اتانول۷۰٪ شسته و پس از خشک شدن، در آب مقطر سترون (RNAse-free) حل گردید. بعد از تیمار با آنزیم (Roche) DNase، غلظت RNA در نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر بطور یکنواخت تنظیم گردیده و cDNA با استفاده از کیت RT Super Script III، بشرح زیر ساخته شد:

مخلوط ۵ میکروگرم از RNA بهمراه یک میکرولیتر از آغازگر پلی T، یک میکرولیتر از آغازگر با توالی تصادفی (هر یک ۵۰ میکرومول) و یک میکرولیتر از مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مول)، با افزودن آب مقطر به حجم ۱۳ میکرولیتر رسانده و پس از ۵ دقیقه نگهداری در٦٥°C، بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ گذاشته شد. سپس یک میکرولیتر (۲۰۰ واحد) از آنزیم RT-Super Script III، یک میکرولیتر (٤٠ واحد) RNasine و یک میکرولیتر DDT یکدهم مول اضافه شده و حجم نهایی با استفاده از بافر (شامل ۲۵۰ mM کلرید پتاسیم، mM ۲۵۰ Tris-HCl با pH=۸/۳، ۲۵۰ mM کلرید کلسیم) به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس این مخلوط به مدت یک ساعت در ۵۰°C نگهداری شد تا واکنش سنتز cDNA تکمیل شود.

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

یک میکرولیتر از cDNAی تهیه شده در مخلوطی شامل ۲/۵ میلی‌مول از MgCl2، ۰/۵ میلی‌مول dNTP، ۰/۵ میلی‌مول آغازگر Ech42-F 1 ('5-ATG TTG GGT TTC CTC GGA -3')، ۰/۵ میلی‌مول آغازگر Ech42-R ('5- TCA TTC GGG ATG GTT GTC A -3') و ۵ واحد DNA پلیمراز *Taq*، اضافه شده و حجم نهایی آن با استفاده از بافر PCR و آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر رسید. برنامه چرخه حرارتی PCR شامل یک چرخه ۹٤°C، ٤ دقیقه و سپس یک دوره ۳۰ چرخه‌ای که هر چرخه شامل ۹٤°C، ۳۵ ثانیه؛ ٦۰°C، ٤۵ ثانیه؛ ۷۲°C، ٦۰ ثانیه و در پایان یک چرخه °C ۷۲، ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش قطعه DNAی ۱۲٦۳ جفت‌بازی می‌باشد. برای یکسان سازی مقدار cDNAی استفاده شده در آزمایشات PCR، از ژن Actin استفاده گردید. برای واکنشهای PCR ژن اکتین از آغازگرهای Act-F (- 5′- AGA AGT TGC TGC CCT CGT T 3′) و Act-R (′3- 5′- CTC AGC CAG GAT CTT CAT C) استفاده شد که محصول آن قطعه ۵۷۵ جفت‌بازی می‌باشد. محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. میزان بیان ژن در تیمارهای مختلف با استفاده از نرم افزار ImageJ مقایسه گردید.

نتیجه

ردیابی جدایه‌های *P. fluorescens* واجد ژن‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک‌های Phl و PCA

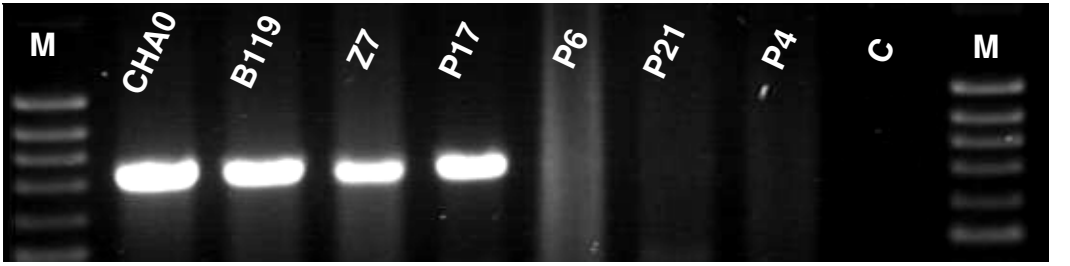
نتایج آزمایشهای اولیه نشان داد که جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی از نظر بازدارندگی رشد Ggt با هم متفاوت بودند (داده‌ها آورده نشده‌اند). از آنجائیکه آنتی‌بیوتیکهای Phl و PCA در کنترل عوامل بیماریزا از جمله Ggt از اهمیت بالایی برخوردارند (Thomashow & Weller 1988, Keel *et al*. 1992, Harrison *et al*. 1993; Sharifi-Tehrani *et al*. 1998, Raaijmakers *et al*. 1998, 1999, McSpadden *et al*. 2000, Weller *et al*. 2002, Ownley *et al*. 2003) بنابراین وجود ژنهای سنتزکننده این آنتی‌بیوتیکها در جدایه‌های *P. fluorescens* با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR با استفاده از جفت آغازگر phl2a و phl2b که قطعه‌ای بطول ۷٤۵ جفت باز تکثیر می‌کنند (Raaijmakers *et al*. 1997)، نشان داد که جدایه‌های CHA0، Z7، B119 و P17 واجد ژن *phlD* می‌باشند (شکل ۱).

در آزمایش PCR با استفاده از جفت آغازگر PCA2a و PCA3b تنها از جدایه P4 قطعه

www.SID.ir

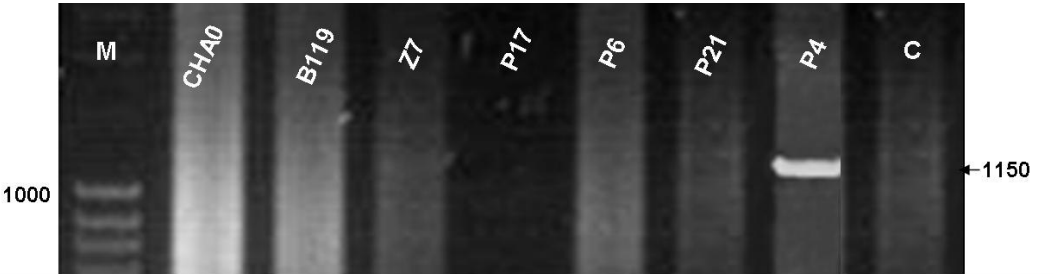
Archive of SID

DNAی مورد انتظار بطول ۱۱۵۰ جفت باز تکثیر شد(شکل ۲). این نتایج وجود ژن فنازین در جدایه P4 را به اثبات می رساند.



شکل ۱– ردیابی ژن *phlD* در جدایه‌های *P. fluorescens* با استفاده از جفت آغازگر phl2a و phl2b. قطعه DNAی مورد انتظار با اندازه ۷٤۵ جفت باز در جدایه‌های CHA0، B119، Z7 و P17 تکثیر گردید. اندازه باندهای نشانگر بر اساس جفت‌باز می‌باشد. M: نشانگر ژنومی (۱ kb) ، C: شاهد منفی.

Fig.1. Detection of *phlD* gene in *P. fluorescens* isolates using phl2a and phl2b primers. The expected 745 bp DNA fragment was amplified from CAH0, B119, Z7 and P17 isolate. Marker fragment sizes are shown in base pair. M= Molecular marker (1 kb), C= Negative control.



شکل ۲– نتایج الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *P. fluorescens* با استفاده از آغازگرهای PCA2a، PCA3b. قطعه DNAی ۱۱۵۰ جفت بازی مورد انتظار تنها در جدایه P4 تکثیر شد. اندازه باندهای نشانگر بر اساس جفت‌باز می‌باشد. M: نشانگر ژنومی (۱ kb)، C: شاهد منفی.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *P. fluorescens* isolates using PCA2a and PCA3b primers. The expected 1150 bp DNA fragment was amplified only from P4 isolate. Marker fragment sizes are shown in base pair. M= molecular marker (1 kb), C= Negative control.

www.SID.ir

Archive of SID

تولید آنتی بیوتیک DAPG

در تایید نتایج حاصل از PCR برای بررسی حضور ژن *phlD* در جدایه‌ها، تولید آنتی‌بیوتیک DAPG با استفاده از روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت. میزان تولید DAPG در جدایه‌ها با هم متفاوت بود و جدایه CHA0 با ۱۱/٦ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، بیشترین مقدار را داشت، و جدایه‌های Z7، B119 و P17 به ترتیب ۸/٤ ، ۳/۵ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، این آنتی‌بیوتیک را تولید کردند. جدایه‌های P21، P6 و P4 که *phlD*$^-$ بودند، فاقد این آنتی‌بیوتیک بودند.

تاثیر جدایه‌های *P. fluorescens* در بیان ژن *ech42* در *T. atroviride*

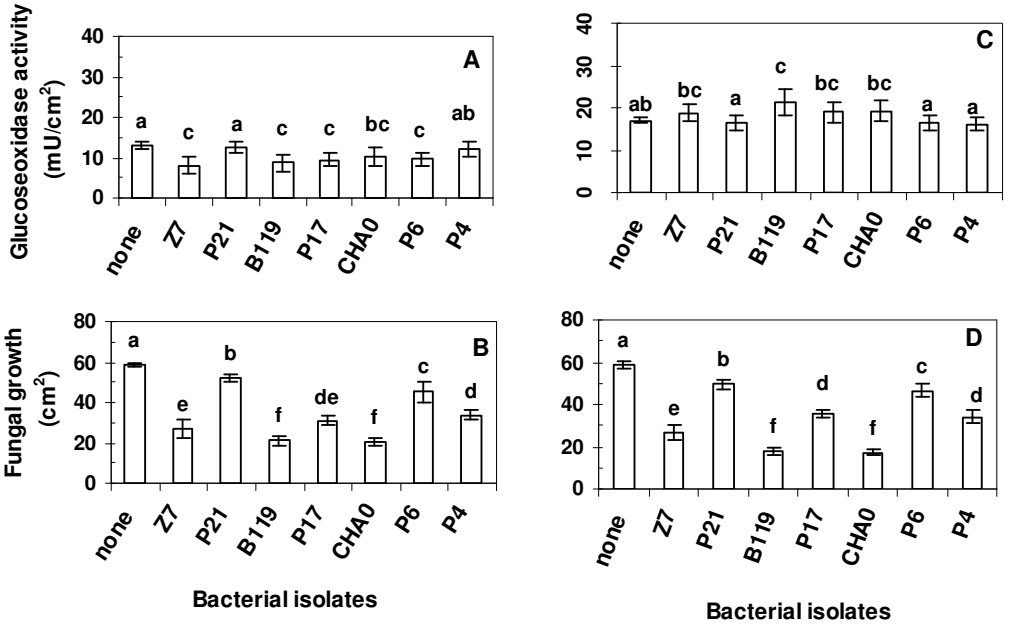
وقتی *T. atroviride* استرین *ech42-gox* به تنهایی کشت شد، میزان بیان ژن *ech42*-gox که نشانگر بیوسنتز آنزیم ECH42 در سطح میسلیومی می‌باشد، به میزان ۱۲/۹۹ mU/cm^{2}بود. این مقدار در حضور باکتری *P. fluorescens* کاهش یافت که نشان دهنده سرکوب بیان این ژن توسط جدایه‌های باکتریایی می‌باشد. البته، میزان کاهش بیان ژن در حضور جدایه‌های P4 و P21 معنی دار نبود (شکل ۳). بیشترین ممانعت از بیان این ژن در تعامل با جدایه Z7 دیده شد، که میزان بیان آن به ۱۱/ ۸ mU/cm^2 کاهش یافت. بعد از آن، بترتیب جدایه‌های B119، P17، P6 و CHA0 باعث کاهش بیان این ژن شدند (شکل ۳). از نظر میزان رشد، قارچ *T. atroviride* استرین *ech42-gox* پس از ٦٦ ساعت رشد در محیط مالت آگار، تقریبا سطح محیط کشت در تشتک پتری را پر کرد و میزان سطح رشد میسلیومی ۵۸/٦ cm^2 شد. اما حضور جدایه‌های باکتریایی باعث کاهش رشد میسلیومی قارچ گردید. جدایه CHA0 با ٦۵/۵ درصد ناحیه بازدارندگی، بیشترین اثر ممانعت کنندگی و جدایه P21 با ۱۱/٤۳ درصد بازدارندگی، کمترین اثر را در رشد میسلیومی قارچ داشتند (شکل ۳).

تاثیر جدایه‌های *P. fluorescens* در بیان ژن *nag1* در *T. atroviride*

نتایج حاصل از مطالعه تغییر میزان بیان ژن *nag1-gox* در حضور جدایه‌های باکتریایی متفاوت بود. در حضور جدایه‌های *phlD*$^+$، میزان بیان *nag1* افزایش نشان داد. این افزایش در تعامل با جدایه B119 کاملا" معنی دار بود (شکل ۳). میزان بیان ژن در تیمار شاهد (بدون حضور باکتری) ۱۷ mU/cm^2 بود که در تیمار با جدایه B119 به ۲۱/۳۳ mU/cm^2 رسید. اما بیان این ژن در تعامل با جدایه‌های *phlD*$^-$ (P6، P4 و P21)، اندکی کاهش نشان داد، که البته این

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- بیان ژن *ech42*-gox (A) و *nag1-gox* (C) و رشد میسلیومی *T. atroviride* استرین *ech42-gox* (B) و *nag1-gox* (D) در حضور جدایه‌های *P. fluorescens*. باکتریها بصورت چهار لکه ۲۰ میکرولیتری به فاصله ۳ سانتی‌متری از *T. atroviride* کشت شدند و به مدت ٦٦ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. هر تیمار میانگین سه آزمایش با شش تکرار در هر آزمایش است. گروههایی که با حروف متفاوت نشان داده شده اند، بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($p\leq ۰/۰۵$).

Fig. 3. Expression of *ech42-gox* (**A**) and *nag1-gox* (**C**) fusion and growth of *T. atroviride* derivatives *ech42-gox* (**B**) and *nag1-gox* (**D**) in presence of the *P. fluorescens* strains. The bacteria were inoculated with four spots of 20 µl in 3 cm distance of *T. atroviride* and plates were incubated for 66 h at 24°C in darkness. Each value is the mean of 3 experiments with 6 replicas per treatment**.** Bars with different letters are significantly different according to Duncan's multiple test ($p\leq 0.05$).

www.SID.ir

Archive of SID

کاهش معنی دار نبود (شکل ۳). میزان رشد میسلیومی *T. atroviride* استرین گزارشگر *nag1-gox* نیز همانند میزان رشد استرین گزارشگر *ech42-gox* بود. در تیمار شاهد بدون حضور باکتری، ناحیه سطح میسلیوم قارچ cm^2 ۵۹ بود که در حضور جدایه‌های باکتریایی کاهش یافت. میزان بازدارندگی رشد قارچ بین ۷۱ درصد (در تیمار با CHA0) تا ۱٦درصد (در تیمار با جدایه P21) متفاوت بود (شکل ۳).

بررسی میزان تغییرات بیان ژن کیتیناز قارچ *T. atroviride* در تعامل با *P. fluorescens* از طریق RT-PCR

با توجه به نتایج حاصله از سیستم گزارشگر *gox* که نشانگر اختلاف معنی‌دار در بیان ژن *ech42* در تعامل با جدایه‌های مختلف باکتریایی بود، از روش RT-PCR برای بررسی این نتایج استفاده گردید. در این آزمایش، پنج جدایه *P. fluorescens* برای بررسی میزان رونوشتهای *ech42* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که میزان رونوشتهای *ech42* در تعامل با جدایه‌های باکتریایی کاهش می‌یابد. بیشترین مقدار کاهش رونوشتها در تیمار Z7 مشاهده شد که کاملا منطبق بر نتایج حاصله از سیستم گزارشگر *gox* بود. نتایج دیگر نیز با نتایج حاصله از سیستم گزارشگر همخوانی داشت (شکل٤). در این آزمایش، از ژن اکتین بعنوان کنترل استفاده شد و میزان رونوشتهای ژن *ech42* بر اساس میزان بیان ژن اکتین و با استفاده از نرم‌افزار ImageJ نرمالیزه شد.

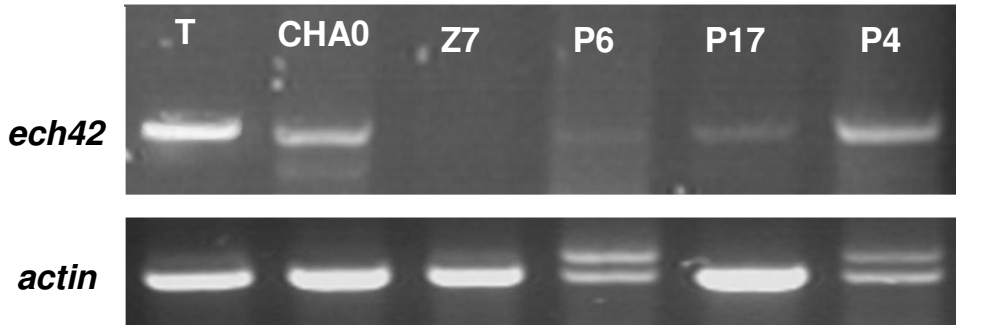
بحث

استفاده از عوامل بیوکنترلی بصورت مخلوط، اعم از ترکیب باکتری با باکتری یا باکتری با قارچ، بعنوان راه‌حلی برای افزایش ثبات و میزان کنترل عوامل بیماریزای خاکزی پیشنهاد شده است (Weller & Cook 1983, Cook *et al.* 1988, Paulitz *et al*. 1990, Capper & Higgins 1993, Duffy & Weller 1995, Duffy *et al.* 1996, Raupach & Kloepper 1998, Rini & Genowati 2001, Pierson & Weller 1994, Sulochana 2006).

علی‌رغم گزارشهای متعدد در ارتباط با اثرات مثبت کاربرد دو یا چند عامل بیوکنترل در مدیریت و کنترل بیماری، مطالعات در زمینه تعامل این عوامل در سطح مولکولی بسیار محدود می‌باشند. از این مطالعات می‌توان به گزارش لوتز و همکاران (Lutz *et al*. 2004) اشاره کرد که در تحقیقات خود نشان دادند که وقتی یک عامل بیوکنترلی باکتریایی با یک عامل بیوکنترلی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤– نتایج آزمایش RT-PCR برای مقایسه بیان ژن *ech42* در تعامل قارچ *T. atroviride* با جدایه‌های *P. fluorescens*. ژن *actin* بعنوان شاهد استفاده شد. T: قارچ تنها، CHA0، Z7، P6، P17 و P4: به ترتیب قارچ همراه با جدایه‌های باکتریایی CHA0، Z7، P6، P17 و P4.

Fig. 4. RT-PCR results to study the expression of *T. atroviride ech42* gene in co-inoculation with several *P. fluorescens* strains, including CHA0, Z7, P6, P17 and P4. T: *P. fluorescens* alone. Actin was used as a control.

قارچی بصورت مخلوط بکار روند، می‌توانند در بیان ژنهای بیوکنترلی کلیدی همدیگر اثرات مثبت و یا منفی داشته باشند. در مطالعه اخیر نیز این اثرات مشاهده شدند، بطوریکه جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش، در بیان ژن کیتیناز *ech42* قارچ تریکودرما اثر ممانعت کنندگی داشتند (شکل ۳و٤). البته این بازدارندگی در حضور جدایه‌های P21 و P4 که هردو $DAPG^-$ بودند، معنی دار نبود، در حالیکه در حضور بقیه جدایه‌ها، بیان این ژن بطور معنی‌داری سرکوب شد. از این آزمایشها می‌توان نتیجه گرفت که کاهش بیان ژن *ech42* توسط *P. fluorescens*، نمی‌تواند ناشی از آنتی‌بیوتیک DAPG باشد، زیرا کاهش بیان ژن در هر دو جدایه $DAPG^+$ و $DAPG^-$ مشاهده گردید. میزان ممانعت از بیان ژن *ech42* در حضور جدایه P6 که $DAPG^-$ بود، با میزان ممانعت در تعامل با جدایه‌های Z7، B119 و P17 ($DAPG^+$) از لحاظ آماری اختلاف معنی داری نشان نداد. حتی اضافه نمودن این آنتی‌بیوتیک (غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مول) به محیط کشت در غیاب باکتری، باعث افزایش معنی دار بیان این ژن در *T. atroviride* گردید (داده ها نشان داده نشده). بیان ژن *ech42*، همچنین در حضور جدایه P4 که واجد ژن تولید کننده فنازین (PCA^+) بود، اندکی کاهش یافت، که البته معنی‌دار نبود (شکل ۳). نتایج بررسی حاضر نشان داد که

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های *P. fluorescens* اعم از $DAPG^+$، $DAPG^-$ و یا PCA^+ هیچگونه اثر مثبت در بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* نداشتند. این نتایج با یافته‌های لوتز و همکاران (Lutz *et al*. 2004) مطابقت دارد. این محققان در مطالعات خود نشان دادند که در حضور جدایه CHA0 (واجد آنتی بیوتیک DAPG) و یا جهش‌یافته‌هایی که DAPG تولید نمی‌کردند (از قبیل CHA631 و CHA660) بیان ژن *ech42* در تریکودرما کاهش می‌یابد. بنابراین، بنظر میرسد احتمالا عامل دیگری غیر از این آنتی‌بیوتیک‌ها در *P. fluorescens* در کاهش بیان *ech42* در قارچ *T. atroviride* دخیل می باشد. نتایج حاصله از روش RT-PCR علاوه بر تایید نتایج بدست آمده از سیستم گلوکز اکسیداز، نشان داد که کنترل بیان ژن *ech42* در تعامل با باکتری *P. fluorescens* در مرحله رونویسی انجام میگیرد. این نتایج برای اولین بار گزارش می‌شوند.

در برهمکنش جدایه‌های $DAPG^-$ با قارچ تریکودرما، هیچگونه افزایشی در بیان ژن *nag1* در *T. atroviride* مشاهده نشد. برعکس، در حضور جدایه‌های CHA0، B119، P17 و Z7 که همگی $DAPG^+$ بودند، بیان ژن *nag1* افزایش یافت. این افزایش در تعامل با جدایه B119 کاملا معنی دار بود (شکل ۳). این درحالیست که این جدایه بطور قابل توجهی باعث سرکوب بیان ژن *ech42* شده بود. بر اساس مطالعات ماخ و همکاران (Mach *et al*. 1999)، مکانیسمهای تنظیم بیان این دو ژن با یکدیگر متفاوت میباشند. لوتز و همکاران نیز (Lutz *et al*. 2003) نشان دادند که توکسین قارچی deoxynivalenol (DON) که توسط *Fusarium graminearum* و *F. culmorum* ترشح می شود، بیان ژن *nag1* را سرکوب می‌کند، در حالیکه روی بیان ژن *ech42* تاثیری ندارد. با این وجود، بیان هر دو ژن توسط دیواره سلولی قارچی تحریک می شوند (Carsolio *et al*. 1994, Peterbauer *et al*. 1996).

در حضور جدایه‌های باکتریایی *P. fluorescens* ، رشد میسلیومی هر سه استرین *T. atroviride* کاهش یافت. احتمالا آنتی‌بیوتیک DAPG نقش عمده‌ای در این کاهش داشته است، چنانکه کاهش رشد میسلیومی در حضور جدایه‌های تولیدکننده DAPG در مقایسه با جدایه‌های فاقد این آنتی‌بیوتیک، بطور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳). این آنتی‌بیوتیک بعنوان یکی از موثرترین متابولیت‌های ضد میکربی تولید شده توسط جدایه‌های *P. fluorescens* می‌باشد (Keel *et al*.1990, Sharifi-Tehrani *et al*. 1998) و نقش آن در کنترل قارچ‌های

www.SID.ir

Archive of SID

Gaeumannomyces graminis var. *tritici* عامل پاخوره گندم، *Thielaviopsis basicola* بیمارگر پوسیدگی سیاه ریشه توتون، *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی گوجه فرنگی، *Pythium ultimum* روی خیار و *Rhizoctonia solani* روی پنبه اثبات شده است (Sharifi-Tehrani *et al.* 1998, Weller 1988, Howell & Stipanovic 1979). *لوتز* و همکاران (Lutz *et al*. 2004) نشان دادند که کاهش رشد میسلیومی قارچ *T. atroviride* در حضور جهش یافته‌های *P. fluorescens* CHA0 که فاقد آنتی‌بیوتیک DAPG بودند، کمتر از کاهش رشد میسلیومی در حضور تیپ وحشی آن بوده است. نتایج مطالعه اخیر نیز این فرضیه را تقویت می‌کند که آنتی‌بیوتیک DAPG نقش عمده‌ای در کاهش رشد میسلیومی *T. atroviride* دارد. این نتایج با افزودن آنتی‌بیوتیک خالص (غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مول) به محیط کشت قارچ تریکودرما نیز تایید گردید (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

بطور کلی این نتایج نشانگر این است که برهم کنش‌های اختصاصی بین عوامل بیوکنترل در حالت ترکیبی میتواند در بیان ژنهای بیوکنترلی این عوامل، تاثیر مثبت یا منفی داشته باشد که در نهایت در کنترل بیماری تاثیر خواهد داشت و بنابراین، قبل از اختلاط، بایستی در مورد برهمکنش بین این عوامل شناخت کافی پیدا کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دکتر Lutz (دانشگاه پلی‌تکنیک زوریخ، سوییس(ETH)) بخاطر ارسال جدایه‌های قارچ و دکتر رشیدی (دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز) بخاطر همکاری در انجام آزمایش‌های HPLC و دکتر پژوهنده و دکتر احمدآبادی بخاطر همکاریهای ارزنده‌شان تشکر می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (86-81) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: اکبر شیرزاد، عباس شریفی تهرانی، مسعود احمدزاده، کیوان بهبودی و

www.SID.ir

Archive of SID

محمد جوان‌نیکخواه، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان و گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

www.SID.ir