مقاله کوتاه

تأثیر سن گیاه لوبیا بر بیان *phlA*، ژن بیوسنتز آنتی‌بیوتیک ۲و۴- دی استیل فلورو گلوسینول در *Pseudomonas fluorescens* استرین CHA0 در شرایط نوتوبیوتیک

INFLUENCE OF BEAN PLANT AGE ON THE EXPRESSION OF 2, 4-DIACETYLPHLOROGLUCINOL BIOSYNTHESIS GENE *PHLA* IN *Pseudomonas fluorescens* STRAIN CHA0 UNDER GNOTOBIOTIC CONDITIONS

فاطمه جمالی[۱*] و مونیکا مارهوفر[۲]

(تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۵)

چکیده

Pseudomonas fluorescens CHA0، حامل ژن گزارشگر *phlA'-'lacZ* به‌منظور ردیابی تأثیر سن گیاه لوبیا بر بیان ژن‌های بیوسنتز ۲و ۴- دی استیل فلوروگلوسینول در سیستم نوتوبیوتیک مورد استفاده قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که سن گیاه لوبیا تأثیر معنی‌داری بر بیان ژن گزارشگر دارد. بیان ژن *phlA'-'lacZ* بر حسب واحد در CFU 10^7، ۴۵ دقیقه پس از کاشت بذرهای جوانه زده مشاهده نشد. بیان ژن سه روز پس از کاشت نسبت به ۴۵ دقیقه اول به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، طی پنج روز در همین سطح باقی ماند و طی ۱۴ روز مجدداً افزایش پیدا کرد ولی این افزایش از لحاظ آماری در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود. بیان ژن گزارشگر بر حسب واحد در گرم ریزوسفر در ۴۵ دقیقه اول پس از کاشت مشاهده نشد ولی پس از سه روز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیان ژن از روز سوم تا پنجم پس از کاشت بذرهای جوانه زده ۲۰٪ افزایش یافت، در روز هفتم به‌میزان روز سوم رسید و در روز چهاردهم ۳۸ ٪ افزایش نشان داد. کلنیزاسیون ریزوسفر لوبیا توسط استرین CHA0 حامل ژن گزارشگر با بیان ژن *phlA'-'lacZ* بر حسب واحد در گرم ریزوسفر هم‌آهنگ بود. کلنیزاسیون ریزوسفر توسط باکتری از CFU $0/7\times10^7$ در هر گرم ریزوسفر در ۴۵ دقیقه اول پس از کاشت، به CFU $7/7\times10^7$ در هر گرم ریزوسفر در روز سوم رسید. کلنیزاسیون ریزوسفر در روز پنجم نسبت به روز سوم ۱۰۰٪ افزایش یافت، در روز هفتم در همین سطح باقی ماند و در روز چهاردهم به حداکثر میزان خود رسید.

واژه‌های کلیدی: ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول، سیستم نوتوبیوتیک، فعالیت بتاگالاکتوزیداز و کلنیزاسیون ریزوسفر

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:jamali@pgu.ac.ir

۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی ، دانشگاه خلیج فارس بوشهر

۲. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی ، دانشگاه پلی تکنیک زوریخ، سوییس

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

گونه‌های .*Pseudomonas* spp فلورسنت دارای توانایی کلنیزه کردن ریشه گیاهان مختلف، رقابت با میکروارگانیسم‌های خاکزی، بقا در ناحیه ریزوسفر و کنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی خاکزاد هستند (Weller 2007). کارایی متغیر اغلب جد ایه‌های دارای قابلیت کنترل بیولوژیکی در زمان‌ها و مکان‌های مختلف از جمله موانع عمده توسعه تجاری این عوامل به‌شمار می‌رود (Thomashow & Weller 1996). شواهد اخیر نشان می‌دهد که بخشی از عدم ثبات کارایی آنها، به‌دلیل تغییر در شرایط محیطی زنده و غیر زنده‌ای است که عامل بیوکنترل در ریزوسفر با آن مواجه می‌شود. با توجه به این‌که مکانیسم اولیه کنترل بیمارگرها توسط سودوموناس‌های فلورسنت تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف است (Thomashow & Weller 1996)، به‌نظر می‌رسد که کارایی متغیر سودوموناس‌ها ناشی از تفاوت در تولید این متابولیت‌ها تحت شرایط محیطی مختلف باشد. هدف از تحقیق حاضر بررسی تأثیر سن گیاه لوبیا بر بیان ژن‌های بیوسنتز ۲و۴- دی استیل فلوروگلوسینول(DAPG) و کلنیزاسیون ریزوسفر توسط جدایه *P. fluorescens* CHA0 در شرایط نوتوبیوتیک می‌باشد.

روش بررسی

جدایه *P. fluorescens* CHA0 ومشتق حامل پلاسمید آن یعنی CHA0/pME6259 در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند. جدایه CHA0، دارای توانایی تولید آنتی‌بیوتیک DAPG می‌باشد که از ریزوسفر توتون در خاک منطقه مورنز سوئیس با خاصیت بازدارندگی طبیعی از بیماری پوسیدگی سیاه ریشه توتون جداسازی شده است (Stutz *et al.* 1986). پلاسمید pME6259 دارای ژن گزارشگر *phlA´-´lacZ* و ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین می‌باشد. بیان*phlA´-´lacZ* و تولید آنزیم بتاگالاکتوزیداز میزان بیوسنتز آنتی‌بیوتیک DAPG را منعکس می‌سازد (Schnider-Keel *et al.* 2000). جدایه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محیط لوریا- برتانی (Luria-Berthani) (باکتو تریپتون ۱۰ گرم ، عصاره مخمر ۵ گرم ، NaCl ۱۰ گرم ، آب مقطر یک لیتر) و در دمای ۲۷ $^{\circ}$C روی شیکر با سرعت ۱۷۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند. جدایه CHA0/pME6259 در محیط مزبور که حاوی تتراسیکلین به غلظت نهایی ۱۲۵ میکرو گرم در میلی‌لیتر بود کشت گردید. کشت‌های ۱۶ ساعته باکتری‌ها با سانتریفوژ کردن (۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه) رسوب داده شده و رسوب با محلول کلرید سدیم (کلرید سدیم ۹ گرم، آب مقطر یک لیتر) شسته شد. سپس با افزودن محلول کلرید سدیم، سوسپانسیون باکتری با غلظت نهایی 10^{7} CFU در میلی‌لیتر تهیه شد. بذرهای لوبیا رقم گلی(*Phaseolus vulgaris* cv. Goli) (تهیه شده از مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر) به‌مدت ۵ دقیقه در اتانل ۷۰٪ قرار داده شدند، سپس توسط آب اکسیژنه (H_2O_2) ۱۰٪ به‌مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی گردیده و در آخر توسط آب مقطر سترون شستشو داده شدند. به‌منظور جوانه زنی، بذرها به‌مدت سه روز در محیط آب آگار (آگار ۸/۵ گرم، آب مقطر یک لیتر) در دمای ۲۴ $^{\circ}$C و در شرایط تاریکی قرار گرفتند.

به‌منظور بررسی تأثیر سن گیاه لوبیا بر بیان ژن *phlA´-´ lacZ* در شرایط نوتوبیوتیک، فلاسک‌های ارلن مایر به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر حاوی ۳۰۰ گرم خاک مصنوعی(Keel *et al.* 1989) در دمای ۱۲۰ $^{\circ}$C به‌مدت ۳۰ دقیقه اتوکلاو شدند. بذرهای جوانه زده لوبیا در

Archive of SID

www.SID.ir

سوسپانسیون باکتری‌ها قرار داده شدند. پس از گذشت یک ساعت از تیمار بذرهای جوانه زده با باکتری‌ها، یک بذر به هر فلاسک منتقل گردید. گیاهان در اتاقک رشد با ۱۶ ساعت روشنایی در $18^{\circ}C$ و هشت ساعت تاریکی در $^{\circ}C$ ۱۵نگه‌داری و یک روز در میان با ۲۰ میلی‌لیتر محلول غذایی تغییر یافته نوپ (Knop) ($Ca(NO_3)_2.4H_2O$) یک گرم، ۰/۲۵ گرم KCL، ۰/۲۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲۵ گرم KH_2PO_4، ۲۰ میلی گرم FeEDDHA، محلول هوگلند یک میلی‌لیتر و آب مقطر یک لیتر) (Keel *et al.* 1989) آبیاری شدند. نمونه‌گیری در ۴۵ دقیقه، سه روز، پنج روز، یک هفته و دو هفته پس از کاشت بذرهای جوانه زده صورت گرفت. طی نمونه‌گیری، گیاهان از فلاسک ها خارج و خاک اضافی اطراف ریشه با تکان دادن از آنها جدا گردید. ریشه ها با خاک ناحیه فرا ریشه ابتدا توزین شده و سپس در ۲۰ میلی‌لیتر محلول کلرید سدیم سترون روی شیکر (۲۰ دقیقه در۴۵۰ دور در دقیقه) تکان داده شدند. کلنیزاسیون ریزوسفر توسط باکتری، با کشت سری رقت‌های سوسپانسیون حاصل روی محیط کینگ ب آگار (KBA) (King *et al.* 1954)حاوی تتراسیکلین به‌دست آمد. از سوسپانسیون حاصل از شستشوی ریشه‌ها برای تعیین فعالیت بتاگالاکتوزیداز نیز استفاده شد. سنجش فعالیت بتاگالاکتوزیداز طبق روش میلر (Miller 1992) صورت گرفت. میزان فعالیت آنزیم به‌صورت واحد در 10^{7} واحد تشکیل‌دهنده کلنی ($U/10^{7}$ CFU) و واحد در گرم ریزوسفر (U/g rhizosphere) محاسبه گردید. برای محاسبه فعالیت زمینه(Background) آنزیم بتاگالاکتوزیداز، فعالیت آنزیم در سوسپانسیون حاصل از شستشوی ریشه گیاهان تلقیح شده با CHA0 محاسبه شد و سپس از عدد تعیین شده فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز در سوسپانسیون حاصل از گیاهان تیمار شده با CHA0/pME6259 کسر گردید. تعداد واحدهای آنزیم بتاگالاکتوزیداز با رابطه زیر به‌دست آمد (Miller 1992):

[حجم نمونه (میلی‌لیتر) × زمان (دقیقه)] / کدری در طول موج ۴۲۰ نانومتر × ۱۰۰۰ = واحدهای بتاگالاکتوریداز

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تیمار و شش تکرار اجرا شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار Systat version 9.0 (Systat Inc., Evanston, Ill.)انجام گرفت. میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD ($P \leq 0.05$) از هم تفکیک شدند.

نتایج و بحث

میزان کلنیزاسیون ریزوسفر لوبیا توسط CHA0/pME6259 پس از گذشت سه روز از کاشت گیاه نسبت به ۴۵ دقیقه اول افزایش یافت و به $۷/۷ \times ۱۰^{۷}$ CFU در گرم ریزوسفر رسید ولی با توجه به مقایسه میانگین‌ها اختلاف معنی‌داری بین جمعیت باکتری در این دو زمان نمونه‌گیری مشاهده نشد. سطح جمعیت در روز پنجم افزایش یافته، به $۱۴/۵ \times ۱۰^{۷}$ CFU در گرم ریزوسفر رسید که این افزایش جمعیت بر اساس مقایسه میانگین ها نسبت به روز سوم دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ بود. پس از یک هفته رشد گیاه، کلنیزاسیون ریزوسفر نسبت به روز پنجم کاهش یافت ولیکن این کاهش جمعیت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. جمعیت باکتری پس از دو هفته به‌طور معنی‌داری نسبت به روزهای پیشین افزایش یافته و به $۲۲/۴ \times ۱۰^{۷}$ CFU در گرم ریزوسفر رسید که تقریباً چهار برابر میزان جمعیت در روز سوم بود (جدول ۱).

اندازه‌گیری فعالیت بتاگالاکتوزیداز بر حسب واحد در CFU (U/CFU) مشخص کرد که ۴۵ دقیقه پس از کاشت گیاهچه‌های تلقیح شده با CHA0/pME6259، بیان ژن

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱. تأثیر سن گیاه لوبیا بر کلنیزاسیون ریزوسفر و بیان ژن گزارشگر *phlA'-'lacZ* در *Pseudomonas. fluorescens* CHA0/pME6259

Table 1. Influence of plant age on the bean rhizosphere colonization and expression of the reporter gene *phlA'-'lacZ* in *Pseudomonas fluorescens* CHA0/pME6259

زمان پس از مایه زنی Time after inoculation	فعالیت بتاگالاکتوزیداز (ß-galactosidase activity) ($U/10^7$ CFU)	فعالیت بتاگالاکتوزیداز (ß-galactosidase activity) (U/g rhizosphere)	کلنیزاسیون ریزوسفر Rhizosphere colonization ($\times 10^7$ CFU/ g rhizosphere)
۴۵ دقیقه(45 min)	0^{b}	0^{b}	0.7^{*c}
روز سوم(Day 3)	2.9^{a}	32.1^{a}	7.7^{c}
روز پنجم(Day 5)	2.7^{a}	40.2^{a}	14.5^{b}
روز هفتم(Day 7)	3.1^{a}	33.5^{a}	11.7^{b}
روز چهاردهم(Day 14)	4.3^{a}	52^{a}	22.4^{a}

*: میانگین‌هایی که در یک ستون با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند از نظر آماری بر اساس تست حداقل اختلاف معنی‌دار با یکدیگر متفاوت هستند ($P\leq0.05$).

Means within the same column followed by different letters are significantly different according to least significant difference (LSD) test ($P\leq0.05$).

گزارشگر در شرایط نوتوبیوتیک مشاهده نشد (جدول ۱). پس از سه روز بیان ژن گزارشگر به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و به‌میزان ۲/۹ واحد در 10^7 CFU رسید . فعالیت بتاگالاکتوزیداز در روز پنجم در همین سطح باقی ماند و تا روز هفتم و چهاردهم به‌طور یک‌نواخت افزایش یافت (به ترتیب ۳/۱ و ۴/۳ واحد در 10^7 CFU) که این افزایش از لحاظ آماری در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود.

فعالیت بتاگالاکتوزیداز بر حسب واحد در گرم ریزوسفر (U/g rhizosphere) پس از گذشت سه روز نسبت به ۴۵ دقیقه اول پس از کاشت گیاهچه‌ها، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و به ۳۲/۱ واحد بر گرم ریزوسفر رسید. همگام با افزایش کلنیزاسیون، میزان بیان ژن گزارشگر *phlA'-' lacZ* از روز سوم به پنجم افزایش (۴۰/۲ واحد بر گرم وزن ریزوسفر) و در روز هفتم تا ۳۳/۵ واحد بر گرم وزن ریزوسفر کاهش یافت. مجدداً در روز چهاردهم افزایش بیان ژن گزارشگر مشاهده گردید (۵۲ واحد بر گرم وزن ریشه)؛ تغییرات فعالیت بتاگالاکتوزیداز از روز سوم تا چهاردهم در سطح ۵٪ معنی‌دار نبود (جدول ۱).

نتایج به‌دست آمده نشان داد که کلنیزاسیون ریزوسفر به تنهایی نمی تواند تفاوت‌های مشاهده شده در بیان ژن در مراحل مختلف رشد گیاه را منعکس سازد. به‌عنوان مثال میزان کلنیزاسیون ریزوسفر از روز سوم تا پنجم یا از روز هفتم تا چهاردهم به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد در حالی‌که در میزان بیان ژن در واحد سلول باکتری(U/CFU) طی این زمان تغییر چندانی مشاهده نگردید. این نتیجه پیشنهاد می‌کند که گیاه میزبان دارای تأثیری مستقیم بر بیان ژن‌های گزارشگر بوده و تنها تأثیر غیر مستقیم افزایش

Archive of SID

www.SID.ir

جمعیت باکتری در این امر دخیل نیست. پیش از این محققین نشان داده‌اند که تغییراتی در کمیت و کیفیت ترشحات ریشه در طول دوره رشد گیاه حاصل می‌شود(Haller & Stolp 1985) که این خود می‌تواند موجب تغییر در تولید متابولیت‌ها توسط باکتری‌های فرا ریشه شود. نتایج این مطالعه موید این است که احیانا آنتی‌بیوتیک DAPG که برای کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی خاکزاد توسط سودوموناس‌های فلورسنت مورد نیاز است در ریزوسفر گیاه لوبیا رقم گلی توسط این باکتری‌ها و در طول دوره رشد تولید می‌شود. نظر به این‌که عوامل محیطی می‌توانند تعیین کننده توانایی جدایه‌های خاص برای کنترل بیماری باشند، شناسایی آنها به کاربرد هدفمند جدایه‌ها در محیط‌های مناسب کمک می‌کند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (100-99) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir