

ردیابی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن در سودوموناس های فلورسنت بازدارنده رشد

R. solani عامل پوسیدگی ریشه چغندرقد

Detection of hydrogen cyanide biosynthetic gene in *Pseudomonas fluorescens* as a control agent of *Rhizoctonia solani* growth

مریم کنجدی^۱، جعفر وطن دوست^{۲*} و علی اکبر جنت آبادی^۳

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۸

م. کنجدی، ج. وطن دوست و ع.ا. جنت آبادی. ۱۳۹۴. ردیابی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن در سودوموناس های فلورسنت بازدارنده رشد *R. solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندرقد. چغندرقد، ۳۱(۱): ۵۹-۴۹

چکیده

برای ردیابی ژن سیانید هیدروژن و تعیین قابلیت سودوموناس های فلورسنت در تولید سیانید هیدروژن و بازدارندگی از رشد بیمارگر *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقد از ریزوسفر مزارع چغندرقد سبزوار نمونه برداری شد. پس از جمع آوری نمونه های خاک و خالص سازی، ۳۱ سویه سودوموناس جداسازی شده و در محیط اختصاصی سودوموناس آگار F، سودوموناس های فلورسنت براساس آزمون های میکروبی تفکیک و شناسایی شدند. نتایج PCR برای ردیابی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن نشان داد که سه سویه حاوی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن بودند. در بررسی کیفی تولید سیانید هیدروژن در محیط کشت میکروبی نیز مشخص شد که این سویه ها توانایی تولید سیانید هیدروژن را به مقادیر مختلف دارند. جهت بررسی میزان بازدارندگی جدایه های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ *R. solani*، درصد کاهش رشد قارچ در حضور باکتری محاسبه گردید. از میان سه سویه سودوموناس فلورسنت، نمونه C7 بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ و بیشترین مقدار تولید سیانید هیدروژن را داشت که به عنوان کاندیدای مناسب بیوکنترل معرفی می شود.

واژه های کلیدی: پوسیدگی ریزوکتونیای ریشه و طوقه، چغندرقد، سودوموناس فلورسنت، کنترل بیولوژیک

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

۲- استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار *- نویسنده مسئول j.vatan@hsu.ac.ir

۳- استادیار گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

مقدمه

چغندر قند یکی از گیاهان مهم صنعتی است که عامل تولید یکی از اساسی‌ترین نیازهای ابتدایی جامعه یعنی قند و شکر می‌باشد. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندر قند، پوسیدگی ریشه می‌باشد (Hecker and Ruppel 1977). پوسیدگی ریشه در مزارعی که ریشه چغندر قند در معرض رطوبت بیش از حد معمول خاک قرار می‌گیرد، مشاهده شده است (Habibi 1975). عامل پوسیدگی‌های ریشه و طوقه، پوسیدگی خشک و پوسیدگی بنفش ریشه چغندر قند، قارچی از جنس *Rhizoctonia* است که گونه معروف آن *Rhizoctonia solani* می‌باشد و در خاک زندگی می‌کند. این قارچ به ریشه چغندر قند حمله می‌کند و شبکه‌هایی از رشته‌های به هم پیچیده و به رنگ قهوه‌ای مایل به ارغوانی در سطح ریشه به وجود می‌آورد. گاهی این رشته‌ها تمام سطح ریشه را می‌پوشانند و باعث قطع آوندهای آبکش و باعث توقف فعالیت‌های حیاتی گیاه می‌شود (Sheikholeslam et al. 2006). از آنجایی که این گونه عامل پوسیدگی ریشه و طوقه، مرگ گیاهچه و بلایت برگی چغندر قند بوده و تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از جمعیت آن گزارش گردیده است، لذا به آن گونه مرکب اطلاق شده است (Vilgalys and Cubeta 1994). گونه *R. solani* اولین بار در ایران از گیاه سیب‌زمینی و کاج ایرانی توسط شریف و ارشاد و از گیاه لوبیا توسط منوچهری و قنادزاده گزارش گردید (Ershad 1977; Balali and Moharabi 2006). علاوه بر *R. solani*، قارچ‌های بیماری‌زای بسیار دیگری سبب ایجاد پوسیدگی ریشه چغندر قند در مراحل مختلف می‌شوند (Whitney and Duffos 1991). قارچ *Fitzp* (Edson) *Pythiumaphanidermatum* به عنوان یکی از عوامل فساد بذر، مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه در ایران شناخته شده است (Ahmadinejad and Okhovat 1976).

هم‌چنین از قارچ *Rhizopus arrhizus* Fischer به عنوان یکی از عوامل پوسیدگی طوقه چغندر قند در ایران نام برده شده است (Habibi 1977).

یک راه کنترل بیمارگرهای خاکزاد، مبارزه شیمیایی است که علاوه بر آلودگی زیست محیطی، بر میکروفلور طبیعی خاک تأثیر منفی گذاشته و از حاصلخیزی خاک می‌کاهد. بدین جهت، کنترل بیولوژیک از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (Adesina et al. 2007) و به عنوان یک پیشنهاد برای جلوگیری از اثرات منفی ناشی از استفاده سموم شیمیایی در کشاورزی بر محیط زیست و مصرف کنندگان مطرح است (Arcury et al. 2003). این اثرات منفی شامل کاهش تنوع زیستی میکروارگانیسم‌های ساکن خاک، اثرات خطرناک روان آب آفت‌کش‌ها بر روی سیستم‌های آبریان و توسعه مقاومت به قارچ‌کش توسط بیمارگرها (Gerhardson 2002)؛ مشکلات بهداشتی حاد ناشی از قرار گرفتن کشاورزان در معرض سموم شیمیایی (Arcury et al. 2003) باقی ماندن آفت‌کش‌ها در بسیاری از محصولات غذایی از جمله میوه‌ها و سبزیجات که سلامت مصرف کنندگان را به خطر می‌اندازد و افزایش هزینه‌های آفت‌کش‌ها به خصوص در کشورهای کم درآمد جهان می‌باشد.

شناخت نقش مفید باکتری‌های خاکزی در افزایش رشد گیاهان، بیش از یک قرن سابقه دارد و سودوموناس‌ها از اهمیت ویژه‌ای در میان این گروه باکتری‌ها برخوردار هستند. شواهد نشان می‌دهد که کاربرد سودوموناس‌ها همراه بذور سبب محافظت آن‌ها و گیاهان در مقابل عوامل بیماری‌زای خاکزی شده و در نتیجه افزایش محصول را به دنبال دارد (Behbodi and Sharifi 2006). اغلب سودوموناس‌های جدا شده از خاک با جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا در اثر تولید موادی نظیر آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز

کنند. سودوموناس‌ها به آهن کافی برای تولید سیانید هیدروژن نیاز دارند.

سویه *Pseudomonas fluorescence CHAO* با تولید آنتی بیوتیک، سیدروفور و سیانید هیدروژن در سرکوب بیماری پوسیدگی سیاه و سفید تنباکو نقش دارد که به نظر می‌رسد تولید سیانید هیدروژن در سرکوب این بیماری نقش بیشتری را داراست و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Pal and Gardener 2006). در نتایج بررسی ۱۰ سویه سودوموناس فلورسنت جدا شده از خاک‌های ذرت، برنج، یونجه مشاهده شد که این جدایه‌ها را می‌توان به‌عنوان کودهای بیولوژیک بالقوه و نیز به‌عنوان عوامل بیوکنترلی مورد استفاده قرار داد (Suresh et al. 2010). سویه‌ای دیگر از سودوموناس به نام *Pseudomonas pathogenesis Pf-5* که قبلاً جزء *Pseudomonas fluorescence* نام‌گذاری شده است، در سطوح دانه‌ها و ریشه‌های گیاهان مستقر شده و می‌تواند از گیاهان در برابر عفونت‌های قارچی و بیمارگرهای باکتریایی گیاهی محافظت کند (Kidarsa et al. 2013). در مطالعات دیگری، محاصره مزرعه با سودوموناس‌ها منجر به یک افزایش در عملکرد حبوبات به علت تولید متابولیت‌های ثانویه شد (Saharan and Nehra 2011). ریزوباکتیریا با خاصیت بازدارندگی اثری شبیه سودوموناس‌ها دارند و نقش مهمی را در کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی منتقل شونده از راه خاک بازی می‌کنند (Kapsalis et al. 2008). در برخی گزارشات، تولید میکروبی سیانید هیدروژن، به‌عنوان یک داروی ضد قارچی مهم و به‌عنوان صفتی مهم جهت کنترل قارچ‌های آلوده کننده ریشه بوده است (Ramette et al. 2003; Adhikari et al. 2013) به طوری که پوسیدگی طوقه در آفتابگردان توسط سودوموناس‌های فلورسنت با تولید سیانید هیدروژن مهار گردید (Adhikari

و همچنین از طریق مستقیم با تولید هورمون‌های گیاهی باعث تحریک رشد و کلونیزاسیون ریشه و در نتیجه افزایش رشد گیاه می‌شوند. در این راستا، استفاده از سودوموناس‌های بیوکنترل در کشاورزی جهت حاصلخیزی خاک در طول ۳۰ سال گذشته از اهمیت بالایی برخوردار بوده است (Weller 2007).

سویه‌های خاصی از سودومونادهای فلورسنت ساکن ریزوسفر به دلیل دارا بودن توانایی حفاظت از گیاهان در برابر بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و نماتدی در سال‌های اخیر توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند (Haas and Défago 2005). سودوموناس‌های فلورسنت روی دامنه گسترده‌ای از عوامل بیماری‌های گیاهی اثر بازدارندگی دارند و دارای مکانیسم‌های گوناگون بازدارندگی نیز هستند (Kumar and Dube 1992; Tian and Riggs 2000) علاوه بر توان تکثیر و القای مقاومت سیستمیک، تولید متابولیت‌های فرار مانند سیانید هیدروژن توسط باکتری‌های خاکزی، مؤثرترین و کارآمدترین مکانیسم در کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی است که کمتر مورد توجه قرار گرفته است. سیانید هیدروژن به‌طور مؤثری مسیر سیتوکروم اکسیداز را مسدود می‌کند و برای همه میکروارگانیسم‌های هوازی در غلظت پیکومولار بسیار سمی می‌باشد (Jayaprakashvel and Pal and Gardener 2006; Mathivanan 2011). سیانید با اتصال به آهن فریک (Fe^{+3}) آنزیم سیتوکروم اکسیداز زنجیره تنفسی مانع تنفس هوازی سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوتی می‌شود. تولید سیانید هیدروژن توسط برخی از سودوموناس‌های فلورسنت در سرکوب بیماری‌های گیاهی نقش دارند. سودوموناس‌ها، همچنین می‌توانند با تولید آنتی‌بیوتیک و یا سیانید هیدروژن، جهت دریافت موادمغذی با بیمارگرها به رقابت به‌پردازند و یا با القاء مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاه پس از کلونیزاسیون ریشه با بیمارگر رقابت

جهت کشت باکتری، ابتدا سوسپانسیونی از ۱۰ گرم مخلوط نمونه‌های هر مزرعه با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه و به مدت دو ساعت راکد ماند تا مایع رویی شفاف شود. سپس از هر نمونه کشت خطی روی محیط سودوموناس آگار F انجام شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در دمای 28°C ، پرگنه‌های رشد یافته از لحاظ شکل ظاهری کلونی‌ها، قطر و هاله کلونی‌ها، رنگ و اندازه کلونی بررسی شدند. در مرحله بعد پرگنه‌ها مجدداً جهت خالص‌سازی روی محیط سودوموناس آگار F رشد داده شدند و تا زمان رسیدن به تک کلونی واکشت انجام شد.

جهت شناسایی باکتری‌ها، کلونی‌های خالص به دست آمده در هر تشتک پتری مورد آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست اکسیداز، تست هواز، بی‌هوازی، ذوب ژلاتین، تست سیترات، احیا نیترات، تست MRVP، مقاومت به کانامایسین، تولید H_2S در جدایه‌های انتخابی قرار گرفتند. انجام تمام این ۱۰ تست شناسایی بر اساس روش برگری صورت گرفت (Holt et al. 1994).

ردیابی ژن *hcnBC*

استخراج DNA از باکتری‌های سودوموناس فلورسنت شناسایی شده به روش جوشاندن با 5% KOH به روش زیر انجام شد ابتدا مقدار ۵۰۰ μl از سوسپانسیون باکتری به همراه ۲۵ μl از ۰/۵ KOH مولار به مدت دو دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد و سپس مجدداً ۲۵ μl از KOH به آن افزوده و دو دقیقه دیگر باکتری‌ها جوشانده شد. در انتها سوسپانسیون شفاف شده به مدت چهار دقیقه با ۹۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی DNA باکتری بوده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

DNAهای استخراج شده با استفاده از آغازگرهای

طراحی شده *hcn-F* و *hcn-R* (جدول ۱) مورد آزمون PCR

(Shivani et al. 2005 et al. 2013). بر اساس یک کار تحقیقاتی، حداقل ۴۰ درصد سودوموناس‌هایی که از ریزوسفر سیب زمینی جداسازی شده بودند در شرایط آزمایشگاهی تولید سیانید هیدروژن کردند. در تحقیقاتی که توسط سورش و همکاران انجام شد نیز تمام سویه‌های سودوموناس فلورسنت به میزان متفاوت سیانید هیدروژن تولید کردند (Suresh et al. 2010).

با توجه به اهمیت اقتصادی چغندرقد، پتانسیل بالای بیماری‌زایی گونه‌های ریزوکتونیا در مراحل مختلف رشد این گیاه، نقش مهم سیانید هیدروژن تولید شده توسط باکتری‌ها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه چغندرقد و در راستای اتخاذ تصمیمات مؤثر در مدیریت این عامل بیماری زا، این تحقیق با هدف شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر مزارع چغندرقد جوین و خوشاب سبزوار، ردیابی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن در این باکتری‌ها و بررسی توان بازدارندگی جدایه‌ها از رشد قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

جمع‌آوری نمونه‌ها از پنج مزرعه بحرآباد جوین و خوشاب که دارای آلودگی به قارچ *R. solani* بودند و از هر مزرعه ۱۰ نمونه به صورت زیگزاکی به وسیله اوگر برداشت شد. نمونه‌های هر مزرعه جهت رسیدن به کل میکروارگاناسم‌ها، با هم مخلوط شدند. هر مزرعه با حروف لاتین (A,B,C,D,E) نامگذاری شد و نمونه‌های به دست آمده از هر مزرعه شماره‌گذاری گردید.

تکمیل و گسترش پرایمرها قرار گرفتند. روش کار و غلظت مواد مصرفی برای تمامی نمونه‌ها یکسان بود. جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TAE 1X استفاده گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در دستگاه ژل نگار مورد بررسی قرار گرفت. تکرارهای متوالی و تغییر شرایط (گرادیان دمایی، گرادیان DNA، گرادیان $MgCl_2$) با هدف باند گرفتن از نمونه‌ها انجام شد.

قرار گرفتند. طراحی پرایمر با نرم‌افزار GeneRunner انجام شد. PCR در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ μ l شامل 20 DNA، ۲/۵ μ l بافر 10 X PCR، ۱/۵ μ l از $MgCl_2$ 50 mM، ۱ μ l از 10 mM dNTP، ۱ μ l از 0.2 mM هر پرایمر، ۰/۵ واحد آنزیم Taq polymerase و با شرایط زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه در $94^\circ C$ به مدت چهار دقیقه، سپس سی چرخه شامل ۶۰ ثانیه در $94^\circ C$ ، ۶۰ ثانیه در $52^\circ C$ و دو دقیقه در $72^\circ C$ انجام شد. پس از این مراحل نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای $72^\circ C$ به منظور حصول اطمینان از

جدول ۱ آغازگرهای PCR مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های بیوسنتز hcnBC

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	آغازگر
hcn-F	ACT GCC AGG GGC GGA TGT GC	آغازگر پیشرو (Forward)
hcn-R	ACG ATG TGC TCG GCG TAC	آغازگر معکوس (Reverse)

یک هفته در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد تغییر رنگ کاغذ صافی را که نشانه پتانسیل تولید سیانید هیدروژن در ریزوباکتریای آنتاگونیست است مورد ارزیابی قرار گرفت.

بازدارندگی از رشد بیمارگر

جهت به دست آوردن قارچ *R. solani*، ابتدا قطعاتی به ابعاد $1 \times 1 \times 1$ سانتی‌متر از چغندرهای سالم و آلوده جدا شد. بعد از استریل کردن، نمونه‌ها به صورت مجزا در وسط تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار گرفتند و به مدت یک هفته در دمای $25^\circ C$ انکوبه شد. برای شناسایی کامل قارچ از روش پارمتر و وایتنی (Parmeter Jr and Whitney 1970) استفاده گردید و جهت انتخاب دمای بهینه رشد، رشد قارچ در دماهای مختلف صورت گرفت.

تولید سیانید هیدروژن در جدایه‌ها

این آزمون با هدف میزان تولید سیانید هیدروژن توسط هریک از نمونه‌های سودوموناس فلورسنت به روش آلستروم و برانز (Alström and Burns 1989) انجام شد. ابتدا کاغذ صافی را روی درب تشتک قرار داده و سپس تشتک‌ها استریل شد. محیط کشت نوترینت آگار (NA) همراه با گلاسیسین ($4/4g/l$) آماده و استریل شد و پس از سرد شدن به داخل تشتک‌های استریل ریخته و بعد از ۲۴ ساعت جدایه‌ها به صورت خطی کشت داده شد. کاغذ صافی را با دو میلی‌لیتر محلول اسید پیکریک استریل خیس کرده و روی محیط گذاشته شد. درب تشتک‌ها را بسته و با پارافیلیم محکم کرده و به منظور تولید متابولیت‌های گازی تولید شده توسط ریزوباکتری‌های آنتاگونیست، اجازه واکنش با اسید پیکریک روی سطح محیط کشت داده شد. پس از انکوباسیون به مدت

مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS تحلیل گردید. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P \geq 1\%$) انجام شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

بر اساس آزمون‌های انجام شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی، ۳۱ سویه باکتری سودوموناس جداسازی شد که از بین این سویه‌ها، سه سویه به‌عنوان سودوموناس فلورسنت شناسایی شدند. این سه سویه از مزرعه C شناسایی شدند که با نام‌های C3, C5, C7 بودند. نتایج آزمون‌های شناسایی در جدول ۲ آمده است.

برای بررسی توان بازدارندگی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ *R. solani* از کشت متقابل باکتری و قارچ در محیط کشت PDA استفاده شد. ابتدا باکتری در تمام سطح تشتک پتری کشت شد. پس از کشت باکتری به مدت ۲۴ ساعت و در دمای 25°C ، از حاشیه کشت جوان سه روزه قارچ عامل بیماری، دیسکی به اندازه 0.5×0.5 سانتی‌متر به صورت وارون در وسط تشتک پتری که باکتری رشد کرده بود قرار داده شد. به‌دنبال انکوباسیون تشتک پتری ها در دمای 25°C به مدت ۴۸ ساعت، رشد یا عدم رشد قارچ در کشت متقابل و در حضور باکتری بررسی گردید. این آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی در شش تکرار انجام شد و میزان رشد میسلیم قارچ در حضور باکتری اندازه‌گیری شد. داده‌های به‌دست آمده از آزمایش

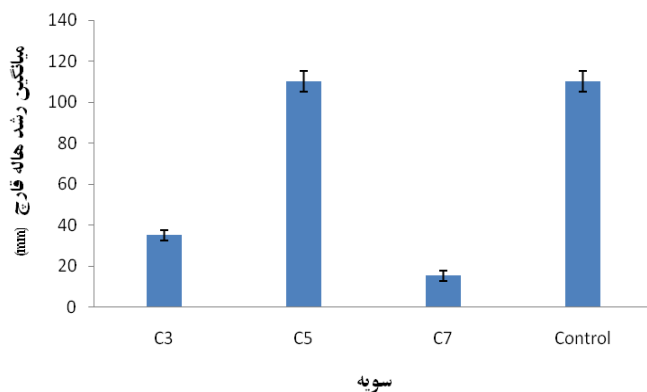
جدول ۲ خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی سه سویه سودوموناس فلورسنت از بین ۳۱ سویه سودوموناس جدا شده

رشد بی‌هوای	رشد هوای	تکثیر	مقاومت به کانامپسین	VP	MIR	اندول	تولید H ₂ S	حرکت	دوب ژلاتین	پپرات	سینرات	کاتالاز	اکسیداز	گرم	سویه باکتری
-	+	میله‌ای	حساس	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C3
-	+	میله‌ای	حساس	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C5
-	+	میله‌ای	حساس	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C7

نمونه C7 کمترین میزان رشد هاله را دارا بود (شکل ۱). این بدان معناست که سویه C7 بیشترین توان بازدارندگی، سویه C3 با بازدارندگی متوسط و سویه C5 بدون خاصیت بازدارندگی بود.

بررسی توان بازدارندگی بین قارچ و باکتری

جهت بررسی میزان رشد قارچ *R. solani* در حضور جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از آزمون کشت متقابل استفاده شد. بر اساس این آزمون و از نظر میزان رشد هاله قارچ در مقابل باکتری، نمونه C5 بیشترین میزان رشد هاله قارچ و

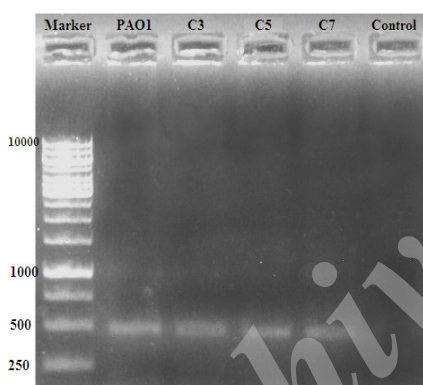


شکل ۱ میزان رشد هاله قارچ در برابر سویه‌ها

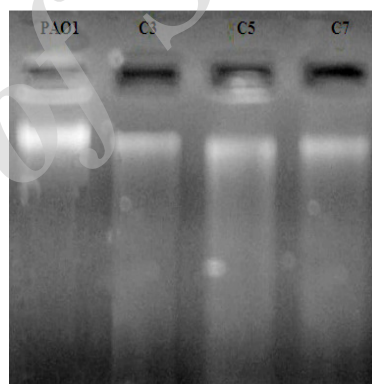
بررسی شد تا از استخراج صحیح اطمینان حاصل شود (شکل ۲).

استخراج DNA

پس از استخراج DNA به روش 5% KOH، کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌ها، روی ژل الکتروفورز ۱٪



شکل ۳ الگوی بانندی حاصل از PCR



شکل ۲ نتایج استخراج DNA

بررسی توانایی جدایه‌های آن‌تاگونیست در تولید سیانید هیدروژن

در بررسی کیفی تولید سیانید هیدروژن به روش آلستروم مشخص شد که تمام سویه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن را دارند، اما در مقدار تولید این گاز تفاوت‌هایی وجود دارد. در مورد مقادیر تولید سیانید هیدروژن با توجه به شدت رنگ ایجاد شده ارزیابی می‌گردد. پس از انکوباسیون نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، تغییر رنگ کاغذ صافی به

آزمون PCR جهت ردیابی ژن *hcnBC*

با استفاده از روش PCR و به کمک آغازگرهای *hcn-F* و *hcn-R* قطعه DNA به طول تقریبی ۵۸۷ جفت باز از دسته ژنی بیوسنتز متابولیت ثانویه سیانید هیدروژن تکثیر گردید. طول محصول انتظاری بین این پرایمرها، ۵۸۷ باز بود که شامل ۱۵۶ باز انتهایی از ژن *hcnB* و ۴۳۶ باز ابتدایی از ژن *hcnC* می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از این مرحله و مقایسه آن با سویه استاندارد PAO1، سویه‌های C3, C5, C7 واجد ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن بودند (شکل ۲).

باکتری‌های سودوموناس فلورسنت نیز بررسی گردید. بر اساس نتایج حاصل، هر سه سویه C3, C5, C7 واجد ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن بودند. در بررسی کیفی تولید سیانید هیدروژن نیز مشخص شد که هر چند تمام سویه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن را دارند، اما در مقدار تولید این گاز تفاوت‌هایی وجود دارد. نتایج نشان داد که سویه C7 بیشترین تولید سیانید هیدروژن را بعد از نمونه کنترل دارد که با نتایج میزان بازدارندگی مطابق است. لذا به نظر می‌رسد تولید سیانید هیدروژن از عوامل اصلی جلوگیری از رشد قارچ فوق باشند و می‌توان این جدایه‌ها را به‌عنوان کودهای بیولوژیک بالقوه و نیز به‌عنوان عوامل بیوکنترلی مورد استفاده قرار داد. سیانید هیدروژن به‌طور مؤثری مسیر سیتوکروم اکسیداز را مسدود میکند و برای همه میکروارگانیسم‌های هوازی در غلظت پیکومولار بسیار سمی می‌باشد.

این نتایج در مطابقت با نتایج مطالعات دیگر در زمینه بازدارندگی رشد قارچ توسط سودوموناس فلورسنت است (Pal and Gardener 2006; Girard *et al.* 2006) و نشان می‌دهد که تولید سیانید هیدروژن توسط برخی از سودوموناس‌های فلورسنت در سرکوب بیماری‌های گیاهی نقش دارند. سویه *Pseudomonas fluorescens* CHAO تولید آنتی‌بیوتیک، سیدروفور و سیانید هیدروژن در سرکوب بیماری پوسیدگی سیاه و سفید تنباکو نقش دارد، که به نظر می‌رسد تولید سیانید هیدروژن در سرکوب این بیماری نقش بیشتری را داراست و از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Pal and Gardener 2006). نتایج یک بررسی دیگر نیز نشان داد که تولید سیانید هیدروژن توسط سودوموناس فلورسنت از پوسیدگی سیاه ریشه توتون و تنباکو حفاظت میکند (Girard *et al.* 2006). لذا در نهایت این نتیجه را می‌توان گرفت که تولید متابولیت‌های فرار مانند سیانید هیدروژن توسط

قهوه‌ای، نشانه تولید ضعیف سیانید هیدروژن در ریزوباکتریای آنتاگونیست است. اگر رنگ کاغذصافی به قهوه‌ای متمایل به نارنجی تبدیل شود، تولید سیانید هیدروژن متوسط می‌باشد و اگر تغییر رنگ به نارنجی مایل به قرمز باشد، تولید سیانید هیدروژن قوی است. عدم تغییر رنگ به منزله عدم تولید سیانید هیدروژن است که در هیچ نمونه‌ای مشاهده نشد. این مشاهدات نشان داد که بیشترین مقدار گاز توسط نمونه C7 بعد از نمونه شاهد PAOI و کمترین مقدار در نمونه C5 تولید شده است.

بحث

قارچ‌های بیماری‌زای زیادی سبب ایجاد پوسیدگی ریشه چغندر قند در مراحل مختلف می‌شوند. در بین آن‌ها، گونه‌های ریزوکتونیا سبب پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، پوسیدگی خشک و پوسیدگی بنفش ریشه در مراحل مختلف رشد این گیاه می‌شود (Whitney and Duffos 1991). لذا بررسی روش‌های کنترل بیولوژیکی این بیماری‌ها حائز اهمیت است. از آنجایی که نقش سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل بیماری‌های قارچی گیاهان دیگر مشخص شده است، لذا شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر مزارع چغندر قند و بررسی قابلیت آن‌ها در مهار رشد قارچ *R. solani* نیز می‌تواند به انتخاب باکتری‌های بیوکنترلی خاک کمک کند. با توجه به نتایج مشاهدات، رشد هاله قارچ در کشت متقابل باکتری و قارچ، مشخص شد که نمونه C7 بیشترین توان بازدارندگی در برابر قارچ *R. solani* را دارا می‌باشد، که این میزان بازدارندگی می‌تواند به علت تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله سیانید هیدروژن، سیدروفور، فنازین و ... باشد.

با توجه به نقش سیانید هیدروژن تولید شده توسط باکتری‌ها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، وجود ژن سیانید هیدروژن و قابلیت تولید آن توسط

گیاهی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. این نتایج می‌تواند با بررسی‌های بیشتر در این زمینه جهت بررسی امکان استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان کود زیستی تکمیل گردد.

باکتری‌های بیوکنترلی خاک در برابر بیمارگرهای منتقل شونده از راه خاک را می‌توان یکی از مؤثرترین و کارآمدترین مکانیسم‌هایی دانست که در کنترل بیولوژیکی بیماری‌های

References:

منابع مورد استفاده:

- Adesina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K. Screening of bacterial isolates from various European soils for antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: Site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biology and Biochemistry*. 2007; 39(11): 2818-2828.
- Adhikari A, Dutta S, Nandi S, Bhattacharya I, De Roy M, Sarkar G, Mandal T. Antagonistic potentiality of native rhizobacterial isolates against root rot disease of okra, incited by *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Agricultural Research*. 2013; 8(4): 405-412.
- Ahmadinejad A, Okhovat M. Pathogenicity test of some soil-borne fungi on some important field crops. *Journal of Plant Pathology*. 1976; 12: 13-17.
- Alström S, Burns R. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*. 1989; 7(3): 232-238.
- Arcury T, Quandt S, Mellen B. An exploratory analysis of occupational skin disease among Latino migrant and seasonal farmworkers in North Carolina. *Journal of Agricultural safety and Health*. 2003; 9(3): 221-232.
- Balali GR, Moharabi Z. Study of Intraspecific variation of anastomosis group AG-2 of *Rhizoctonia solani* isolated from lawn (*Lolium perene* L.) using pectic zymorgan marker. *Iranian Journal of Biology*. 2006; 19(3): 241-250 (In Persian)
- Behbodi K, Sharifi A. The effects of *Pseudomonas fluorescens* on fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, root rot of sunflower. *Agricultural Sciences of Iran*. 2006; 36(4): 791-803. (In Persian)
- Ershad J. *Fungi of Iran*, Avin Publisher, Tehran, 1977; pp.52. (In Persian)
- Gerhardson B. Biological substitutes for pesticides. *Trends in Biotechnology*. 2002; 20(8): 338-343.
- Girard G, Barends S, Rigali S, Van Rij ET, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. Pip, a novel activator of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391. *Journal of bacteriology*. 2006; 188(23): 8283-8293.
- Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*. 2005; 3(4): 307-319.

- Habibi B. Some observations on the ecology of *Phytophthora drechsleri*, a fungus causing sugar beet root rot. *Journal of Plant Pathology*. 1975; 11: 88-98.(In Persian)
- Habibi B. Rubenkopffaulen und deren beziehung zu dem pilz *Rhizopus arrhizus*. *Ent. Phyt. Appliq.* 1977; 45: 56-64.
- Hecker R, Ruppel E. *Rhizoctonia* root rot resistance in sugar beet: breeding and related research. *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.* 1977; 19(3): 246-256.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Williams and Wilkins Publisher, Baltimore, 1994; pp.78
- Jayaprakashvel M, Mathivanan N. Management of Plant Diseases by Microbial Metabolites. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Nutrient Management*. 2011: 237-265.
- Kapsalis A, Gravanis F, Gowen S. Involvement of phenazine-1-carboxylic acid, siderophores and hydrogen cyanide in suppression of *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. damping-off by *Pseudomonas oryziphila* and *Xenorhabdus nematophila*. *Journal of Food Agriculture and Environment*. 2008; 6(1): 168.
- Kidarsa TA, Shaffer BT, Goebel NC, Roberts DP, Buyer JS, Johnson A, Kobayashi DY, Zabriskie TM, Paulsen I, Loper JE. Genes expressed by the biological control bacterium *Pseudomonas protegens* Pf5 on seed surfaces under the control of the global regulators GacA and RpoS. *Environmental Microbiology*. 2013; 15(3): 716-735.
- Kumar B, Dube H. Seed bacterization with a fluorescent *Pseudomonas* for enhanced plant growth, yield and disease control. *Soil Biology and Biochemistry*. 1992; 24(6): 539-542.
- Pal KK, Gardener BM. Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*. 2006; 2: 1117-1142.
- Parmeter Jr J, Whitney H. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state *Rhizoctonia solani*, biology and pathology, University of California Press Publisher, Berkeley, 1970; pp.7-19.
- Ramette A, Frapolli M, Défago G, Moëgne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2003; 16(6): 525-535.
- Ramette A, Frapolli M, Saux MF-L, Gruffaz C, Meyer J-M, Défago G, Sutra L, Moëgne-Loccoz Y. *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and applied microbiology*. 2011; 34(3): 180-188.
- Saharan B, Nehra V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science and Medical Research*. 2011; 21: 1-30.

- Sheikholeslam M, Younesi H, Safae D. Characterization of the fungi involved in sugar beet root rot and their distribution in Kermanshah province. *Journal of Sugar Beet*. 2006; 21(1): 99-100. (In Persian, abstract in English)
- Shivani B, Dubey R, Maheshwari D. Enhancement of plant growth and suppression of collar rot of sunflower caused by *Sclerotium rolfsii* through fluorescent *Pseudomonas*. *Indian Phytopathol*. 2005; 58(1): 17-24.
- Suresh A, Pallavi P, Srinivas P, Kumar VP, Chandra SJ, Reddy SR. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. *African Journal of Microbiology Reserch*. 2010; 4(14): 1491-1494.
- Tian H, Riggs RD. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. *Journal of nematology*. 2000; 32(4): 377.
- Vilgalys R, Cubeta M. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology*. 1994; 32(1): 135-155.
- Weller DM. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology*. 2007; 97(2): 250-256.
- Whitney E, Duffos J. *Compendium of Beet Diseases and Insects*, American Phytopathological Society Press Publisher, PaulMinnesota, USA, 1991; pp.76

Archive of SID