

ارزیابی مولکولی قابلیت تولید سیدروفور در سویه های سودوموناس فلوروسنت، عامل

کنترل کننده پوسیدگی ریشه در چغندر قند

جعفر وطن دوست^{۱*} عاطفه شیرزاد^۲ و علی اکبر جنت آبادی^۳

^۱ سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، گروه زیست‌شناسی

^۲ سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

^۳ سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه دامپزشکی

تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱

چکیده

از مهم ترین بیماری‌های چغندر قند، پوسیدگی ریشه می باشد که عامل آن قارچی خاک زی به نام *Rhizoctonia solani* است. باکتریهای خاک زی زیادی از جمله سودوموناس‌ها در اثر تولید موادی نظیر سیدروفور باعث کنترل این بیمارگرهای خاکزاد می‌شوند. لذا در این تحقیق پس از شناسایی سودوموناس‌های فلوروسنت در فراریشه مزارع چغندر قند سبزوار و بررسی توان بازدارندگی این باکتریها از رشد قارچ *R. solani*، ردیابی ژن بیوستز سیدروفور صورت گرفت. به این منظور نمونه های گیاه همراه با خاک فراریشه ای آن جمع آوری شدند. جهت به دست آوردن سودوموناس ها از محیط کشت اختصاصی سودوموناس آگار F استفاده شد. کشت خالص هر جدایه، پس از ۲ واکشت روی همان محیط تهیه گردید و ۳ سویه فلوروسنت براساس مطالعات میکروسکوپی و آزمونهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تفکیک و شناسایی شدند. برای بررسی میزان بازدارندگی جدایه-های سودوموناس فلوروسنت از رشد قارچ *R. solani*، آزمون کشت متقابل باکتری و قارچ انجام شد. بر اساس میزان هاله بازدارندگی، مشخص شد که سویه C7 با بازدارندگی شدید، سویه C3 با بازدارندگی متوسط و سویه C5 بدون خاصیت بازدارندگی است. همچنین بررسی وجود ژن بیوستز سیدروفور با PCR در این باکتریهای سودوموناس فلوروسنت نشان داد که تنها نمونه C7 واجد ژن بیوستز سیدروفور می باشد.

واژه های کلیدی: پوسیدگی ریشه، چغندر قند، سودوموناس فلوروسنت، قارچ *R. solani*

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۴۴۰۱۳۳۲۹، پست الکترونیکی: j.vatan@hsu.ac.ir

مقدمه

باعث توقف فعالیتهای حیاتی گیاه می‌شود (۲۵). در واقع پاتوژن تحت تأثیر ترشحات ریشه میزبان شروع به فعالیت می‌کند و در تماس با ریشه از بافت و یا زخم وارد میزبان شده، با تولید آنزیمهای سلولزیتیک و پکتولیتیک سبب تخریب دیواره سلولی میزبان و در نتیجه قهوه ای شدن و از بین رفتن بافت آن می‌شود. دمای ۲۰-۱۶ درجه سانتی گراد و رطوبت زیاد از شرایط بهینه بیماریزایی است و در دماهای بالاتر از ۳۰ درجه سانتی گراد و خاکهای اسیدی

یکی از مهم ترین بیماریهای چغندر قند، پوسیدگی ریشه می باشد (۱۱) و قارچهای بیماریزای زیادی باعث ایجاد آن می‌شوند. در این میان، قارچهای ریزوکتونیا و گونه معروف آن به نام *Rhizoctonia solani* که در خاک زندگی می‌کند، به ریشه چغندر قند حمله کرده 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

کلاته‌کننده آهن و محلول ساختن فسفات باعث تحریک و افزایش رشد گیاهان می‌شوند. در حالت غیر مستقیم، با استفاده از مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی اثرات مضر بیماری‌گرهای گیاهی را خنثی یا تعدیل نموده و بدین طریق موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند. رقابت برای جذب مواد و اشغال جایگاه‌های مناسب برای فعالیت پاتوژنها، تولید آنتی‌بیوتیک، آنزیم‌های لیتیک و تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن از مهم‌ترین مکانیسم‌های مورد استفاده در این روش می‌باشند که در اکثر موارد باکتری محرک رشد از طریق بیش از یکی از سازوکارهایی که ذکر گردید فعالیت می‌کند (۶ و ۷).

انواع متعددی از باکتریهای مفید ولی غیرهمزیست که به دلیل ویژگیهای فیزیولوژیک در فراریشه نسبت به خاک غیرفراریشه ای برتری دارند، به عنوان ریزوباکتریها یا باکتریهای فراریشه ای شناسایی و معرفی شده‌اند. این باکتریها بیشتر به دلیل تحریک رشد گیاه و نیز به لحاظ توان کنترل عوامل بیماریزای گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند.

در بین انواع این گروه، سودوموناس‌های فلورسنت اهمیت ویژه ای دارند و سودوموناس‌های بیوکنترل در کشاورزی جهت حاصلخیزی خاک در طول ۳۰ سال گذشته از اهمیت بالایی برخوردار بوده است (۲۸). باکتریهای جنس سودوموناس، از خانواده *Pseudomonadaceae* بوده و وجه تمایز سودوموناس‌های فلورسنت از سایر سودوموناس‌ها، تولید پیگمانهایی است که در برابر نور طول موج کوتاه فرابنفش به ویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت فلورسانس دارند. به این پیگمانهای با خاصیت فلورسنت و محلول در آب سیدروفور و اختصاصاً در مورد سودوموناس‌ها پیووریدین یا سودوباکتین گفته می‌شود (۲۶).

باکتریهای سودوموناس فلورسنت دارای انتشار وسیع بوده و به فراوانی در آب، خاک و به ویژه در ریزوسفر گیاهان وجود دارند. مطالعات فراوانی در مورد این باکتری صورت

(PH پایین تر از ۵/۶) ظاهر نمی‌شود (۱۰). علائم ریزوباکتونیسم به صورت سوختگی برگها، پژمردگی ناگهانی بسیاری از برگها، سیاه شدن برگها، مرگ آنها و پهن شدن آنها در اطراف طوقه می‌باشد (۲۱).

یک راه کنترل بیماری‌گرهای خاکزاد، مبارزه شیمیایی، استفاده از قارچ‌کشهای سیستمیک و آنتی‌بیوتیکها به صورت ضدعفونی بذر، ضدعفونی خاک و محلول پاشی روی گیاه است که علاوه بر آلودگی زیست محیطی، بر میکروفلور طبیعی خاک تأثیر منفی گذاشته و از حاصلخیزی خاک می‌کاهد. بدین جهات، کنترل بیولوژیک از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد (۱) 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. به کارگیری مبارزه بیولوژیک علیه عوامل بیماریزای خاک زی‌علاوه بر بی‌خطر بودن آنها برای محیط زیست قادرند در خاک مزرعه مستقرشده، بقاء یابند و به عنوان عوامل بیوکنترل طبیعی عمل نمایند (۳).

در چند دهه اخیر استفاده از توانایی باکتریهای ریزوسفری برای کنترل بیماریها و تحریک و تقویت رشد گیاهان در سطح وسیعی گسترش یافته است. باکتریهای منطقه ریزوسفر را ریزوباکتریها می‌نامند و انواع ریزوباکتریهایی که بر روی رشد و عملکرد گیاه اثرات مثبت دارند را اصطلاحاً ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) می‌نامند. سازوکارهای متعددی برای توضیح چگونگی تأثیر باکتریهای افزایش‌دهنده رشد گیاه بر رشد و نمو گیاهان شناخته شده است که این سازوکارها را می‌توان به طور کلی شامل دو گروه مستقیم و غیر مستقیم دانست. در حالت مستقیم انواع PGPR با استفاده از مکانیسم‌های تثبیت نیتروژن، افزایش جذب و محلول کردن عناصر غذایی، تولید هورمونهای رشد گیاهی، سنتز آنزیمهای تعدیل‌کننده رشد و توسعه گیاه، تولید انواع ویتامینها، تولید سیدروفورهای

این موجودات را با کمبود شدید آهن روبرو ساخته و از فعالیت باز می‌دارند (۲۰).

با توجه به اهمیت اقتصادی چغندر قند، پتانسیل بالای بیماری‌زایی گونه‌های ریزوکتونیا در مراحل مختلف رشد این گیاه، نقش مهم سیدروفور در کاهش شدت بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه و در راستای اتخاذ تصمیمات مؤثر در مدیریت این عامل بیماری‌زا، این تحقیق با هدف شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر مزارع چغندر قند جوین و خوشاب سبزوار، بررسی توانایی بازدارندگی آنها و ردیابی ژن بیوستنز یکی از مشتقات سیدروفور به نام پایوکلین انجام گرفت.

مواد و روشها

کشت باکتری، جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت: به منظور جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت، ابتدا تعداد ۵۱ نمونه خاک به صورت زیگزاگی به وسیله اوگر از ریزوسفر ۵ مزرعه چغندر قند جوین و خوشاب سبزوار با آلودگی به قارچ *R. solani* جمع‌آوری گردید. نمونه‌های هر مزرعه جهت رسیدن به کل میکروارگانیسم‌ها با یکدیگر مخلوط شدند. از هر نمونه خاک ریزوسفری (مزرعه A, B, C, D, E) ۱۰ گرم در ۹۰ سی سی آب مقطر ریخته شد و به مدت ۲ ساعت راکد ماند تا مایع رویی شفاف شود.

جهت کشت باکتری، از هر نمونه کشت خطی روی محیط سودوموناس آگار F انجام شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، پرگنه‌های رشد یافته از لحاظ شکل ظاهری کلنیها، قطر و هاله کلنیها، رنگ و اندازه کلنی بررسی شدند. در مرحله بعد پرگنه‌ها مجدداً جهت خالص‌سازی روی محیط سودوموناس آگار F رشد داده شدند و تا زمان رسیدن به تک کلنی واکشت انجام شد.

گرفته است. بعضی از جدایه‌ها موجب افزایش رشد و سلامتی گیاه شده و در نتیجه موجب کاهش کاربرد مواد شیمیایی در کشاورزی می‌شوند. همچنین سودوموناس فلورسنت یکی از چندین گونه باکتریایی معمول است که جهت کنترل بیماریها در فیلوسفر گیاهان به کار رفته است. تعدادی از جدایه‌های این باکتری نیز باعث تجزیه بیولوژیکی ترکیبات طبیعی یا ترکیبات سمی تولید شده توسط انسان می‌شوند و در گیاهان متعددی به صورت اپی فیت زندگی می‌کنند. به خاطر اهمیت سودوموناس‌های فلورسنت در محیطهای مختلف، مطالعات اکولوژیکی متعددی در مورد این باکتری صورت گرفته است (۲۶، ۲۷ و ۲۸).

استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت برای کنترل بیماری در برخی موارد مانند پوسیدگی بذر و پاخوره گندم و نخودفرنگی، پنبه، مرگ گیاهچه نخود ایرانی، بوته میری خیار و پوسیدگی سیاه ریشه توتون با موفقیت همراه بوده است. مشاهده شده است که *Pseudomonas fluorescens* در سطوح دانه‌ها و ریشه‌های گیاهان مستقر شده و می‌تواند از گیاهان در برابر عفونتهای قارچی و پاتوژنهای باکتریایی گیاهی محافظت کند (۱۳ و ۱۹). 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 (۵).

اغلب سودوموناس‌های جدا شده از خاک با جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا در اثر تولید موادی نظیر آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز و همچنین از طریق مستقیم با تولید هورمونهای گیاهی باعث تحریک رشد و کلونیزاسیون ریشه و در نتیجه افزایش رشد گیاه می‌شوند (۲). باکتریهای سودوموناس در شرایط کمبود Fe^{3+} در محیط با تولید مقدار زیادی از سیدروفورهای اختصاصی مانند سودوباکتین، پایوردین و پایوکلین و ... باعث جذب آهن و برخی دیگر از عناصر ریزومغذی نظیر روی شده لذا

برای بررسی میزان بازدارندگی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ *R. solani*، از کشت متقابل باکتری و قارچ در محیط کشت PDA استفاده شد. بعد از کشت باکتری در تمام سطح تشتک پتری، دیسکی به اندازه 0.5×0.5 سانتیمتر از حاشیه کشت جوان سه روزه قارچ عامل بیماری، به صورت وارون در وسط تشتک پتری قرار داده شد. به دنبال انکوباسیون تشتک پتریها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، رشد یا عدم رشد قارچ در کشت متقابل و در حضور باکتری بررسی گردید. در تشتک پتری شاهد نیز کشت قارچ بدون حضور باکتری صورت گرفت. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در شش تکرار انجام شد و میزان رشد میسلیم قارچ در حضور باکتری اندازه‌گیری شد. همچنین درصد بازداری از رشد میسلیم قارچ با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید. داده‌های به دست آمده از آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P \geq 1\%$) انجام شد.

برای شناسایی سودوموناس‌های فلور سنت، ۱۰ آزمون افتراقی براساس روش برگ‌انجام شد (۱۲). واکنش گرم، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی، ذوب ژلاتین، آزمون استفاده از سیترات، آزمون کاتالاز، ایندول، احیاء نیترات، تست مقاومت به کانامایسین، آزمون اکسیداز، تست MR-VP، تولید H_2S در جدایه‌های انتخابی و کلنیهای خالص به دست آمده در هر تشتک پتری صورت گرفت و سپس کلنیهای حاصل خالص سازی شدند.

کشت قارچ و بررسی میزان بازدارندگی بین قارچ و باکتری: 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 قرار گرفتند و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. برای شناسایی کامل قارچ از روش Parmeter و همکاران (۱۹۷۰) استفاده گردید (۱۷). برای انتخاب بهترین محیط کشت جهت بررسی میزان بازدارندگی بین قارچ و باکتری از سه محیط کشت سابورودکستروز آگار، مولر هینتون آگار و دکستروز آگار (PDA) استفاده شد.

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{قطر میسلیم رشد یافته در تشتک تیمار - قطر میسلیم رشد یافته در تشتک شاهد}}{\text{قطر میسلیم رشد یافته در تشتک شاهد}} \times 100$$

رابطه ۱:

DNA های استخراج شده با استفاده از آغازگرهای طراحی شده Pyo-F (AGA TGG ACA AAG CGC CCT GC) و Pyo-R (GAT GGG CGG AGA CGA ACA GG) مورد آزمون PCR قرار گرفتند. طراحی پرایمر با نرم افزار GeneRunner و براساس ناحیه pchD ژن بیوسنتز سیدروفور انجام شد. PCR در مخلوط واکنشی به حجم $25 \mu\text{l}$ شامل 20 ng DNA ، $2/5 \mu\text{l}$ بافر $10 \times \text{PCR}$ ، $1/5 \mu\text{l}$ از 50 mM MgCl_2 ، $1 \mu\text{l}$ 10 mM dNTP ، $1 \mu\text{l}$ از 0.2 هر پرایمر، 0.5 واحد آنزیم Taq و با شرایط زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه در 94°C درجه به مدت ۴

استخراج DNA و آزمون PCR: استخراج DNA از باکتریهای سودوموناس فلورسنت شناسایی شده به روش جوشاندن با $5\% \text{ KOH}$ به این صورت انجام شد که ابتدا مقدار $500 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون باکتری به همراه $25 \mu\text{l}$ از 0.5 KOH مولار را به مدت ۲ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد و سپس مجدداً $25 \mu\text{l}$ از 50 mM KOH به آن افزوده و ۲ دقیقه دیگر باکتریها جوشانده شد. در انتها سوسپانسیون شفاف شده به مدت ۴ دقیقه با 9000 rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی DNA باکتری بوده و در دمای 20°C - نگهداری شد.

نامهای C3, C5, C7 بودند. نتایج آزمونهای شناسایی در جدول ۱ آمده است.

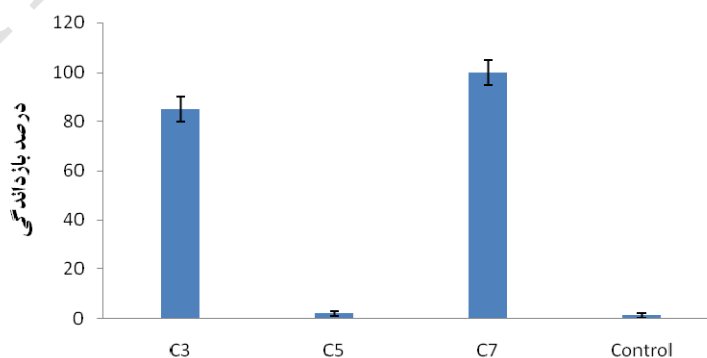
بررسی میزان بازدارندگی بین قارچ و باکتری: جهت
بررسی میزان بازدارندگی بین قارچ و باکتری، باید بهترین محیط کشت برای رشد قارچ و باکتری مورد بررسی قرار می‌گرفت. ارزیابی بین سه محیط کشت سابورو دکستروز آگار، مولر هیتتون آگار و سبب زمینی دکستروز آگار (PDA) صورت گرفت. در محیط کشت سابورو دکستروز آگار، سرعت رشد قارچ نسبت به باکتری بیشتر است و نمی‌توان به صورت کامل ایجاد هاله بازدارندگی را بررسی کرد. در محیط کشت مولر هیتتون آگار نیز قارچ در هیچ کدام از نمونه‌ها رشدی نداشت و قابل دیدن نبود. اما در محیط PDA، تأثیر بازدارندگی بهتر نمایان شد. جهت بررسی میزان بازدارندگی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ *R. solani*، درصد کاهش رشد قارچ در حضور باکتری محاسبه گردید. با تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار SAS مشخص شد که از میان ۳ سویه سودوموناس فلورسنت، در نمونه C7 کمترین رشد هاله قارچ و در نتیجه بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ و در نمونه C5 بیشترین هاله رشد قارچ و کمترین حالت بازدارندگی وجود داشت (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس نیز نشان می‌دهد که داده‌ها در سطح ۱ درصد معنی دار است (جدول ۲).

دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۶۰ ثانیه در ۵۲ درجه و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه انجام شد. پس از این مراحل نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه به منظور حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها قرار گرفتند. جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. تکرارهای متوالی و تغییر شرایط (گرادیان دمایی، گرادیان DNA، گرادیان $MgCl_2$) با هدف باند گرفتن از نمونه‌ها انجام شد.

کشت باکتری در غلظتهای مختلف آهن: به منظور بررسی میزان رشد باکتری سودوموناس در غلظتهای مختلف آهن، سویه‌های شناسایی شده به صورت کشت نقطه‌ای در ۱۰ غلظت مختلف کلرید آهن (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در دمای ۲۷ درجه رشد داده شد. اندازه‌گیری قطر هاله رشد باکتریها طی ۳ روز با استفاده از کولیس دیجیتال صورت گرفت.

نتایج و بحث

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، ۳ سویه به عنوان *Pseudomonas fluorescens* شناسایی گردید. این سه سویه از مزرعه C بحرآباد جوین شناسایی شدند، که با



شکل ۱- نمودار میزان بازدارندگی سویه‌ها از رشد قارچ

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک سودوموناسهای جدا شده از مزارع چغندر قند سبزوار. هر مزرعه با حروف لاتین (A,B,C,D,E) و نمونه‌های به دست آمده از هر مزرعه با شماره مشخص شده است.

رشته بیولوژی	رشد هوازی	رنگ	مقاومت به کانامپسین	Voges Proskauer	Methyl Red	ایندول	تولید H ₂ S	حرکت	ذوب ژلاتین	نیترات	سیترات	کاتالاز	اکسیداز	گرم	سویه باکتری
+	+	میله ای	حساس	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	A1
-	+	میله ای	حساس	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	A2
-	+	میله ای	حساس	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	A3
+	+	میله ای	حساس	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	A4
+	+	میله ای	مقاومت بالا	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	A5
+	+	میله ای	حساس	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	A6
+	+	میله ای	مقاوم	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	A7
+	+	میله ای	مقاوم	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	B1
+	+	میله ای	حساس	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	B2
-	+	میله ای	مقاوم	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	B3
-	+	میله ای	****	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	B4
+	+	میله ای	حساس	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	B5
-	+	میله ای	مقاومت بالا	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	B6
-	+	میله ای	حساسیت بالا	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C1
+	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	C2
-	+	میله ای	حساس	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C3
+	+	میله ای	حساسیت بالا	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	C4
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C5
+	+	میله ای	حساس	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C6
-	+	میله ای	مقاوم	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C7
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	C8
+	+	میله ای	حساس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	D1
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	D2
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	D3
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	D4
-	+	میله ای	حساسیت بالا	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	D5
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	E1
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	E2
-	+	میله ای	حساس	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	E3
+	+	میله ای	حساس	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	E4
+	+	میله ای	حساس	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	E5

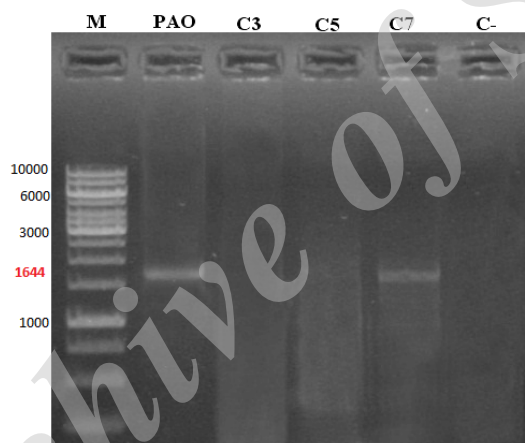
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس

F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات
۲۵۹۰/۴۰	۱۷۱۷۱/۴۷۷۸۰	۳۴۳۴۲/۹۵۵۶۰	۲	تیمار
	۶/۶۲۸۹۰	۹۹/۴۳۳۴۳	۱۵	خطا
		۳۴۴۴۲/۳۸۹	۱۷	کل

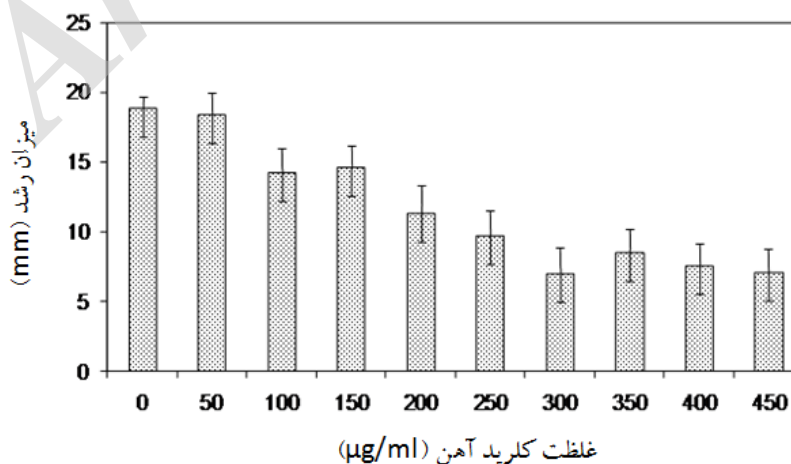
از پرایمرهای طراحی شده اختصاصی برای ناحیه *pchD* ژن بیوسنتز سیدروفور مورد آزمون PCR قرار گرفتند. به این منظور طبق شرایط ذکر شده در قسمت مواد و روشها برای تمامی نمونه‌ها PCR صورت گرفت. روش کار و غلظت مواد مصرفی برای تمامی سویه‌ها یکسان بود. طول محصول انتظاری بین این پرایمرها، ۱۶۴۴ باز بود. با استفاده از روش PCR و به کمک آغازگرهای *pyo-F* و *pyo-R* قطعه DNA به طول تقریبی ۱۶۴۴ جفت باز از دسته ژنی بیوسنتز متابولیت پایوکلین تکثیر گردید. بر اساس نتایج حاصل از این مرحله و مقایسه آن با سویه استاندارد PAO1، فقط سویه C7 واجد ژن بیوسنتز پایوکلین بود (شکل ۲).

همچنین جهت مقایسه میزان تفاوت در بازدارندگی سه نمونه باکتری، کشت متقابل باکتری و قارچ به روش مثلی و به صورت همزمان در سه تکرار انجام شد. به این صورت که در وسط تشتک پتری قطعه ای از قارچ به صورت وارون و سه نمونه باکتری به صورت پاره خطی به فاصله یکسان کشت داده شد. در کشت متقابل و همزمان سه باکتری نیز، نمونه C7 بیشترین بازدارندگی و نمونه C5 کمترین بازدارندگی از رشد قارچ را داشت.

ردیابی ژن *pchD*: پس از استخراج DNA به روش 5% KOH، کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌ها بر روی ژل الکتروفورز ۱ درصد بررسی شد تا از استخراج صحیح اطمینان حاصل شود. DNA های استخراج شده با استفاده



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از PCR. ردیفها به ترتیب مارکر ۱kb فرمتاز، نمونه شاهد PAO، نمونه های C3، C5 و C7 و کنترل منفی.



شکل ۳- بررسی غلظتهای مختلف کلرید آهن بر رشد کلنیها

بر اساس آزمون کشت متقابل باکتری و قارچ و مشاهده هاله بازدارندگی، مشخص شد که در همه سویه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح یک در صد با شاهد وجود دارد. با بررسی‌هایی که انجام شد، سویه C7 با بازدارندگی شدید و سویه C3 با بازدارندگی متوسط و سویه C5 بدون خاصیت بازدارندگی مشاهده شد. این بدان معناست که نمونه C7 بیشترین توان بازدارندگی در برابر قارچ *R. solani* را دارا می‌باشد و این میزان بازدارندگی می‌تواند به علت تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله سیدروفور باشد. با توجه به نقش سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌ها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، وجود ژن بیوستنز سیدروفور در باکتری‌های سودوموناس فلورسنت بررسی گردید. مقایسه نتایج با نمونه شاهد PAOI، نشان داد که در بین سه سویه جداسازی شده، نمونه C7 واجد ژن بیوستنز سیدروفور می‌باشد. حضور ژن سیدروفور در نمونه C7 و عدم وجود آن در نمونه C5 با نتایج بازدارندگی مطابق است اما در نمونه C3 با وجود خاصیت بازدارندگی، ژن سیدروفور وجود ندارد. خاصیت بازدارندگی در این نمونه می‌تواند به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه دیگر مثل سیانید هیدروژن باشد. در واقع مکانیسم بازدارندگی در سودوموناس‌ها پیچیده است و تنها به تنظیم تولید سیدروفورها بستگی ندارد. احتمالاً تنظیم تولید متابولیت‌های ثانویه دیگر و یا تغییر فاز در تولید و جذب سیدروفورها در فرآیند بازدارندگی مؤثرند (۱۴ و ۲۳).

مشخص شده است که توانایی سودوموناس‌ها برای رشد و تولید سیدروفورها وابسته به محتوی آهن و نوع منبع کربن در محیط وابسته است. در بررسی اثر آهن و مهار کننده‌های رشد در تولید سیدروفورها توسط سودوموناس فلورسنت نشان داده شد که تحت شرایط غلظت کم آهن در دزهای پایین‌تر از ۱۶۰ ماکروگرم بر لیتر سودوموناس‌های مورد مطالعه تولید پپتیدهای سیدروفور سبز-زرد می‌کند و بالعکس افزایش آهن فریک در غلظت‌های بالاتر از ۲۰۰ ماکروگرم بر لیتر تولید سیدروفور را سرکوب می‌کند

تأثیر غلظت‌های مختلف آهن بر میزان رشد سودوموناس‌های فلورسنت: نتایج نشان دهنده اثر بازدارندگی آهن از رشد باکتری و طولانی شدن فاز تأخیری در مراحل رشد باکتری بود. غلظت‌های مختلف آهن در سطح آماری ۱ درصد میزان رشد هاله باکتری را تحت تأثیر قرار داد ($p < 1\%$). با افزایش غلظت آهن در محیط کشت میزان رشد هاله به صورت خطی کاهش پیدا کرده به نحوی که با افزایش هر واحد غلظت آهن میزان رشد هاله ۱/۴۳ میلی متر کاهش پیدا می‌کند. بیشترین میزان رشد هاله در غلظت صفر مشاهده شد که اختلاف آماری معنی‌داری با غلظت ۵۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر آهن داشت (شکل ۳).

بحث

با توجه به پتانسیل بالای بیماری‌زایی گونه‌های ریزوکتونیا در مراحل مختلف رشد چغندر قند و نقش مهم سیدروفورها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی‌های طوقه و ریشه، شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر مزارع چغندر قند و بررسی قابلیت آنها در مهار رشد قارچ *R. solani* می‌تواند به انتخاب باکتری‌های بازدارنده زیستی خاک کمک کند. با توجه به نتایج به دست آمده، بهترین محیط کشت جهت بررسی میزان بازدارندگی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ ریزوکتونیا سولانی، محیط کشت PDA می‌باشد. هرچند که محیط کشت PDA یک محیط کشت اختصاصی قارچ است اما برای رشد هر دو نمونه قارچی و باکتریایی مناسب می‌باشد. در این محیط کشت قارچ سرعت رشد کمی نسبت به محیط کشت سابوردکستروز آگار داشت. محیط کشت مولر هیتون آگار نیز محیط کشت مناسب برای تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی است که جهت جداسازی و حفظ گونه‌های نیسریا و موراکسلا استفاده می‌شود. محیط کشت سابوردکستروز آگار حاوی پپتون است و به گونه‌ای مانع از رشد باکتری می‌شود. در نتیجه برای بررسی بهتر و دقیق‌تر میزان بازدارندگی از محیط کشت PDA استفاده شد.

سرکوب بیماری پوسیدگی سیاه و سفید تنباکو نقش دارد (۱۶).

در نتایج بررسی ۱۰ سویه سودوموناس فلورسنت جدا شده از خاکهای ذرت، برنج، یونجه مشاهده شد که این جدایه‌ها را می‌توان به عنوان کودهای بیولوژیک بالقوه و نیز به عنوان عوامل بیوکنترلی مورد استفاده قرار داد (۲۷). سویه ای دیگر از سودوموناس به نام *Pseudomonas pathogenesis Pf-5* در سطوح دانه‌ها و ریشه‌های گیاهان مستقر شده و می‌تواند از گیاهان در برابر عفونت‌های قارچی و بیمارگرهای باکتریایی گیاهی محافظت کند (۱۳ و ۱۹). در مطالعات دیگری، محاصره مزرعه با سودوموناس‌ها منجر به یک افزایش در عملکرد حبوبات به علت تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله سیدروفور شد (۲۲). نتایج دیگری نیز نشان داد که کاربرد سویه‌های تولیدکننده سیدروفور در مقایسه با شاهد باعث افزایش معنی‌دار میزان جذب آهن، میزان کلروفیل و همچنین وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاه ذرت شده است (۹).

به نظر می‌رسد که جدایه‌های سودوموناس که در تمام خاکها وجود دارند به نوعی خاصیت بازدارندگی زیستی از خود نشان می‌دهند و تولید متابولیت ثانویه سیدروفور نقش مهمی در کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی از جمله *R. solani* دارد. لذا می‌توان این جدایه‌ها را به عنوان کودهای بیولوژیک بالقوه و نیز به عنوان عوامل بازدارنده زیستی مورد استفاده قرار داد.

(۱۸). در تحقیق دیگری که به منظور بررسی نقش رقابت برای جذب آهن توسط سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل *R. solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا صورت گرفت نشان داده شد که وجود آهن در محیط کشت باعث کاهش معنی‌داری در تولید سیدروفور می‌شود به طوری که در غلظت‌های بالای ۵۰ میکرومول تولید سیدروفور به صفر می‌رسد (۲۴). نتایج این تحقیق نیز نشان دهنده اثر بازدارندگی آهن از رشد باکتری و کاهش میزان رشد هاله باکتری با افزایش غلظت آهن در محیط کشت بود.

نتایج بازدارندگی با نتایج داوونینگ و اوگرا مطابق است که بیان کردند که شواهد ژنتیکی و شیمیایی قابل توجهی وجود دارد که نشان می‌دهد بیوکنترلی عوامل بیمارزا و افزایش رشد گیاه ناشی از حضور سیدروفورها است (۸). این نتایج در مطابقت با نتایج مطالعات کنجدی و همکاران در زمینه بازدارندگی رشد قارچ توسط سودوموناس فلورسنت است و نشان می‌دهد که تولید متابولیت‌های ثانویه توسط برخی از سودوموناس‌های فلورسنت در سرکوب بیماری‌های گیاهی نقش دارند (۱۵). همچنین تولید سیدروفور پایوکلین توسط سودوموناس آئروجینوزا باعث القای مقاومت در گوجه فرنگی در برابر پاتوژن قارچی *Botrytis cinerea* می‌شود (۴). همچنین نشان داده شده است که سویه *Pseudomonas fluorescence CHAO* با تولید آنتی‌بیوتیک، سیدروفور و سیانید هیدروژن در

منابع

- Adesina M, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K, 2007, 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*, 39, 11, 2818-28.
- Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Talebi Jahromi K, 2004, Study on Production of Some Antimicrobial Metabolites by *Flourescent Pseudomonads*. *Iranian Journal of Agriculture Science*, 35, 3, 731-45.
- Arcury T, Quandt S, Mellen B, 2003, An exploratory analysis of occupational skin disease among Latino migrant and seasonal farmworkers in North Carolina. *Journal of Agricultural safety and Health*, 9, 3, 221-32.
- Audenaert K, Pattery T, Cornelis P, Höfte M, 2002, Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas*

- aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 11, 1147-56.
5. Behbodi K, Sharifi A, 2006, The effects of *pseudomonas fluorescent* on fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, root rot of sunflower. *Agricultural Sciences of Iran*, 36, 4, 791-803.
 6. de-Bashan L, Hernandez J, Bashan Y, 2012, The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation—A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology*, 61, 171-89.
 7. Díaz-Zorita M, Fernández-Canigia MV, 2009, Field performance of a liquid formulation of *Azospirillum brasilense* on dryland wheat productivity. *European journal of soil biology*, 45, 1, 3-11.
 8. Dowling DN, O'Gara F, 1994, Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends in Biotechnology*, 12, 4, 133-41.
 9. Tahmasbi F, Lakzian A, Khavazi K, Pakdin Parizi A, 2014, Isolation, identification and evaluation of siderophore production in *Pseudomonas* bacteria and its effect on hydroponically grown corn. *Journal of Cell and Molecular Research*, 27, 1, 75-87.
 10. Habibi B, 1975, Some observations on the ecology of *Phytophthora drechsleri*, a fungus causing sugar beet root rot. *Journal of Plant Pathology*, 11, 88-98.
 11. Hecker R, Ruppel E, 1977, *Rhizoctonia* root rot resistance in sugar beet: breeding and related research. *Journal of the American Society of Sugar Beet*, 19, 3, 246-56.
 12. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST, 1994, *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins Publisher.
 13. Kidarsa A, Shaffer T, Goebel C, Roberts P, Buyer S, Johnson A, et al., 2013, 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*, 15, 3, 716-35.
 14. Kinscherf G, Willis K, 2002, Global regulation by *gidA* in *Pseudomonas syringae*. *Journal of Bacteriology*, 184, 8, 2281-6.
 15. Konjedi M, Vatandoost J, Jannatabadi A, 2015, Detection of Hydrogen Cyanide Biosynthetic Gene in *Pseudomonas Fluorescent* growth inhibitor of *Rhizoctonia solani*, Causal Agent of Sugar Beet Root Rot. *Journal of Sugar Beet*, 31, 1,
 16. Pal K, Gardener B, 2006, Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, 2, 1117-42.
 17. Parmeter J, Whitney H, 1970, *Taxonomy and nomenclature of the imperfect state Rhizoctonia solani, biology and pathology*. University of California Press Publisher.
 18. Rachid D, Ahmed B, 2005, Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African Journal of Biotechnology*, 4, 7, 697-702.
 19. Ramette A, Frapolli M, Saux M, Gruffaz C, Meyer J, Défago G, et al., 2011, *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*, 34, 3, 180-8.
 20. Reyhanytabar A, Saleh Rastin N, Mohammadi M, Alikhani H, 2007, The Occurrence and Distribution of *Fluorescent Pseudomonads* in Wheat Fields in Tehran Province along with a Study on their Repressive Effect Against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, Causal Agent of Take-all Iranian *Journal of Agriculture Science* 34, 3, 571-8.
 21. Roos J, Hopkins R, Kvarnheden A, Dixelius C, 2011, The impact of global warming on plant diseases and insect vectors in Sweden. *European Journal of Plant Pathology*, 129, 1, 9-19.
 22. Saharan B, Nehra V, 2011, Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Science and Medical Research*, 21, 1-30.
 23. Sánchez-Contreras M, Martín M, Villaceros M, O'Gara F, Bonilla I, Rivilla R, 2002, Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of bacteriology*, 184, 6, 1587-96.

24. Sharifi R, Ahmadzadeh M, Sharifi Tehrani A, Fallahzadeh V, 2006, Competition for Iron Uptake by *Fluorescent Pseudomonads* to Control of *Rhizoctonia Solani* Kuhn Causing Agent of Bean Damping-Off Disease. Journal of Plant Protection (Agricultural Science and Technology), 22, 2, 183-95.
25. Sheikholeslami M, Younesi H, D. S, 2006, Characterization of the fungi involved in sugar beet root rot and their distribution in Kermanshah province. Journal of Sugar Beet, 21, 1, 99.
26. Srivastava S, Sinha V, Vaishnavi A, Kunwar T, Tigga RS. Regulation of Antibiotics Production in Biocontrol Strains of *Pseudomonas spp.*
- Microorganisms in Sustainable Agriculture and Biotechnology: Springer; 2012. 197-225.
27. Suresh A, Pallavi P, Srinivas P, Kumar V, Chandra S, Reddy S, 2010, Plant growth promoting activities of *fluorescent pseudomonads* associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Reserch, 4, 14, 1491-4.
28. Weller M, 2007, Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Phytopathology, 97, 2, 250-6.

Molecular assessment of siderophore production ability in *Pseudomonas fluorescent* strains, as a control agent of root rots in sugar beet

Vatandoost J.¹, Shirzad A.² and Janatabadi A.A.³

¹ Biology Dept., Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

² Agricultural Biotechnology Dept., Islamic Azad University, Sabzevar, I.R. of Iran

³ Agriculture Dept., Islamic Azad University, Sabzevar, I.R. of Iran

Abstract

Root rot is the most important disease of sugar beet caused by *Rhizoctonia solani* fungus which lives in soil. Many soil bacteria such as *Pseudomonas spp.* by production of materials such as siderophores could control soil borne pathogens. So in this study, after identifying *Pseudomonas fluorescent*s in the rhizosphere of Sabzevar sugar beet fields and the assessment of the bacteria to inhibit *R. solani* growth, detection of siderophore biosynthetic gene was performed. For this purpose, plant samples along with its rhizosphere soil were collected. To obtain specific *Pseudomonas*, *Pseudomonas* agar F medium was used. After 2 subcultures on the same medium, three *Pseudomonas fluorescent* strains based on microbial tests were identified. To evaluate the growth inhibition of *R. solani* by *Pseudomonas fluorescent*, dual culture tests were done. Based on inhibition areola, it was shown that C7 and C3 isolates have severe and moderate deterrence respectively but C5 strain has no deterrent effect. PCR results also showed that only C7 isolate contained siderophore biosynthetic genes.

Key words: Root rots, Sugar beet, *Pseudomonas fluorescent*, *Rhizoctonia solani* fungus