

ارزیابی ویژگی‌های مولکولی و زیستی باکتری *Pseudomonas fluorescens* UTPF5

عامل بیوکنترل *Meloidogyne javanica* روی گوجه‌فرنگی

نگار باقری^۱، مسعود احمدزاده^{۱*}، حمیده افشارمنش^۲ و زهرا صابر باغبان^۱

^۱ تهران، دانشگاه تهران، گروه گیاهپزشکی

^۲ تهران، سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی

تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۲

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۷

چکیده

در این تحقیق، خصوصیات زیستی و مولکولی سویه *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 به عنوان یک باکتری مهم بیوکنترل در ایران، مورد ارزیابی قرار گرفته است. تأثیر نانوذرات نقره، تأثیر باکتری در لاکاز فارچی و همچنین جنبه‌های مولکولی باکتری از جمله ردیابی ژنهای *phlA* و *phlD* و *hcnAB* بررسی شد. مقدار بازدارندگی این سویه از بیماری زایی نماتد *Meloidogyne javanica* تعیین شد. عصاره، سوسپانسیون و ترکیبات فرار باکتری بترتیب باعث کاهش ۳۵، ۲۵ و ۸۵ درصدی در تفریح تخم شده و افزایش مرگ و میر لارو در اثر عصاره و ترکیبات فرار باکتری بترتیب بمیزان ۵۳-۳۴ و ۸۵ درصد تعیین شد در حالی که سوسپانسیون باکتری در مرگ و میر لارو تأثیری ندارد. افزایش غلظت نانوذرات نقره از ۰/۲۵ تا ۲ میکرولیتر بر لیتر سبب افزایش تشکیل بیوفیلم و از این غلظت به بعد روند کاهش در تشکیل بیوفیلم می‌شود. سویه UTPF5 واجد ژنهای *phlA*، *phlD* و *hcnAB* است. افزودن عصاره باکتری به محیط کشت جدایه فارچی، بر تولید آنزیم لاکاز توسط آنها تأثیر داشت و میزان تولید آنزیم در سه غلظت منتخب عصاره باکتری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد نشان داد. در بررسی‌های گلخانه توانایی بیوکنترل بیمارگرهای هدف و افزایش رشد گیاهان به اثبات رسید. بطور کلی این سویه *P. fluorescens* UTPF5 اثرات بیوکنترلی بسیار خوبی نشان داد و ویژگی‌های مولکولی آن نیز از طریق ردیابی ژنهای مهم مورد بررسی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی: لاکاز، نانوذرات نقره، نماتد گره ریشه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۶۰۹۱۰۰، پست الکترونیکی: ahmadz@ut.ac.ir

مقدمه

موادی از جمله آهن و یا تولید آنتی‌بیوتیکها یا آنزیمهای لیزکننده قادر به کنترل همزمان بیماریهای گیاهی هستند (۱۳).

ضرورت انجام این پژوهش که شامل دستیابی به باکتریهای مؤثر که قابلیت تجاری‌سازی و کاربرد در سطح مزارع و باغات را داشته باشند، از اهمیت خاصی برخوردار است. معرفی این جدایه‌ها برای توسعه کنترل بیولوژیک در کشور بسیار ضروری است.

در سه دهه اخیر تعداد زیادی از باکتریهای پروبیوتیک، شناسایی و تعداد کمی از آنها به صورت تجاری تولید شده‌اند که باعث جلب توجه در استفاده از آنها به عنوان روش جایگزین مناسبی برای فرآورده‌های شیمیایی شده- است (۹). کاربرد وسیع ریزوباکتریهای تحریک کننده رشد گیاهی در محصولات مختلف علاوه بر کاهش مصرف کودهای شیمیایی و آفت کشها سبب افزایش رشد گیاه و به تبع آن افزایش محصول می‌شود. این عوامل با رقابت برای

ژنهای گزارشگر ابزاری مناسب را برای ردیابی بیان ژن در محیط‌های طبیعی فراهم می‌آورند. سیستم ژن گزارشگر، شامل ژنی است که فاقد پروموتور طبیعی خود بوده و تنها هنگامی می‌تواند نسخه‌برداری شود که به پایین دست یک پروموتور خارجی الحاق گردد. سیستم گزارشگر باید حساس بوده، تعیین کمیت آن براحتی امکان‌پذیر باشد و به تغییر در فعالیت نسخه‌برداری پاسخ دهد (۱۴). ژنهای گزارشگر متعددی در مطالعات اخیر اکولوژی میکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که می‌توانند براساس فنوتیپهای منحصر بفرد خود تعیین کمیت شوند. ژن گزارشگر *phlA-lacZ* برای بررسی تأثیر عوامل محیطی مختلف بر تولید (2,4-diacetylphloroglucinol) DAPG در شرایط ریزوسفر با موفقیت مورد استفاده قرار گرفته‌است (۱۵، ۱۶ و ۲۰). با استفاده از تکنیک ژنهای گزارشگر، محققین بیان ژنهای بیوسنتزکننده آنتی‌بیوتیک‌هایی چون PCA، DAPG و Plt را در شرایط *in situ* به اثبات رسانیده‌اند (۱۹ و ۲۰).

هدف از این پژوهش معرفی برخی خصوصیات مهم سوبه *P. fluorescens* UTPF5 می‌باشد. دانستن این خصوصیات در استفاده بهینه در شرایط مختلف زراعی و نیز در فرآیند تجاری‌سازی نقش مهمی دارد.

مواد و روشها

تهیه باکتری *P. fluorescens* UTPF5 قارچ *R. solani* و نماتد *M. javanica*: باکتری *P. fluorescens* UTPF5 از کلکسیون باکتریهای آنتاگونیست، قارچ *Rhizoctonia solani* از کلکسیون قارچ‌شناسی و نماتد به طور خالص از گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران دریافت شد.

سنجش MIC (حداقل غلظت بازدارندگی) نانوذرات نقره روی *P. fluorescens* UTPF5: برای این منظور آزمون بروش میکروتیتراپلیت انجام شد. غلظتهای مورد استفاده نانوذرات شامل ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۸ میکرولیتر بر لیتر تهیه شدند، که در تمامی مراحل رقیق‌سازی محلول

عموماً قارچها در تقابل با آنتاگونیست‌ها یا میکروارگانیسم‌های رقابت‌کننده دیگر، آنزیم اکسیدکننده فنول لاکاز را در منطقه برخورد، تولید می‌نمایند که بنظر می‌رسد در محافظت از آنها در برابر ترکیبات آنتی‌بیوتیک و تنشهای اکسیداتیو سلولی نقش داشته باشند (۶). القای لاکاز در برخی قارچها به عنوان روشی برای مقاومت به عوامل آنتاگونیست است (۲۵ و ۳۴). چهار ژن لاکاز در قارچ *Rhizoctonia solani* شناسایی شده است (۳۲).

ترکیبات فرار باکتریها مثل الکلها و آلدئیدها و ترکیبات آروماتیک و سولفیدها و کتونها باعث کاهش فعالیت لاکاز در قارچهای *Magnaporthe oryzae* و *Gaeumannomyces graminis* می‌شوند. لاکازها در مسیر بیوسنتز ملانین نقش دارند و کاهش فعالیت آن سبب افزایش پیش‌ماده سنتز ملانین که خاصیت آنتی‌بیوتیکی دارد و در نتیجه باعث تجمع آن می‌شود. بنابراین ترکیبات فراری که توسط آنتاگونیست‌ها تولید می‌شوند، می‌توانند مکانسیمهای دفاع ساختاری و بیوشیمیایی را در قارچ القاء کنند. باکتری *Pseudomonas fluorescens* آنزیم لاکاز را القاء می‌کند که در پلیمریزاسیون ملانین در *R. solani* دخالت دارد، القای لاکاز پاسخی به جریان ریزش کلسیم بوده که یک علامت سلولی هنگام تنش کشنده است (۶). رادیکالهای آزاد ناشی از فعالیت لاکاز ترکیبات آنتی‌بیوتیک را غیرسمی می‌کند (۴).

نماتد گره ریشه گوجه‌فرنگی *Meloidogyne javanica* از عوامل خاکزاد است که مکانسیمهای مؤثر در کنترل بیولوژیک این نماتد در توسعه گال ریشه، تفریح تخم و زنده‌مانی به طور مستقیم با تولید متابولیت‌های سمی یا به طور غیرمستقیم با افزایش مقاومت سیستمیک در گیاه اثر می‌گذارند. افزایش مقاومت سیستمیک نیز باعث کنترل *Meloidogyne* روی گیاه گوجه‌فرنگی تیمار شده با *Pseudomonas* می‌شود (۱).

هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۸۰ میکرولیتر محیط کشت TSB استریل ریخته شد و سپس ۴۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف محلول نانوذرات نقره به چاهک‌های مورد نظر اضافه و در مرحله آخر نیز ۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به چاهک‌ها برای رسیدن به حجم ۲۰۰ میکرولیتر اضافه شدند. سپس میکروپلیت بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و در نهایت، جذب هر چاهک با طول موج ۴۹۲ نانومتر و با استفاده از دستگاه الیزا ریدر مقدار تشکیل بیوفیلم اندازه‌گیری شد (۲۷).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره بر تولید آنزیم لیپاز در جدایه باکتریایی *P. fluorescens* UTPF5

: محیط کشت مناسب برای بررسی لیپاز شامل ۱۰ گرم پیتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱ گرم کلرور کلسیم، ۱۵ گرم آگار، ۱۰ میلی‌لیتر توئین ۲۰ در یک لیتر آب مقطر است. محیط را داخل هشت ظرف ارلن تقسیم و غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸ و ۱۰ میکرولیتر بر لیتر به محیط کشت اضافه و در پتری‌های استریل تقسیم شدند. کشت ۲۴ ساعته باکتری روی این محیط‌ها کشت و بمدت ۲۴ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت با اندازه‌گیری قطر رسوب اطراف کلنی باکتری که نشان‌دهنده تجزیه توئین و تولید آنزیم لیپاز بود و با استفاده از فرمول زیر درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره از تولید آنزیم لیپاز محاسبه شد (۲۷).

درصد بازدارندگی = قطر رسوبات اطراف شاهد - قطر رسوبات اطراف نمونه / قطر رسوبات اطراف شاهد * ۱۰۰

تولید لاکاز توسط *R. solani* در حضور غلظت‌های مختلف عصاره باکتری: نحوه آماده‌سازی قارچ برای این مرحله از آزمایش‌ها بروش (۵) انجام گرفت. پس از گذشت هفت روز از کشت قارچ در محیط زاپک، مایع ۲۰۰ میکرولیتر از محیط مایع برداشته، با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پنجاه میکرولیتر از

نانوذرات نقره با استفاده از آب مقطر استریل، با pH=۷ و در لوله‌های استریل با حجم ۵۰ میلی‌لیتر انجام شد. روش کار (۲۷) بدین صورت بود، که در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت، ۸۰ میکرولیتر محیط کشت استریل NB (Nutrient Broth) ریخته شد و سپس ۴۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف محلول نانوذرات نقره به چاهک‌های مورد نظر اضافه و در مرحله آخر نیز ۸۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با جذب، ۰/۵ برای رسیدن به حجم نهایی ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک‌ها اضافه شدند سپس میکروپلیت بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه نگهداری شد. پس از ۲۴ ساعت، جذب هر یک از چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا ریدر و در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۷).

سنجش MBC (حداقل غلظت باکتری‌کشی) نانوذرات نقره روی *P. fluorescens* UTPF5: پس از آماده‌سازی محیط کشت NA (Nutrient Agar) حاوی غلظت‌های ۳، ۵، ۷، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ و ۴۵ میکرولیتر بر لیتر از ذرات نانونقره، از کشت ۲۴ ساعت باکتری بر روی محیط NA یک لوپ به لوله حاوی ده سی سی آب مقطر استریل منتقل شد و بمدت پنج دقیقه ورتکس شد، جذب آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۰/۵ تنظیم، سپس سری رقت هفتم از باکتری تهیه شد. از سری رقت هفتم، ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط پنخش شد. سپس نمونه بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه نگهداری شدند (۲۷). رشد کلنیها پس از ۴۰ ساعت شمارش شد.

بررسی اثر نانوذرات نقره بر تشکیل بیوفیلم جدایه باکتریایی *P. fluorescens* UTPF5: آزمون بروش میکروتیترپلیت انجام شد. از کشت ۲۴ ساعت باکتری روی محیط NA بمیزان یک لوپ داخل ظروف ارلن حاوی ۵۰ سی سی محیط کشت TSB (Tryptic Soy Broth) منتقل شد و نمونه‌ها بمدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه و ۱۳۵ دور در دقیقه نگهداری شدند. در

بررسی اثر عصاره کشت سوسپانسیون سلولی باکتری و ترکیبات فرار UTPF5 روی تفریح تخم *M. javanica*: با استفاده از روش صدیقی و همکاران (۳۰)، مقدار تخم تفریح شده محاسبه شد، همچنین روش صدیقی و شوکت (۲۸)، برای اندازه‌گیری تأثیر عصاره باکتری در مقدار تفریح تخم نماتد استفاده شد. در مورد ترکیبات فرار از روش فرناندو و همکاران (۷) با کمی تغییرات استفاده شد که باکتری در ظروف پتری دو قسمتی کشت داده، درب آن با پارافیلیم بسته شد بعد از ۲۴ ساعت ۵۰ عدد تخم نماتد بسمت دیگر پتری اضافه شد، درب ظروف پتری با پارافیلیم محکم شد و بعد از ۷۲ ساعت بررسی صورت گرفت.

بررسی اثر عصاره کشت و سوسپانسیون باکتری و ترکیبات فرار UTPF5 روی مرگ و میر لاروهای سن دوم *M. javanica*: طبق روش صدیقی و شوکت (۲۸) با مقداری تغییرات، به منظور تعیین خصوصیت نماتدکشی سویه باکتریایی، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون لاروهای تازه تفریح شده (۳۰ تا ۴۰ لارو در هر میلی‌لیتر) با دو میلی‌لیتر از عصاره کشت باکتری به چاهکهای پلیت انتقال داده شد. عصاره کشت باکتری با درصدهای مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ نیز روی لاروها بکاربرده برده شد و مقدار مرگ و میر محاسبه شد. برای تعیین تغییر مرفولوژیکی لارو سن دوم بعد از ۴۸ ساعت در معرض عصاره قرارگرفتن از چشمی عکاسی استفاده شد. ترکیبات فرار نیز بهمان روش قبلی (۷) اندازه‌گیری شد و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت تعداد لاروهای مرده محاسبه شد.

تعیین تحرک و جلب لاروهای سن دو نماتد با عصاره باکتری و سوسپانسیون باکتری: به منظور بررسی حرکت نماتدها از محیط آب آگار یک درصد استفاده شد. به این ترتیب که در وسط هر پتری محتوی آب آگار یک چاهک به قطر نیم میلی‌متر ایجاد شد که درون هر چاهک عصاره باکتری با رفتهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد و همچنین سوسپانسیون $10^8 \times 1/8$ (CFU/ml) باکتری ریخته‌شده و در

مایع رویی به داخل ویال انتقال داده شد. در مرحله بعد با در نظر گرفتن تعداد نمونه‌ها و اینکه هر نمونه نیاز به ۵۰ میکرولیتر از مخلوط بافر سوکسینات سدیم ۲۵ میلی‌مولار با اسیدیته پنج و ABTS پنج میلی‌مولار دارد و نیز با توجه به وزن مولکولی این دو ماده اقدام به تهیه این مخلوط شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از آن بهر یک از نمونه‌ها اضافه و پس از آن با استفاده از ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر، حجم نمونه‌ها به یک میلی‌لیتر رسید. بدین ترتیب نمونه‌ها برای اندازه‌گیری توسط اسپکتروفتومتر آماده شدند. پیش از اندازه‌گیری نمونه‌ها بمدت ۳۰ دقیقه داخل انکوباتور در دمای ۲۵ نگهداری شدند و پس از آن میزان نمونه‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر توسط دستگاه اندازه‌گیری شد. سپس درصد بازدارندگی از تولید آنزیم لاکاز توسط غلظتهای مختلف نانوذرات نقره با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۵):

درصد بازدارندگی = غلظت لاکاز در شاهد - غلظت لاکاز در نمونه / غلظت لاکاز در شاهد $\times 100$

افزودن غلظتهای مختلف عصاره باکتری به محیطهای کشت: *R. solani* - عصاره باکتری به سه نسبت حجم به حجم ۵، ۱۵ و ۲۵ درصد به کشتهای ۴۸ ساعته قارچ در محیط مایع زاپک اضافه شد و بمدت هفت روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در تاریکی و بدون تکان دادن نگهداری شدند. در نهایت ۱۵۰ میکرولیتر از هر تیمار در ۵۰۰۰ دور بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی برای ارزیابی میزان فعالیت لاکاز استفاده شد (۵).

تأثیر شرایط محیطی در القای لاکاز توسط *R. solani* در مجاورت با عصاره باکتری یا کشت همزمان با باکتری: فعالیت لاکاز در جدایه AG4 و باکتریایی UTPF5 و غلظت عصاره ۱۵ درصد محیط کشت زاپک (۱/۵ میلی‌لیتر عصاره در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت) مورد استفاده قرار گرفت.

کنترل *M. javanica* توسط *P. fluorescens* UTPF5 در

شرایط گلخانه‌ای: در آزمایش‌های گلخانه‌ای از چهار روش برای تیمار بذور استفاده شد که شامل، تیمار بذر با باکتری، تیمار نشاها با باکتری، ریختن سوسپانسیون $10^8 \times 1/8$ باکتری و عصاره باکتری در خاک بود. چهار هفته بعد از کاشت بذور تیمار شده با باکتری و یک هفته بعد از نشاء و کاربرد سوسپانسیون و عصاره باکتری، تخم و لارو نماتد بمقدار ۶۰۰۰ عدد مخلوط تخم و لارو در اطراف ریشه-های گوجه‌فرنگی به صورت ایجاد سه گودال با میله شیشه‌ای و ریختن سوسپانسیون تخم و لارو به کار رفت. ۶۰ روز بعد از مایه‌کوبی نماتد، تمام گیاهان از ریشه به طور کامل درآمده و زیر شیر آب شسته شد، شاخه‌ها از ریشه‌ها جدا شد، درصد گلدهی و میوه در تیمار و شاهد محاسبه شد. وزن‌تر و خشک ریشه و ساقه و طول آنها اندازه‌گیری شد. قبل از خشک کردن ریشه‌ها با استفاده از بیناکولر تعداد گالهای تولید شده بر روی تمام سیستم ریشه‌ای شمارش شد.

تعیین شاخصهای بیماری: با استفاده از دو مقیاس شاخص گال بروش هوسی و جانسن (۱۰) تعداد گال در کل سیستم ریشه‌ای محاسبه و درصد شاخص گال تعیین شد. مقدار کل تخمها در ریشه با استفاده از روش استخراج تخم و شمارش آنها محاسبه شد.

اندازه‌گیری کلروفیل: این اندازه‌گیری بر مبنای روش آرنون (۲) است. سپس با دستگاه الیزا ریدر مقدار جذب عصاره استخراج شده در طول موجهای ۶۴۵ نانومتر، ۶۶۳ نانومتر، ۴۷۰ نانومتر، ۴۸۰ نانومتر و ۵۱۰ نانومتر قرائت شد.

با استفاده از روابط زیر مقدار کلروفیل a ، کلروفیل b کلروفیل کل و کاروتنوئید محاسبه شد.

$$W \times 1000 / V \times [(12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})] = \text{میلی-}$$

گرم کلروفیل a در هر گرم برگ تر

اطراف این چاهک به فاصله یک سانتیمتر از حاشیه پتری، چهار لارو سن ۲ نماتد قرار داده شد؛ بعد از یک تا دو ساعت حرکت نماتدها بسمت چاهک (+) و بسمت خلاف جهت چاهک یا حاشیه پتری (-) اندازه‌گیری شد. در ظروف شاهد بجای عصاره باکتری، آب به چاهکها اضافه شد (۲۴)، بررسی حرکت نماتدها با قرار دادن پتریها در نور با زاویه ۴۵ درجه و همچنین در زیر میکروسکوپ صورت گرفت (۳).

استخراج تخم و لارو نماتد: برای استخراج تخم و به دست آوردن لارو سن دوم از روش هوسی و بارکر (۱۱) استفاده شد. تخمهای استخراج شده در پتری حاوی آب قرار گرفته و در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و لاروها به طور روزانه جمع‌آوری شدند.

روش مایه‌کوبی نماتد: با یک میله شیشه‌ای در فاصله یک سانتیمتری طوقه گیاه سوراخی به عمق دو تا سه سانتیمتر در خاک ایجاد و به آرامی سوسپانسیون حاوی مخلوط تخم و لارو بمقدار ۶۵۰۰ عدد را طبق روش صدیقی و شوکت (۲۹) وارد این سوراخها کرده و دهانه آنها با خاک پر شد. همچنین مقدار نفوذ نماتد در حالتی که بذر با باکتری تیمار شده بود نیز بررسی شد.

تعیین مقدار نفوذ نماتد به ریشه: یک هفته بعد از تلقیح به طور کامل ریشه‌ها را بیرون آورده و به منظور مشاهده لارو درون بافت ریشه رنگ‌آمیزی شدند. ریشه‌های آلوده حاوی نماتد بعد از شستشو با آب، بمدت یک دقیقه در لاکتوفنل اسیدفوشین درحال جوش قرار گرفتند، سپس بلافاصله ریشه‌ها خارج شد و بعد از شستشو در زیر جریان آرام آب، ریشه‌ها را در لاکتوفنل تنها بمدت ۴۸ ساعت قرار داده تا رنگ از بافت ریشه‌ها حذف شود. تعداد لارو نفوذ کرده به ریشه شمارش شدند. برای انجام این رنگ‌آمیزی از روش اسیدفوشین لاکتوفنل استفاده شد که بافتهای حاوی نماتد را قرمز می‌کند.

بازی بوده و قادرند قطعه‌ای بطول ۷۴۵ جفت باز را تکثیر کنند (۲۲). ردیف بازهای آغازگرها به صورت زیر است:

Phl2a (forward) 5'-GAG GAC GTC GAA
GAC CAC CA -3'

Phl2b (reverse) 5'- ACC GCA GCA TCG
TGT ATG AG -3'

آغازگرهای phl2a و phl2b ساخت شرکت MWG Biotech کشور آلمان است که دمای ذوب آنها بترتیب ۵۹/۴ و ۶۱/۴ درجه سانتی‌گراد است. باکتری روی محیط KB کشت داده و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد بمدت ۴۸ ساعت نگهداری شد.

تخریب سلولهای باکتری: به منظور تخریب سلولها مطابق روش زیر (۳۳) استفاده شد.

مخلوط واکنش PCR: تکثیر در ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش انجام شد (جدول ۱) (۳۳).

$W = [(22.9 \times A_{645}) - (4.69 \times A_{663})] \times V / 1000$ میلی-
گرم کلروفیل *b* در هر گرم برگ تر

$W = [(20.2 \times A_{645}) + (8.02 \times A_{663})] \times V / 1000$ میلی-
گرم کلروفیل کل در هر گرم برگ تر

$W = 7.6 \times (A_{480}) - 14.9 \times (A_{510}) \times V / 1000$ میلی-گرم
کاروتنوئید در هر گرم برگ تر

A مقدار جذب در طول موج مورد نظر، V حجم نهایی استون ۸۰ درصد برحسب میلی‌لیتر و W اندازه برگ تازه بر حسب گرم است.

ردیابی ژنهای *phlA* و *phlD* و *hcnAB* واکنش زنجیره-ای پلیمرز (PCR): از آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی دو ژن مهم در سنتز دی‌استیل فلوروگلوکوسینول به نامهای *phlA* و *phlD* بشرح زیر استفاده شد. آغازگرهای *phl2a* و *phl2b* که برای تکثیر ژن *phlD* طراحی شده‌اند ۲۰ جفت

جدول ۱- مقادیر حجمی هر یک از مواد به کار رفته در ترکیب مخلوط واکنش PCR با آغازگرهای *phl2a* و *phl2b*

مواد به کار رفته در واکنش	حجم در واکنش (میکرولیتر)
آب دو بار تقطیر استریل	۹
بافر ۱۰x PCR	۲
کلرید منیزیم (MgCl ₂) (۵۰ میلی‌مول)	۰/۸
دی‌متیل سولفوکسید (DMSO) ۵٪	۱
آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin=BSA mg/ml) (۲۰)	۰/۵
مخلوط دی‌نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) (۱۰ میلی‌مول)	۰/۸
آغازگر <i>phl2a</i> (۱۰ پیکومول)	۰/۸
آغازگر <i>phl2b</i> (۱۰ پیکومول)	۰/۸
آنزیم Smar Taq (۵ واحد در هر میکرولیتر ۵ U/μl)	۰/۳
سلول متلاشی شده (cell lysate)	۴
حجم کل	۲۰

تخریب شده به ازای هر جدایه در هر لوله ۰/۲ میلی‌لیتری مخصوص PCR ریخته شده و سپس بهر لوله ۱۶ میکرولیتر از مخلوط PCR اضافه شد. به منظور اطمینان از صحت آزمایش، در هر آزمایش از سویه CHA0 که دارای

مواد آورده شده در جدول ۱ بجز سلولهای تخریب شده بترتیبی که نوشته شده در یک لوله ۱/۵ میلی‌لیتری استریل ریخته شده و بخوبی مخلوط شد. سپس مخلوط بمدت چند ثانیه با دور پایین (۴۰۰۰ دور) سانتریفیوژ شد. سلولهای

phIA-1r (reverse) 5'- GAT GCT GTT CTT
GTC CGA GC-3'

این آغازگرها ساخت شرکت MWG Biotech کشور آلمان و دمای ذوب آنها ۵۹/۴ درجه سانتی گراد است. ابتدا یک لوپ از کلنی کشت دو روزه باکتری برداشته، در ۵۰۰ میکرولیتر از محیط مایع KB داخل لوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری کشت شد. سپس نمونه‌ها بمدت ۱۶-۱۴ ساعت (فاز لگاریتمی) روی شیکر قرار گرفتند (۲۳).

تخریب سلولهای باکتری: استخراج DNA به صورت مستقیم با تخریب سلولهای باکتری صورت گرفت. نتایج تخریب سلولی با استخراج DNA یکسان بوده است (۲۳). به منظور تخریب سلولها، ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی را با ۹۵ میکرولیتر بافت‌تخریب در یک لوله ۰/۲ میکرولیتری مخلوط کرده، سپس بمدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۹ درجه سانتی گراد داخل دستگاه ترموسایکلر حرارت داده شد. بافر تخریب همانند بافر ذکر شده در مورد ردیابی ژن *phlD* است.

مخلوط واکنش PCR: تکثیر در ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش که مقادیر حجمی آن در جدول ۲ آمده است، انجام گرفت (۲۳).

این ژن بود به عنوان شاهد مثبت و از بافر تخریب به عنوان شاهد منفی استفاده شد. لازم است تمام مراحل تهیه واکنش PCR روی یخ یا در جای خنک انجام گیرد.

برنامه حرارتی PCR: درب لوله‌های فوق (۰/۲ میلی-لیتری) بخوبی بسته شد و بعد از یک سانتریفیوژ کوتاه و با دور پایین در داخل دستگاه ترموسایکلر قرار گرفت، سپس برنامه سیکل حرارتی PCR (در ۳۰ چرخه) با ۵ درجه افزایش در دمای اتصال آغازگر بشرح زیر انجام گرفت (۳۳).

- ۹۴ درجه، ۲ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)، ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی ثانویه)، ۶۵ درجه، ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگر با رشته DNA)، ۷۲ درجه، ۱ دقیقه (بسط آغازگر)، ۷۲ درجه، ۱۰ دقیقه (بسط نهایی)

انجام PCR با آغازگرهای phIA-1f و phIA-1r: این آغازگرها که برای تکثیر ژن *phlA* طراحی شده‌اند ۲۰ جفت بازی بوده و قادرند قطعه‌ای بطول ۴۱۸ جفت باز را تکثیر کنند (۲۳). ردیف بازهای آغازگرها به صورت زیر است.

phIA-1f (forward) 5'- TCA GAT CGA AGC
CCT GTA CC-3'

جدول ۲- مقادیر حجمی هر یک از مواد به کار رفته در ترکیب مخلوط واکنش PCR با آغازگرهای phIA-1f و phIA-1r

مواد به کار رفته در واکنش	حجم در واکنش (میکرولیتر)
آب دو بار تقطیر استریل	۹/۳
بافر PCR 10x	۲
کلرید منیزیم (MgCl ₂) (۵۰ میلی‌مول)	۱
دی متیل سولفوکسید (DMSO) ۵٪	۱
مخلوط دی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs) (۱۰ میلی‌مول)	۰/۸
آغازگر phIA-1f (۱۰۰ پیکومول)	۰/۸
آغازگر phIA-1r (۱۰۰ پیکومول)	۰/۸
آنزیم Smar Taq (۵ واحد در هر میکرولیتر ۵ U/μl)	۰/۳
سلول متلاشی شده (cell lysate)	۴
حجم کل	۲۰

به منظور اطمینان از صحت آزمایش، در هر آزمایش از سویه CHA0 که دارای این ژن بود به عنوان شاهد مثبت و از بافر تخریب به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

برنامه حرارتی PCR: برنامه حرارتی برای واکنش PCR و تکثیر قطعات DNA با کمی تغییر در روش رزونیکو (۲۳) به صورت زیر تنظیم شد. این برنامه در ۲۵ چرخه انجام گرفت.

۹۴ درجه، ۵ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)، ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی ثانویه)، ۶۲ درجه، ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگر با رشته DNA)، ۷۲ درجه، ۴۵ ثانیه (بسط آغازگر)، ۷۲ درجه، ۵ دقیقه (بسط نهایی).

برنامه تکثیر ژن hcnAB با آغازگرهای PM₂ و PM₇-26R
26R: ۹۴ درجه، ۲ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)، ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی ثانویه)، ۶۷ درجه، ۳۰ ثانیه (اتصال آغازگر با رشته DNA)، ۷۲ درجه، ۱ دقیقه (بسط آغازگر)، ۷۲ درجه، ۱۰ دقیقه (بسط نهایی).

برای مشاهده محصول PCR، الکتروفورز با ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی باندهای DNA، ابتدا محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه شد. برای مشاهده محصول و ثبت تصویر آن، از دستگاه Gel-Documentation استفاده شد.

انجام PCR با آغازگرهای PM₂ و PM₇-26R برای ردیابی ژن hcnAB: بعد از تخریب سلولها PCR با استفاده از آغازگر مستقیم ۳۱ نوکلئوتیدی PM₂ و آغازگر معکوس ۲۶ نوکلئوتیدی PM₇-26R انجام گردید. این آغازگرها با استفاده از توالی توافقی hcn بین استرین CHA0 (کد دسترسی AF053760) و *Pseudomonas aeruginosa* (کد دسترسی AF208523) طراحی شده بودند (۳۱).

بررسی مولکولی استرین با استفاده از توالی نوکلئوتیدی 16S rRNA - تکثیر (PCR) 16S rRNA: استخراج DNA استرین UTPF5 براساس روش (۳۳) انجام گرفت. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر 16S rRNA از آغازگر مستقیم PS16f و آغازگر معکوس PS16r استفاده شد.

انجام PCR با آغازگرهای PM₂ و PM₇-26R برای ردیابی ژن hcnAB: بعد از تخریب سلولها PCR با استفاده از آغازگر مستقیم ۳۱ نوکلئوتیدی PM₂ و آغازگر معکوس ۲۶ نوکلئوتیدی PM₇-26R انجام گردید. این آغازگرها با استفاده از توالی توافقی hcn بین استرین CHA0 (کد دسترسی AF053760) و *Pseudomonas aeruginosa* (کد دسترسی AF208523) طراحی شده بودند (۳۱).

مخلوط PCR شامل اجزای زیر بود (حجم نهایی با آب مقطر سترون به ۳۵ میکرولیتر رسانده شد).

10X PCR buffer	3.5 μl
%5 Bovine serumalbomine	1.8 μl
%5 Dimethyl sulphoxide	1.8 μl
dNTP _s (2mM)	1.8 μl
PS16f / PS16r(Primers)	0.7 μl
Taq DNA Polymerase(5 $\frac{U}{ml}$)	0.5 μl
DNA lysate	5 μl

PM₂ (Forward)
 TGCGGCATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCTGG
PM₇-26R (Reverse)
 CCGCTCTTGACTGCAATTGCAGGCC

PCR در ۱۲ میکرولیتر شامل چهارمیکرولیتر از سوسپانسیون باکتری لایز شده، بافر PCR با مشخصات buffer, Amersham pharmacia, UPPsala, Sweden) (۱× PCR FLuka, Buchs, SG,) ، بوبین سرم آلبومین (

برنامه تکثیر 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای PS16f و PS16r (۸): ۹۴ °C، ۲/۵ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)،

نشاندار می‌باشد، جهت حذف این اجزا، خالص‌سازی به وسیله ستونهای DNA grade و SepHadex G-50 انجام شد. تعیین توالی با استفاده از دستگاه 3100 genetic Analyser ABI Prism® انجام شد. توالیهای به دست آمده توسط نرم‌افزار Sequencher package تحت سیستم مکینتاش (Macintosh) ویرایش گردیدند و برای مقایسه، از برنامه Molecular Evolutionary Genetics Analysis استفاده شد.

نتایج

تعیین MIC نانوذرات نقره بر UTPF5 - با افزایش غلظت نانوذرات نقره، کاهش معنی‌داری در میزان جذب، در طول موج ۶۰۰ نانومتر نسبت به شاهد در اکثر موارد مشاهده شده است. بیشترین اثر منفی بر میزان جذب باکتری در غلظت هشت میکرولیتر بر لیتر بوده است. نکته جالب توجه این است که غلظت ۰/۲۵ میکرولیتر بر لیتر سبب افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد، در میزان جذب شده، در نهایت نتایج حاصله نشان دادند که MIC نانوذرات نقره در مورد این باکتری ۰/۵ میکرولیتر بر لیتر است.

تعیین MBC نانوذرات نقره بر UTPF5 - همزمان با روند افزایش غلظت نانوذرات نقره، افزایش معنی‌داری نیز در میزان درصد بازدارندگی از تشکیل کلنی این جدایه مشاهده شد. کمترین غلظت که سبب کاهش در تعداد کلنیهای باکتریایی شد سه میکرولیتر بر لیتر بود، بیشترین اثر این غلظت در بازدارندگی از تشکیل کلنی در باکتری UTPF5، ۷۰/۶۳ درصد بود. نتایج نشان دادند که از رشد این جدایه در غلظتهای مختلف اعمال شده ۱۰۰ درصد جلوگیری شد.

اثر غلظتهای مختلف نانوذرات نقره بر تشکیل بیوفیلم در جدایه UTPF5 - غلظت هشت میکرولیتر بر لیتر بیشترین تأثیر را در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در این جدایه

۹۴ °C، ۳۰ ثانیه (واسرشته سازی ثانویه)، ۶۰ °C، ۱ دقیقه (اتصال آغازگر با رشته DNA)، ۷۲ °C، ۱ دقیقه (بسط آغازگر)، ۷۲ °C، ۱۰ دقیقه (بسط نهایی)

پس از انجام واکنش PCR، محصول بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در ۱۳۰ ولت بمدت ۲ ساعت انجام شد و باند مورد نظر در هر نمونه بریده و برای بررسیهای بعدی نگهداری شد.

خالص‌سازی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز: ای برای خالص کردن محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز از کیت Wisard SV Gel and PCR Clean-Up System kit of Promega (Madison, WI) استفاده گردید. باندهای بریده شده درون لوله های میکروسانتریفیوژ قرار داده شد و وزن قطعه ژل حاوی باند تعیین شد. به ازای هر ۱۰ میلی گرم قطعه ژل حاوی باند ۱۰ میکرولیتر محلول باند شونده به غشا اضافه شد، پس از سانتریفیوژ، در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد در حمام آبی قرار گرفت و هر دو دقیقه یکبار ورتکس شد تا قطعه ژل کاملاً حل شود.

واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت تعیین توالی: بدین جهت از کیت تعیین توالی Terminator V3-0 Cycle Sequencing Kit استفاده گردید. آغازگرها استفاده شده PS16r و PS16f بودند. مخلوط واکنش تعیین توالی شامل اجزای زیر بود:

<i>Big dye</i> ^(R) V3.1	0-8μl
Primer	1μ
<i>Big dye sequencing buffer</i> (5X)	2μ
<i>Purified PCR Product</i>	4.2μl
<i>ddH₂O</i> to	10μ

برنامه تکثیر 16s rRNA با آغازگرهای PS16r و PS16f
: ۹۵ درجه، ۱۰ دقیقه (واسرشته سازی اولیه)، ۵۰ درجه، ۵ دقیقه (۹۹ سیکل)، ۶۰ درجه، ۴دقیقه

تعیین توالی نمونه‌ها: محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت تعیین توالی دارای اجزای اضافی، از جمله مواد مصرف نشده واکنش، بخصوص نوکلئوتیدهای

تولید آنزیم لاکاز در حضور عصاره باکتری از غلظت ۱۵٪ و جدایه AG4 استفاده شد.

تأثیر شرایط محیطی در القای لاکاز توسط قارچ در مجاورت با عصاره باکتری یا کشت همزمان با باکتری:
 اثر pH- در بررسی اثر pH در القای آنزیم لاکاز در جدایه AG4 در کشت همزمان با باکتری UTPF5، بیشترین میزان تولید آنزیم لاکاز در pH= ۷/۵ اتفاق افتاد. نتایج تأثیر pH در کشت قارچ در مجاورت با عصاره آنتاگونیست، افزایش قابل توجهی در القای لاکاز در اکثر موارد نشان داد. فقط در pH ۷ و ۷/۵ در حضور عصاره باکتری میزان تولید آنزیم کاهش چشمگیری داشته و دارای اختلاف معنی‌دار با بقیه موارد بود.

اثر دما: دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کمترین تأثیر را در تولید آنزیم لاکاز توسط قارچ در کنار باکتری داشت. وزن خشک قارچ در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و در حضور باکتری بیشترین بود که در مقایسه با شاهد اختلاف معنی‌دار نبود. در محیط کشت حاوی عصاره باکتری در دماهای ۲۵ و ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد، عصاره میزان فعالیت آنزیم لاکاز را نسبت به شاهد افزایش دادند.

تأثیر عصاره کشت و سوسپانسیون باکتری در تفریح تخم نماتد: در تیمارهای عصاره باکتری بعد از ۲۴ ساعت هیچ کدام از تخمها تفریح نشدند. در حالی که در شاهد بین ۲۰-۸ درصد و در سوسپانسیون بین ۱۳-۸ درصد تخمها بعد از ۲۴ ساعت تفریح شدند. بین تیمار سوسپانسیون باکتری و شاهد بعد از ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ولی بعد از ۴۸ ساعت این دو نیز با هم اختلاف معنی‌دار داشته و کاهش درصد تفریح تخم در تیمار عصاره کشت نسبت به شاهد در ۲۴ و ۴۸ ساعت ۱۰ و ۳۵ درصد برآورد شد و سوسپانسیون باکتری نیز بعد از ۴۸ ساعت کاهش ۲۵ درصدی نسبت به شاهد نشان داد.

باکتریایی داشت اما نمی‌توان ادعا کرد که افزایش غلظت، سبب ایجاد روند افزایشی یا کاهشی مشخص و منظمی در تشکیل بیوفیلم شده است. افزایش غلظت نانوذرات نقره بر جدایه‌های مختلف تأثیرات متفاوت و معنی‌داری بر تشکیل بیوفیلم داشته است. در مورد باکتری UTPF5 روند افزایش در غلظت نانوذرات از ۰/۲۵ تا ۲ میکرولیتر بر لیتر سبب افزایش تشکیل بیوفیلم و از این غلظت به بعد روند کاهش در تشکیل بیوفیلم مشاهده شده است. در یک دید کلی غلظت دو میکرولیتر بر لیتر سبب افزایش تشکیل بیوفیلم در جدایه UTPF5 شده است.

اثر غلظتهای مختلف نانوذرات نقره در تولید آنزیم لپاز توسط جدایه باکتری UTPF5- در جدول تجزیه واریانس اثر متقابل باکتری و غلظتهای مختلف نانوذرات نقره، در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شده است. با افزایش غلظت نانوذرات نقره روند افزایشی در بازدارندگی از تولید آنزیم لپاز مشاهده شده است که در تمامی موارد اختلاف معنی‌داری با شاهد وجود دارد. بیشترین اثر بازدارندگی غلظت هشت میکرولیتر بر لیتر بوده و میزان درصد بازدارندگی در بیشترین حالت در UTPF5، ۹۷/۴۳ درصد بوده است. کمترین اثر منفی نانوذرات در جدایه باکتری در غلظت ۰/۵ میکرولیتر بر لیتر بوده است.

تأثیر غلظتهای مختلف عصاره باکتری بر تولید لاکاز و وزن خشک توده میسلیم AG4 R. solani- افزودن عصاره باکتری به محیط کشت جدایه قارچی، بر تولید آنزیم لاکاز توسط آنها تأثیر داشت و میزان تولید آنزیم در سه غلظت منتخب عصاره باکتری تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۱ درصد نشان داد. همچنین در میزان تولید آنزیم توسط جدایه قارچی نیز تفاوت معنی‌داری دیده شد. غلظت ۱۵ درصد عصاره باکتری در جدایه AG4 باعث تحریک تولید آنزیم بمیزان قابل قبولی شد. بدین منظور برای آزمایشات تأثیر متقابل اثر عوامل غیر زنده بر

گذاشتند. همچنین تعداد زیادی از لاروها در غلظت ۱۰۰ از عصاره باکتری بعد از اندکی حرکت منفی مرده بودند.

بررسی مقدار نفوذ لارو سن دو نماتد به ریشه‌های گیاه گوجه فرنگی: این آزمایش به صورت تیمار بذر با باکتری و استفاده از سوسپانسیون باکتری در خاک انجام گرفت. هر دو این تیمارها به طور معنی‌داری با شاهد اختلاف دارند، در حالی‌که خود این دو تیمار با هم اختلاف معنی‌دار ندارند. سوسپانسیون باکتری و تیمار بذر بترتیب باعث کاهش ۶۲ و ۵۵ درصدی نفوذ لارو به ریشه شدند.

کنترل نماتد *M. javanica* توسط باکتری *P. fluorescens* UTPF5 در شرایط گلخانه‌ای، شاخصهای رشد: تیمارهای مختلف باکتری اثرات معنی‌دار متفاوتی در ویژگیهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی، در صورت حضور یا عدم حضور نماتد نشان دادند (جدول ۳).

مقدار کلروفیل: در بررسی سنجش کلروفیل، مقدار کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید اندازه‌گیری شد و نتایج معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده شد (شکل ۱).

شاخصهای بیماری، شاخص گال: تیمار بذر با باکتری و نماتد به طور معنی‌داری از نظر شاخص گال با شاهد و کاربرد سوسپانسیون باکتری روی نشاء به‌مراه نماتد اختلاف داشتند. ولی با کاربرد عصاره و سوسپانسیون باکتری در خاک با نماتد اختلاف نداشتند و هر سه این تیمارها کاهش شاخص گال نسبت به شاهد را نشان دادند. کمترین شاخص گال مربوط به ضدعفونی بذر با باکتری، سوسپانسیون و عصاره باکتری در خاک بود.

تعداد گال روی سیستم ریشه‌ای: نتایج نشان داد تعداد گال در کل ریشه گیاه گوجه‌فرنگی در تیمار بذر با باکتری نسبت به شاهد و دیگر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشته و کاهش ۵۵ درصدی را باعث می‌شود. دیگر تیمارها تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند ولی باعث کاهش مقدار گال روی ریشه شدند. بترتیب در تیمار بذر با

تأثیر ترکیبات فرار باکتری در تفریح تخم نماتد: بعد از ۷۲ ساعت تخمهای نماتد که در معرض ترکیبات فرار قرار گرفتند هیچکدام تفریح نشدند در حالی‌که در شاهد ۸۰ درصد تخمها تبدیل به لارو شدند.

تأثیر عصاره کشت و سوسپانسیون باکتری روی مرگ و میر لاروهای سن دوم: از میان غلظتهای مختلف به کار برده شده از عصاره کشت باکتری، درصدهای ۵۰ و ۷۵ و ۱۰۰ بدون اختلاف معنی‌دار با هم بوده ولی عصاره ۱۰۰ درصد با عصاره ۲۵ درصد دارای اختلاف است و هر چهار غلظت با سوسپانسیون باکتری و شاهد دارای اختلاف معنی‌دار هستند. غلظتهای مختلف عصاره کشت باکتری بمقدار ۵۳-۳۴ درصد باعث افزایش مرگ و میر لاروها در شرایط آزمایشگاه نسبت به شاهد شدند. بعد از ۴۸ ساعت تمام لاروهایی که با عصاره کشت تیمار شده بودند مردند. همچنین لاروهایی که با غلظتهای مختلف عصاره تیمار شده بودند بعد از مرگ دچار تغییر شکل شده و بحالت دوکی شکل درآمدند.

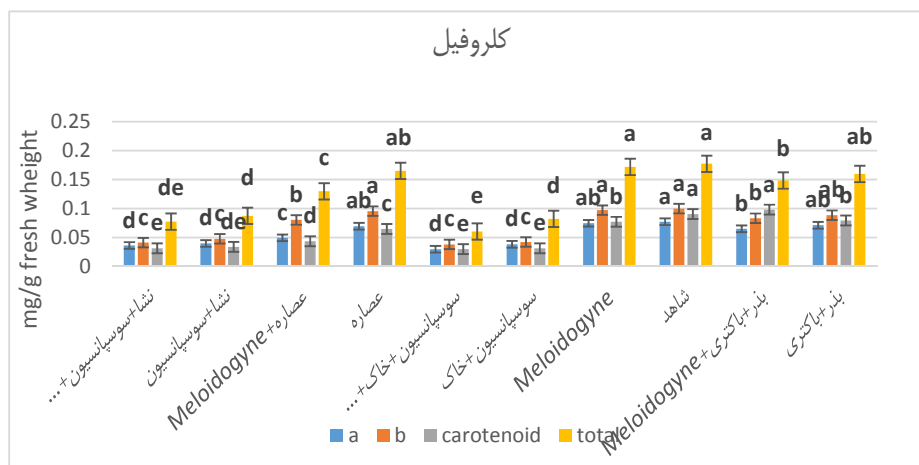
تأثیر ترکیبات فرار باکتری در مرگ و میر لارو نماتد: ترکیبات فرار باکتری باعث افزایش ۸۵ درصدی مرگ و میر لارو نماتد نسبت به شاهد شده و اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد نشان دادند.

بررسی تحرک و جلب لاروهای سن دو با عصاره و سوسپانسیون باکتری: سه غلظت ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ با هم اختلاف نداشتند و باعث حرکت منفی نماتد بسمت حاشیه پتری شدند. در حالی‌که در شاهد و سوسپانسیون حرکت منفی دیده نشد و لاروهای درون پتری بسمت مرکز پتری حرکت کرده و حرکات مارپیچی و بسیار زیادی را در روی محیط کشت بجا گذاشتند. در تیمارهای عصاره باکتری با غلظت ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰، لاروها علاوه بر حرکت منفی بسمت حاشیه پتری، دچار کاهش تحرک شده و حرکات بسیار ریز و کندی در روی محیط کشت از خود باقی

باکتری، کاربرد عصاره باکتری، سوسپانسیون باکتری و گال مشاهده شد. کاربرد سوسپانسیون روی نشاء بیشترین کاهش در تعداد

جدول ۳- شاخصهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تأثیر باکتری *P. fluorescens* UTPF5 در کنترل نماتد *M. javanica*

تیمار	وزن تر ریشه (g)	وزن تر ساقه (g)	وزن خشک ریشه (g)	وزن خشک ساقه (g)	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)	تعداد گل	تعداد میوه
Meloidogyne+نشاء+سوسپانسیون	۳۸/۳۷۵a	۸۵/۳۸b	۱/۹۱۷۵cd	۱۱/۸۱bc	۷۴/۲۵ab	۳۹/۵abc	۱۳/۵	۷/۵
نشاء+سوسپانسیون	۳۵/۳۳۳a	۹۰/۸۸b	۳/۹۵a	۱۲/۴۵۵ab	۸۵a	۳۲/۷۵ab	۱۲/۵	۰/۵
Meloidogyne+عصاره	۳۲/۱۴۳a	۱۰۰/۱۵ab	۱/۵۶۲۵cd	۱۲/۷۵ab	۶۸/۷۵abc	۳۰abc	۱۱/۲۵	۲/۲۵
عصاره	۳۸/۶۹۵a	۸۶/۱۳b	۳/۵۶۲۵ab	۱۴/۹۶۳ab	۷۵ab	۳۴/۷۵a	۱۵/۲۵	۱/۲۵
Meloidogyne+سوسپانسیون+خاک	۳۶/۴۴۵a	۱۲۲/۴۸a	۱/۹۷۷۵cd	۱۶/۰۷۵a	۷۷/۵ab	۲۷/۵bcd	۱۹/۷۵	۲/۲۵
سوسپانسیون+خاک	۳۹/۶۶۸a	۸۳/۳۱b	۲/۷۴۵bc	۱۲/۸۷۵ab	۸۲ab	۲۸/۲۵cd	۱۲/۵	۰/۷۵
Meloidogyne	۳۹/۴۷۸a	۹۳/۵۳b	۲/۳۵۷۵cd	۱۴/۸۳۳ab	۳۷/۷۵ab	۲۵/۵cde	۱۲/۵	۰
شاهد	۳۷/۵۴a	۷۹/۹۵bc	۲/۶۳۵bc	۱۱/۶۸۸bc	۶۶/۲۵bc	۲۹abcd	۱۱/۷۵	۰/۲۵
Meloidogyne+بذر+باکتری	۱۴/۴۳۵b	۵۵/۰۵cd	۱/۵۵۵cd	۸/۸۹۳dc	۸۰ab	۲۲/۷۵de	۱۱	۱/۲۵
بذر+باکتری	۱۲/۷۵۵b	۵۰/۲۵d	۱/۳۷۷۵d	۷/۷۹d	۵۶/۷۵c	۲۰/۲۵e	۶/۵	۱/۷۵



شکل ۱- سنجش کلروفیل، مقدار کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید در تیمارهای مختلف

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)؛ ردیابی ژن *phlD* به وسیله PCR: با استفاده از تکنیک PCR و دو آغازگر *phl2a* و *phl2b* قطعه‌ای از DNA بطول ۷۴۵ جفت باز تکثیر شد. جدایه UTPF5 دارای ژن *phlD* بود که با سویه CHA0 که واجد این ژن بود مقایسه شد. جهت تخمین اندازه فرآورده‌های تکثیرشده در PCR، از نشانگر ژنومی یک کیلو جفت بازی (gene ruler 1kbp DNA ladder) استفاده شد.

تعداد تخم روی سیستم ریشه‌ای: تیمارهای ضد عفونی بذر و استفاده از عصاره باکتری اختلاف معنی‌داری در کاهش تعداد کل تخم نماتد در روی سیستم ریشه‌ای نسبت به شاهد داشتند. استفاده از سوسپانسیون باکتری چه در خاک و چه روی نشاء باعث کاهش تعداد تخم نماتد بمقدار قابل توجهی شد ولی با شاهد که نماتد بنهایی بود اختلاف معنی‌داری نشان نداد. ضد عفونی بذر و عصاره بترتیب کاهش ۷۱ و ۴۲ درصدی در تعداد تخم نسبت به شاهد نشان دادند.

ضدباکتریایی قوی‌تری بر روی باکتریهای گرم منفی نسبت به باکتریهای گرم مثبت از خود نشان داده‌اند و این گونه بیان کردند که این مسئله ممکن است مربوط به نازک‌تر بودن لایه پپتیدوگلیکان باشد. به طوری که در این تحقیق نیز مشاهده شد با بررسی گروه‌های آماری چهار جدایه و مقایسه روند کاهش جمعیت، کمترین اثر منفی نانوذرات در بین جدایه‌ها روی باکتری گرم مثبت باسیلوس و بیشترین آن در مورد سه جدایه گرم منفی دیگر اعمال شده است. نکته جالب توجه این است که جمعیت باکتریها در سه جدایه UTPf5 و UTPf68 و *Bacillus subtilis* در غلظت ۰/۲۵ میکرولیتر بر لیتر در مقایسه با نمونه شاهد افزایش یافته است.

نانوذرات نقره دارای سمیت زیادی در غلظتهای پایین بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی هستند در استفاده از این مواد حساسیت و دقت بیشتری به کار رود که البته با توجه به نتایج حاصل از مرحله گلخانه در کنترل پاتوژن توسط نانوذرات نقره و عدم کنترل این قارچ با وجود استفاده از روشهای مختلف، این احتمال را می‌توان در نظر گرفت که همانند قارچ، این ترکیب روی باکتریهای مفید ریزوسفر نیز بی‌تأثیر باشد. که البته نتایج حاصل از تحقیقات (۲۶)، نشان داده است که حضور نانوذرات در خاک تأثیر معنی‌داری بر CFU میکروارگانیزم‌ها و همچنین بر کل فعالیت متابولیکی جمعیت موجود در خاک نداشته است.

به منظور تعیین MIC نانوذرات نقره در جدایه باکتریایی UTPf5، UTPf68، *B. subtilis* و *Xanthomonas campestris pv malvacearum* در شرایط آزمایشگاهی بیشترین اثر منفی بر میزان جذب باکتریها در غلظت هشت میکرولیتر بر لیتر بوده و کمترین و بیشترین اثر منفی در این غلظت بترتیب مربوط به جدایه‌های *B. subtilis* و UTPf5 بود. در تعیین MBC نانوذرات نقره در این چهار جدایه در شرایط آزمایشگاهی، کمترین غلظت که سبب کاهش در

ردیابی ژن *phlA* به وسیله PCR: با استفاده از تکنیک PCR و دو آغازگر *phlA-1f* و *phlA-1r* قطعه‌ای از DNA بطول ۴۱۸ جفت باز تکثیر شد. جدایه UTPF5 دارای ژن *phlA* بود که با سویه CHA0 که واجد این ژن بود، مقایسه شد. جهت تخمین اندازه فرآورده‌های تکثیر شده در PCR، از نشانگر ژنومی ۱۰۰ جفت بازی (gene ruler 100bp) استفاده شد.

ردیابی ژن *hcnAB* توسط واکنش زنجیره ای پلی مرارز (PCR): قطعه DNA با طول تقریبی ۵۷۰ جفت باز از دسته ژنی مسئول سنتز سیانید هیدرژن (hcnABC)، با استفاده از تکنیک PCR و توسط دو آغازگر PM2 و-PM7 و 26R تکثیر شد. این قطعه DNA شامل ۱۳۶ جفت باز از ژن *hcnA* (که دارای ۳۱۲ نوکلئوتید می باشد) و ۴۳۴ جفت باز از ژن *hcnB* (که دارای ۱۴۰۴ نوکلئوتید است) می باشد (۳۱). نتیجه این آزمایش نشان داد سویه UTPF5، واجد ژن *hcnAB* هست.

بررسی مولکولی سویه بر اساس 16S rRNA، تکثیر DNA توسط PCR: نتایج حاصل از تکثیر DNA ژنومی با استفاده از دو آغازگر PS16Sf و PS16Sr بر روی ژل آگاروز قابل رویت بود که تکثیر بخشی از ژنوم بطول تقریبی ۱۵۰۰ جفت باز را در سویه UTPF5 نشان داد.

تعیین توالی نمونه‌ها و آنالیز توالی‌ها: در این پژوهش 16S rRNA در سویه UTPF5 تعیین توالی شد و با توالی CHA0 در بانک ژن مقایسه شد. طول توالی نوکلئوتیدی در این سویه حدود ۱۴۵۰ نوکلئوتید بود. سویه UTPF5 حدود ۹۸ درصد با سویه CHA0 در توالی 16S rRNA شباهت داشتند.

بحث

اثر نانوذرات نقره بر باکتریها تا حد زیادی به غلظتهای مورد استفاده و نیز جنس دیواره باکتریایی وابسته است. در تحقیق انجام شده توسط (۱۲)، محلول یونهای نقره فعالیت

تولید آنزیم کاهش پیدا نکرد بلکه میزان تولید آن در روز سوم به طور معنی‌داری بیش از شاهد شد. پس حضور سلولهای باکتری در روزهای ۶ و ۱۰ و ۱۵ تولید آنزیم را کاهش داده و بنظر می‌رسد حضور سلول باکتری در کشتهای قارچ کلا تولید آنزیم را کاهش داده و می‌تواند مانعی برای بروز مقاومت در قارچ نسبت به این دو سویه باشد.

در این تحقیق نشان داده شد که تیمار بذر با باکتری سودوموناس فلورسنت سویه UTPF5 باعث تغییر ترشحات ریشه گیاه گوجه‌فرنگی و دفع لاروها از این ریشه‌ها و جذب بسمت ریشه‌های بدون باکتری و شاهد شدند و ریشه‌های تیمار شده با باکتری قطورتر شدند. همچنین عصاره کشت باکتری باعث کاهش قدرت حرکت نماتد در محیط و دور شدن آن از محیط غذایی و ریشه می‌شود. در مورد تأثیر ریزوباکتریها در الگوی حرکت نماتدها تحقیقات محدودی انجام گرفته است؛ جهت‌گیری سودوموناس فلورسنت بخوبی جهت‌گیری سویه CHA0 بود (۱۸).

سویه UTPF5 تولید سیدروفور و آنتی‌بیوتیک کرده و باعث افزایش رشد گیاه گوجه‌فرنگی می‌شود. خیلی از گونه‌های سودوموناس باعث افزایش رشد گیاه شده (PGPR) و تولید سیدروفورهای کلاته‌کننده آهن، آنتی-بیوتیکها یا سیانید هیدروژن می‌کنند و این ترکیبات در کاهش میکروارگانیسم‌های پاتوژن و مضر کاربرد دارند و یک محیط مناسب برای رشد ریشه را فراهم می‌کنند (۱۷).

سوسپانسیون و عصاره باکتری از تفریح تخم نماتد جلوگیری کرده و درصد مرگ و میر لارو سن دوم را نیز افزایش داد. ولی مقدار جلوگیری از تفریح تخم در عصاره باکتری ۳۵ درصد و افزایش مرگ و میر لارو در آن ۵۳-۳۴ درصد اندازه‌گیری شد. تأثیر بی‌نظیر عصاره کشت باکتری بر روی لاروها می‌تواند بر اثر متابولیت آنتی میکروبی

کلنیهای باکتریایی شد سه میکرولیتر بر لیتر بود، که البته میزان تأثیر آن روی جدایه‌های مختلف، متفاوت و بیشترین اثر این غلظت در بازدارندگی از تشکیل کلنی در باکتریهای *B. subtilis*، *X. campestris* و UTPF5 و UTPF68 بترتیب از راست به چپ با درصدهای ۸۳/۷۶، ۷۸/۰۵، ۷۰/۶۳ و ۶۶/۱۷ بود. غلظت هشت میکرو لیتر بر لیتر بیشترین تأثیر را در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در این چهار جدایه باکتری داشته است اما نمی‌توان بیان کرد که افزایش غلظت، سبب ایجاد روند افزایشی یا کاهشی مشخص و منظمی در تشکیل بیوفیلم شده است. در بررسی اثر غلظت نانوذرات نقره در تولید آنزیم لیباز در جدایه باکتری UTPF5 و UTPF68 در شرایط آزمایشگاه، بیشترین اثر بازدارندگی در هر دو جدایه مربوط به غلظت هشت میکرولیتر بر لیتر و بیشترین میزان درصد بازدارندگی بترتیب در مورد دو جدایه ۹۷/۴۳ و ۱۰۰ درصد بوده است. غلظتهای مختلف نانوذرات نقره در تولید آنزیم لاکاز در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شده است که بیشترین بازدارندگی در تولید آنزیم در غلظت یک میکرولیتر بر لیتر اعمال شده است.

نتایج نشان داد که اثر باکتری‌کشی نانوذرات نقره هم به غلظت این ذرات و هم به جمعیت اولیه باکتریها وابسته است. تولید انواع اکسیژن فعال و همچنین آسیب به دیواره سلول باکتریایی دو مکانیزم فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره هستند.

یک روش احتمالی برای کاهش تولید لاکاز در *R. solani* در تقابل با سویه‌های آنتاگونیست و در نتیجه احتمال موفقیت بیشتر بیوکنترل در برابر مقاومت قارچ، تغییر شرایط محیطی و استفاده از محدودکننده‌های تولید آنزیم است (۶). در کشت همزمان قارچ با هرکدام از دو سویه آنتاگونیست در روزهای ۶ و ۱۰ و ۱۵ مقدار تولید آنزیم به طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت. در کشت قارچ در مجاورت عصاره سویه‌های آنتاگونیست نه تنها

کاهش ۵۵ و ۶۲ درصدی نفوذ به ریشه گوجه‌فرنگی شد. که این نتایج می‌تواند بدلیل افزایش رشد گیاه و مقاومت آن، همچنین کاهش جلب نامات‌ها بسمت ریشه و حتی دور شدن آن‌ها بدلیل تغییر عصاره ریشه و کاهش تحرک لاروها ایجاد شده باشد.

سویه UTPF5 باکتری سودوموناس فلورسنت در تیمار پاشش سوسپانسیون روی خاک تأثیر زیادی در شاخصهای رشدی گیاه داشت. در حالی‌که تیمارهای بذر و عصاره شاخصهای بیماری را بشدت کاهش دادند. در نتیجه فرموله کردن این باکتری در کنترل نماتد گره ریشه گوجه‌فرنگی بسیار مناسب است.

نانوذرات نقره دارای سمیت زیادی در غلظتهای پایین بر روی باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی هستند در استفاده از این مواد حساسیت و دقت بیشتری به کار رود که البته با توجه به نتایج حاصل از مرحله گلخانه در کنترل پاتوژن توسط نانوذرات نقره و عدم کنترل این قارچ با وجود استفاده از روشهای مختلف، این احتمال را می‌توان در نظر گرفت که همانند قارچ، این ترکیب روی باکتریهای مفید ریزوسفر نیز بی‌تأثیر باشد. البته نتایج حاصل از تحقیقات شاه و همکاران (۲۶)، نشان داده است که حضور نانوذرات در خاک تأثیر معنی‌داری بر CFU میکروارگانیسم‌ها و همچنین بر کل فعالیت متابولیکی جمعیت موجود در خاک نداشته است.

به منظور تعیین MIC نانوذرات نقره در جدایه باکتریایی UTPf5، UTPf68، *B. subtilis* و *X. campestris pv malvacearum* در شرایط آزمایشگاهی بیشترین اثر منفی بر میزان جذب باکتریها در غلظت هشت میکرولیتر بر لیتر بوده و کمترین و بیشترین اثر منفی در این غلظت بترتیب مربوط به جدایه‌های *B. subtilis* و UTPf5 بود. در تعیین MBC نانوذرات نقره در این چهار جدایه در شرایط آزمایشگاهی، کمترین غلظت که سبب کاهش در کلنیهای باکتریایی شد سه میکرولیتر بر لیتر بود، که البته میزان تأثیر

DAPG باشد. متابولیت آنتی میکروبی ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول و پیولوتورین به توانایی سودوموناس فلورسنت سویه CHA0 برای کنترل بیماری‌های گیاهان که توسط پاتوژن‌های خاکزاد کمک می‌کند.

بر اساس تحقیقات پیکتی‌تار (۲۱) نشان داده شد که باکتری *P. fluorescens CHA0* فعالیت ضدحشره‌ای داشته و توکسین حشره‌کشی به نام fit برای فعالیت حشره‌کشی این باکتری یافت شد. در نتیجه وجود این توکسین باعث تغییر شکل لاروهای حشرات و ملانیزه شدن آن‌ها شد. که این نتیجه را می‌توان با دوکی شدن لاروهای سن دو نماتد *M. javanica* که در معرض عصاره باکتری در این تحقیق قرار گرفتند مقایسه کرد. در این تحقیق لاروها بعد از تیمار با عصاره باکتری تغییر شکل داده و دوکی شکل شدند، که علت این حالت می‌تواند توکسین fit باشد. در حالی‌که زمانی که سیدروفور خالص به کار رفت لاروها مردند ولی تغییر شکل در آن‌ها مشاهده نشد.

بر اساس نتایج گلخانه‌ای نیز عصاره کشت باکتری سودوموناس فلورسنت UTPF5 نقش بسیار مهمی در کاهش تعداد گال در سیستم ریشه‌ای داشته و مقدار گال را پایین آورده و علاوه بر آن با افزایش وزن تر و خشک و طول ریشه باعث مقاومت گیاه نیز شد. همچنین عصاره کشت باکتری تعداد تخم نماتد *M. javanica* بر روی کل سیستم ریشه‌ای گیاه را بمقدار ۴۲ درصد کاهش داد. همچنین نتایج نشان داد کاربرد باکتری به صورت پوشش دهنده بذر باعث کمترین تعداد گال روی ریشه و کاهش ۵۵ درصدی نسبت به شاهد و کمترین تعداد تخم نماتد بر روی سیستم کل ریشه و کاهش ۷۱ درصدی نسبت به شاهد شد و پایین‌ترین مقدار شاخص گال را دربرگرفت. بعد از این دو تیمار، کاربرد سوسپانسیون باکتری به صورت پاشش روی خاک سهم بسزایی در کاهش شاخصهای بیماری داشت. در این تحقیق آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد دو تیمار بذر و پاشش سوسپانسیون در خاک بترتیب

غلظت‌های مختلف نانوذرات نقره در تولید آنزیم لاکاز در سطح ۰/۰۱ درصد معنی‌دار شده است که بیشترین بازدارندگی در تولید آنزیم در غلظت یک میکرولیتر بر لیتر اعمال شده است.

نتایج نشان داد که اثر باکتری‌کشی نانوذرات نقره هم به غلظت این ذرات و هم به جمعیت اولیه باکتریها وابسته است. تولید انواع اکسیژن فعال و همچنین آسیب به دیواره سلول باکتریایی دو مکانیزم فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات نقره هستند.

بطور کلی این سویه *UTPF5 P. fluorescens* اثرات بیوکنتری بسیار خوبی نشان داد و ویژگیهای مولکولی آن نیز از طریق ردیابی ژنهای مهم مورد بررسی قرار گرفت.

آن روی جدایه‌های مختلف، متفاوت و بیشترین اثر این غلظت در بازدارندگی از تشکیل کلنی در باکتریهای *X. B. subtilis, campestris* و *UTPF5* و *UTPF68* بترتیب از راست به چپ با درصدهای ۸۳/۷۶، ۷۸/۰۵، ۷۰/۶۳ و ۶۶/۱۷ بود. غلظت هشت میکرو لیتر بر لیتر بیشترین تأثیر را در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم در این چهار جدایه باکتری داشته است اما نمی‌توان بیان کرد که افزایش غلظت، سبب ایجاد روند افزایشی یا کاهش می‌شخص و منظمی در تشکیل بیوفیلم شده است. در بررسی اثر غلظت نانوذرات نقره در تولید آنزیم لیپاز در جدایه باکتری *UTPF5* و *UTPF68* در شرایط آزمایشگاه، بیشترین اثر بازدارندگی در هر دو جدایه مربوط به غلظت هشت میکرو لیتر بر لیتر و بیشترین میزان درصد بازدارندگی بترتیب در مورد دو جدایه ۹۷/۴۳ و ۱۰۰ درصد بوده است.

منابع

- Alcals L. A. 2007. Characterization and efficacy of bacterial strains for biological control of soil borne diseases caused by *Phytophthora cactorum* and *Meloidogyne javanica* on rosaceous plants. Doctoral thesis. Universitate de Girona, 152.
- Arnon, D. 1994. Copper enzymes in isolated chloroplasts: Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: 1-10.
- Bagheri, N., Ahmadzadeh, M and Heydari, R. 2014. Effects of *Pseudomonas fluorescens* strain *UTPF5* on the mobility, mortality and hatching of root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 47(6): 744 – 752.
- Bollag, J and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccase. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 849-854.
- Bora, P. 2003. Production of laccase by phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. 165.
- Crow, J.D and Olsson, S. 2001. Induction of laccase activity in *Rhizoctonia solani* by antagonistic *Pseudomonas fluorescens* strains and a range of chemical treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2088-2094.
- Fernando, W. G. D., Ramarathnama, R., Krishnamoorthy, A. S and Savchuka, S. C. 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 955-964.
- Frapolli, M., Defago, G and Moenne – Loccoz, M. 2007. Multilocus sequence analysis of biocontrol fluorescent *Pseudomonas* spp. producing the antifungal compound 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Environment Microbiology*. 9: 1939 – 1955.
- Fravel, D.R. 2005. Commercialization and implementation of biocontrol Annual Review of *Phytopathology*, 43: 337-359.
- Hussey, R.S and Jansen, G.J.W. 2002. Root-knot nematodes: *Meloidogyne* species. 43-70. in: Starr, J.L., Cook, R and Bridge, J. (Eds.). *Plant resistance to parasitic nematodes*. CAB International, Wallingford.
- Hussey, R. S and Barker, K. R. 1973. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. *Plant Disease Report*. 57: 1025-1028.
- Jung, W.K., Koo, H.C., Kim, K.W., Shin, S., Kim, S.H and Park, Y.H. 2008. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *staphylococcus aureus* and *Escherichia*

- coli. Applied and Environment Microbiology. 74: 2171-2178.
- 13- Liu, H., Pan, X., Zhang, X and J. Wang. 1995. Experiments on *Bacillus* strain producing antagonistic protein. Chines Journal of Biology. 11:160-164.
 - 14- Loper, J.E and Lindow, S.E. 1997. Reporter gene systems useful in evaluating *in situ* gene expression by soil and plant associated bacteria in: Manual of environmental microbiology. Hurst, C.J., Knudsen, G.R., Mc Inervy, M.J., Stetzenbach, L.D and Walter, M.V. (eds). ASM press, Washington DC. 482-492.
 - 15- Lutz, M.P., Wenger, S., Maurhofer, M., Defago, G and Duffy, B. 2004. Signaling between bacterial and fungal biocontrol agents in a strain mixture. FEMS Microbiology Ecology. 48: 447-455.
 - 16- Maurhofer, M., Bachler, E., Notz, R., Marthez, V and Keel, C. 2004. Cross talk between 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing biocontrol pseudomonads on wheat rhizosphere. Applied Microbiology Ecology. 70: 1990-1998.
 - 17- Nasima, I. A., Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S and Zaki, M. J. 2002. Nematicidal activity of some strains of *Pseudomonas* spp. Soil Biology and Biochemistry 34: 1051-1058.
 - 18- Neidig, N., Rüdiger J. P., Scheu, S and Jousset, A. 2011. Secondary metabolites of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 drive complex non-trophic interactions with bacterivorous nematodes. Microbecology 61: 853-859.
 - 19- Notz, R. 2002. Biotic factors affecting 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the model strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Ph.D thesis. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich.
 - 20- Notz, R., Maurhofer, M., schnider keel, U., Duffy, B., Haas, D and Defago, G. 2001. Biotic factors affecting expression of the 2, 4 diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. Phytopathology. 91: 873-881.
 - 21- Péchy-Tarr, M., Bruck, D. J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, Ch., Henkels, M. D., Donahue, K. M., Grunder, J., Loper, J. E and Keel, Ch. 2008. Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. Environmental Microbiology 10(9): 2368-2386.
 - 22- Raaijmakers, J. M., Weller, D.M and Thomashow, L. S. 1997. Frequency of antibiotic – producing *Pseudomonas* sp. In natural environments. Applied Environment Microbiology. 63: 881 – 887.
 - 23- Rezzonico, F., Moënne-Loccoz, Y and Defago, G. 2003. Effect of stress on the ability of a *phlA*-based quantitative competitive PCR assay to monitor biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Applied Environment Microbiology. 69: 686-690.
 - 24- Riga, E and Webster, J.M. 1992. Use of sex pheromones in the taxonomic differentiation of *bursaphelenchus* spp. (Nematoda), pathogens of pine trees. Nematologica. 38: 133-145.
 - 25- Savoie, J.M., Mata, G and Mamoun, M. 2001. variability in brown line formation and extracellular laccase production during interaction between white rot basidiomycetes and *Trichoderma harzianum* biotype Th2. Mycologia. 93: 243-248.
 - 26- Shah, V and Belozerova, I. 2008. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of Lettuce seeds. Water Air Soil Pollut.
 - 27- Shahrokh, S and Emtiazi, G. 2009. Toxicity and unusual biological behavior of nanosilver on gram positive and negative bacteria assayed by Microtiter-plate. European Journal of biology Science. 1: 28-31.
 - 28- Siddiqui, I. A and Shaukat, S. S. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylphloroglucinol. Soil Biology and Biochemistry 35: 1615-1623.
 - 29- Siddiqui, I. A and Shaukat, S. S. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. Journal of phytopathology. 152: 48-54.
 - 30- Siddiqui, I. A., Zaki, A., Qureshi, A and Akhtar, M. S. 2009. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*. Archives of Phytopathology and Plantprotection 42(12): 1154 -1164.
 - 31- Svercel, M., Duffy, B and Defago, G. 2007. PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnAB* in *Pseudomonas* spp. Journal Methods. 70: 209- 213.

- 32- Wahleithner, J.A., Xu, F., Brown, K.M., Brown, S.H., Golightly, E.J., Halkier, T., Kauppinen, S., Pederson, A and Schneider, P. 1996. The identification and characterization of for laccase from the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Curr Genet*. 29: 395-403.
- 33- Wang, C., Ramette, A., Pungasamarwong, P., Natsch, A., Moenne Loccoz, Y and De'fago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD* – containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiology Ecology*. 37: 105-116.
- 34- Zhang, H., Hong, Y.Z., Xiao, Y.Z., Yuan, J., Tu, X.M and Zhang, X.Q. 2006. Efficient production of laccase by *trametes* sp. AH28-2 in cocultivation with a *trichoderma* strain, *Applied Microbiology Biotechnology*. 73: 89-94.

Assessment of molecular and biological properties of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 biological agent of *Meloidogyne javanica* in tomato

Bagheri N.¹, Ahmadzadeh M.¹, Afsharmanesh H.² and Saberbaghban Z.¹

¹ Plant Protection Dept., University of Tehran, Tehran, I.R. of Iran

² Atomic Energy Organization of Iran, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

In this study, the biological and molecular features of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 is evaluated as an important bacterial in IRAN. Effect of silver nanoparticles, effect of bacteria on laccase and also molecular aspect of UTPF5 (detection of *phlD*, *phlA* and *hcnAB* genes) examined. In this research, biocontrol ability of *Pseudomonas fluorescens* UTPF5 was studied on the root knot nematode *Meloidogyne javanica* in tomato Also inhibition of nematode pathogenicity is determined. Bacterial extract, suspension and volatile causes 35%, 25% and 85% reduction in nematode egg hatching respectively. J2 mortality induces 34-53% and 85% in effect of bacterial extract and volatile respectively, whereas suspension has no effect in j2 mortality. Biofilm formation is promoted by 0/25-2 μ L silver nanoparticle. The strain UTPF5 has *phlD*, *phlA* and *hcnAB* genes. Culture filtrate of bacteria effected laccase enzyme significantly. Considering the disease measurement following seed treatment with the bacterium, gall index, the number of galls and all eggs in root system were considerably reduced. Biocontrol potential and plant growth promotion is described by application of the bacterium in greenhouse trials. Generally UTPF5 has good biocontrol effect and also molecular features study with detection important genes.

Key words: laccase, root knot nematode, silver nanoparticle