# 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 زیست شناسی

[۲] سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

[۳] سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سبزوار، گروه دامپزشکی

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۳

## چکیده

از مهم ترین بیماریهای چغندرقند، 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 فلورسنت در فراریشه مزارع چغندرقند سبزوار و بررسی توان بازدارندگی این باکتریها از رشد قارچ *R. solani*، ردیابی ژن بیوسنتز 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 فلورسنت براساس مطالعات میکروسکوپی و آزمونهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی تفکیک و شناسایی شدند. برای بررسی میزان بازدارندگی جدایه-های سودوموناس فلورسنت 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 بیوسنتز سیدروفور با PCR در این باکتریهای سودوموناس فلورسنت نشان داد که تنها نمونه C7 واجد ژن بیوسنتز سیدروفور می باشد.

**واژه های کلیدی:** پوسیدگی ریشه، چغندرقند، سودوموناس فلورسنت، قارچ *R. solani*.

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

## مقدمه

یکی از مهم ترین بیماریهای چغندر قند، پوسیدگی ریشه می باشد (۱۱) و قارچهای بیماریزای زیادی باعث ایجاد آن می شوند. در این میان، قارچهای ریزوکتونیا و گونه معروف آن به نام *Rhizoctonia solani* که در خاک زندگی می‌کند، به ریشه چغندرقند حمله کرده و شبکه‌هایی از رشته‌های به‌هم پیچیده و به رنگ قهوه‌ای مایل به ارغوانی در سطح ریشه به‌وجود می‌آورد.گاهی این رشته‌ها تمام سطح ریشه را می‌پوشانند و باعث قطع آوندهای آبکش و باعث توقف فعالیتهای حیاتی گیاه می‌شود (۲۵). در واقع پاتوژن تحت تأثیر ترشحات ریشه میزبان شروع به فعالیت می کند 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 می شود. 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

(PH پایین تر از ۵/۶) ظاهر نمی شود (۱۰). علائم رایزوکتونیا به صورت سوختگی برگها، پژمردگی ناگهانی بسیاری از برگها، سیاه شدن برگها، مرگ آنها و پهن شدن آنها در اطراف طوقه می باشد (۲۱).

یک راه کنترل بیمارگرهای خاکزاد، مبارزه شیمیایی، استفاده از قارچ کشهای سیستمیک وآنتی بیوتیکها 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 می کاهد. بدین جهات، کنترل بیولوژیک از اهمیت زیادی برخوردار می باشد (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 زی علاوه 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 می نامند و انواع ریزوباکتریهایی که بر روی رشد و عملکرد گیاه اثرات مثبت دارند را اصطلاحاً ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه ( PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) می نامند. سازوکارهای متعددی برای توضیح چگونگی تأثیر باکتریهای افزاینده رشد گیاه بر رشد و نمو گیاهان شناخته شده است که این سازوکارها را می توان 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 تعدیل کننده رشد و توسعه گیاه، تولید انواع ویتامینها، تولید سیدروفورهای کلاته کننده آهن و محلول ساختن فسفات باعث تحریک و افزایش رشد گیاهان می شوند. در حالت غیر مستقیم، با استفاده از مکانیسمهای مختلف آنتاگونیستی اثرات مضر بیمارگرهای گیاهی را خنثی یا تعدیل نموده و بدین طریق موجب افزایش رشد گیاه می شوند. رقابت برای جذب مواد و اشغال جایگاههای مناسب برای فعالیت پاتوژنها، تولید آنتی بیوتیک، آنزیمهای لیتیک و تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن از مهم ترین مکانیسمهای مورد استفاده در این روش می باشند که در اکثر موارد باکتری محرک رشد از طریق بیش از یکی از سازوکارهایی که ذکر گردید فعالیت می کند (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 شده اند. این باکتریها بیشتر به دلیل تحریک رشد گیاه و نیز به لحاظ توان کنترل عوامل بیماریزای گیاهی مورد توجه قرار گرفته اند. در بین انواع این گروه، سودوموناس های فلورسنت اهمیت ویژه ای دارند و سودوموناس های 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 پیووردین 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

گرفته است. بعضی از جدایه ها موجب افزایش رشد و سلامتی گیاه شده و در نتیجه موجب کاهش کاربرد مواد شیمیایی در کشاورزی می شوند. همچنین سودوموناس فلورسنت یکی از چندین گونه باکتریایی معمول است که جهت کنترل بیماریها در فیلوسفر گیاهان به کار رفته است. تعدادی از جدایه های این باکتری نیز باعث تجزیه بیولوژیکی ترکیبات طبیعی یا ترکیبات سمی تولید شده توسط انسان می شوند و در گیاهان متعددی به صورت اپی فیت زندگی می کنند. 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 پاخورهٔ 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 می دهد که کاربرد سودوموناس ها همراه بذور سبب محافظت آنها و گیاهان در مقابل عوامل بیماریزای خاکزی شده و در نتیجه افزایش محصول را به دنبال دارد (۵).

اغلب سودوموناس های جدا شده از خاک با جلوگیری از رشد عوامل بیماریزا در اثر تولید موادی نظیر آنتی بیوتیک، 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 می شوند (۲). باکتریهای سودوموناس در شرایط کمبود $Fe^{3+}$ در محیط با تولید مقدار زیادی از سیدروفورهای اختصاصی مانند سودوباکتین، پایووردین و پایوکلین و ... باعث جذب آهن و برخی دیگر از عناصر ریزمغذی نظیر روی شده لذا این موجودات را با کمبود شدید آهن روبرو ساخته و از فعالیت باز می دارند (۲۰).

با توجه به اهمیت اقتصادی چغندرقند، پتانسیل بالای بیماریزایی گونه های 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 بیوسنتز 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 چغندرقند جوین و خوشاب سبزوار با آلودگی به قارچ *R. solani* جمع آوری گردید. نمونه های هر مزرعه جهت رسیدن به کل میکروارگانیسم ها 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 آگارF انجام شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، پرگنه های رشد یافته از لحاظ شکل ظاهری کلنیها، قطر و هاله کلنیها، رنگ و اندازه کلنی بررسی شدند. در مرحله بعد پرگنه ها مجدداً جهت خالص سازی روی محیط سودوموناس آگارF رشد داده شدند و تا زمان رسیدن به تک کلنی واکشت انجام شد.

برای شناسایی سودوموناسهای فلور سنت، ۱۰ آزمون افتراقی براساس روش برگی انجام شد (۱۲). واکنش گرم، آزمون رشد هوازی و بیهوازی، ذوب ژلاتین، آزمون استفاده ازسیترات، آزمون کاتالاز، ایندول، احیاء نیترات، تست مقاومت به کانامایسین، آزمون اکسیداز، تست MR-VP، تولید $H_2S$ درجدایه های 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 ۱×۱×۱سانتیمتر از چغندرهای سالم و آلوده جدا شد. بعد از استریل کردن، نمونه ها به صورت مجزا در وسط تشتک پتری حاوی محیط کشت قرار گرفتند و به مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد 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 سابورودکستروزآگار، مولر هینتون آگار و دکستروزآگار (PDA) استفاده شد.

برای بررسی میزان بازدارندگی جدایه های 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 ۰/۵*۰/۵ 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 سانتی گراد 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 میسلیوم قارچ در حضور باکتری اندازه گیری شد. همچنین درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید. داده های 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.

رابطه ۱ :

$$\text{درصد بازداری} = \frac{\text{قطر میسلیوم رشد یافته در تشتک تیمار} - \text{قطر میسلیوم رشد یافته در تشتک شاهد}}{\text{قطر میسلیوم رشد یافته در تشتک شاهد}} \times ۱۰۰$$

**استخراج DNA و آزمون PCR:** استخراج DNA از باکتریهای سودوموناس فلورسنت شناسایی شده به روش جوشاندن با KOH 5% به این صورت انجام شد که ابتدا مقدار ۵۰۰ µl از سوسپانسیون باکتری به همراه ۲۵ µl از KOH ۰/۵ مولار را به مدت ۲ دقیقه در آب در حال جوش قرار داده شد و سپس مجدداً ۲۵ µl از KOH به آن افزوده و ۲ دقیقه دیگر باکتریها جوشانده شد. در انتها سوسپانسیون شفاف شده به مدت ۴ دقیقه با ۹۰۰۰rpm سانتریفیوژ گردید. محلول رویی حاوی DNA باکتری بوده و در دمای ۲۰- نگهداری شد.

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 ۲۵µl شامل 20 ng DNA، ۲/۵ µl بافر 10 X PCR، ۱/۵ µl از $MgCl_2$ 50 mM، ۱ µl 10 mM dNTP، ۱ µl از 0.2 mM هر پرایمر، ۰/۵ واحد آنزیم Taq و با شرایط زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۴

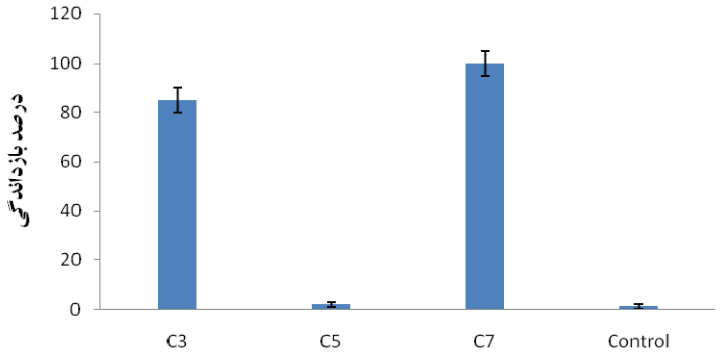
دقیقه، سپس ۳۰ چرخه شامل ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه ، ۶۰ ثانیه در ۵۲ درجه و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه انجام شد. پس از این مراحل نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه به منظور حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها قرار گرفتند. جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده گردید. تکرارهای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

**کشت باکتری در غلظتهای مختلف آهن:** به منظور بررسی میزان رشد باکتری سودوموناس در غلظتهای مختلف آهن، سویه های شناسایی شده به صورت کشت نقطه ای در ۱۰ غلظت مختلف کلرید آهن (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ ماکرو گرم بر میلی لیتر) در دمای ۲۷ درجه رشد داده شد. اندازه گیری قطر هاله رشد باکتریها طی ۳ روز با استفاده از کولیس دیجیتال صورت گرفت.

## نتایج و بحث

**جداسازی و شناسایی سودومونا سهای 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 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 می گرفت. ارزیابی بین سه محیط کشت سابورو دکستروز آگار، مولر هینتون آگار و سیب زمینی دکستروزآگار (PDA) صورت گرفت. در محیط کشت سابورو دکستروز آگار، سرعت رشد قارچ نسبت به باکتری بیشتر است و نمی توان به صورت کامل ایجاد هاله بازدارندگی را بررسی کرد. در محیط کشت مولر هینتون آگار نیز قارچ در هیچ کدام از نمونه ها 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 فلوروسنت، 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 می دهد که داده ها در سطح ۱ درصد معنی دار است (جدول ۲).



شکل ۱- نمودار میزان بازدارندگی سویه ها از رشد قارچ

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

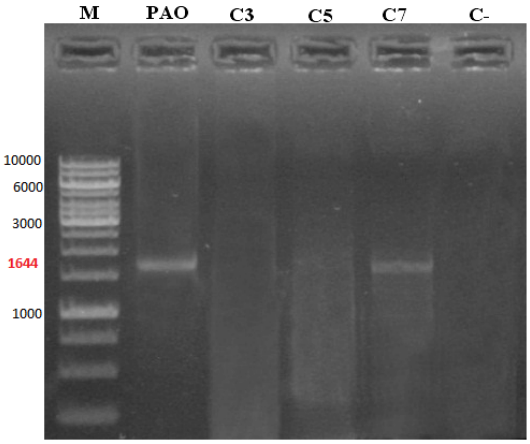
| سویه باکتری | گرم | اکسیداز | کاتالاز | سیترات | نیترات | ذوب ژلاتین | حرکت | تولید $H_2S$ | ایندول | Methyl Red | Voges Proskauer | مقاومت به کانامایسین | شکل | رشد هوازی | رشد بیهوازی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **A1** | + | + | - | + | + | - | - | + | + | + | + | حساس | میله ای | + | + |
| **A2** | + | + | + | + | – | - | - | + | + | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **A3** | + | + | - | + | – | - | - | + | + | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **A4** | + | + | - | + | – | - | - | + | + | + | + | حساس | میله ای | + | + |
| **A5** | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | مقاومت بالا | میله ای | + | + |
| **A6** | + | + | - | + | + | - | - | + | + | + | + | حساس | میله ای | + | + |
| **A7** | + | + | + | + | + | - | - | + | + | + | + | مقاوم | میله ای | + | + |
| **B1** | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | + | مقاوم | میله ای | + | + |
| **B2** | - | + | + | + | + | + | - | + | - | + | - | حساس | میله ای | + | + |
| **B3** | - | + | + | + | + | + | + | – | - | + | - | مقاوم | میله ای | + | – |
| **B4** | - | + | + | + | + | - | + | – | - | + | - | **** | میله ای | + | – |
| **B5** | - | + | + | + | + | - | + | + | - | + | + | حساس | میله ای | + | + |
| **B6** | - | + | + | + | + | - | + | – | + | + | - | مقاومت بالا | میله ای | + | – |
| **C1** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | - | حساسیت بالا | میله ای | + | – |
| **C2** | - | + | + | + | + | - | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | + |
| **C3** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | + | حساس | میله ای | + | – |
| **C4** | - | + | + | + | + | - | + | – | – | + | - | حساسیت بالا | میله ای | + | + |
| **C5** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **C6** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | + | حساس | میله ای | + | + |
| **C7** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | - | مقاوم | میله ای | + | – |
| **C8** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **D1** | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | حساس | میله ای | + | + |
| **D2** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **D3** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **D4** | - | + | + | + | + | + | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **D5** | - | + | + | + | + | – | + | – | – | + | - | حساسیت بالا | میله ای | + | – |
| **E1** | - | + | + | + | + | – | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **E2** | - | + | + | + | + | – | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **E3** | - | + | + | + | + | – | + | – | – | + | - | حساس | میله ای | + | – |
| **E4** | - | + | + | + | + | – | + | + | + | + | - | حساس | میله ای | + | + |
| **E5** | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | حساس | میله ای | + | + |

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس

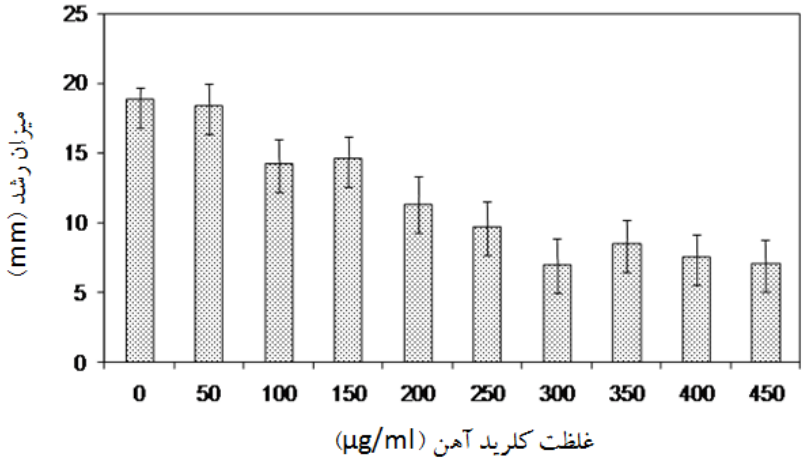
| منابع تغییرات | درجه آزادی | مجموع مربعات | میانگین مربعات | F |
|---|---|---|---|---|
| **تیمار** | ۲ | ۳۴۳۴۲/۹۵۵۶۰ | ۱۷۱۷۱/۴۷۷۸۰ | ۲۵۹۰/۴۰ |
| **خطا** | ۱۵ | ۹۹/۴۳۳۴۳ | ۶/۶۲۸۹۰ | |
| **کل** | ۱۷ | ۳۴۴۴۲/۳۸۹ | | |

همچنین جهت مقایسه میزان تفاوت در بازدارندگی سه نمونه باکتری، کشت متقابل باکتری و قارچ به روش مثلثی 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 KOH5%، کیفیت DNA استخراج شده از نمونه‌ها برروی ژل الکتروفورز ۱ درصد بررسی شد تا از استخراج صحیح اطمینان حاصل شود. DNA های استخراج شده با استفاده 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 نمونه ها 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 ۱۶۴۴جفت 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 ( شکل۲).




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




شکل۳- بررسی غلظتهای مختلف کلرید آهن بر رشد کلنیها

**تأثیر غلظتهای مختلف آهن بر میزان رشد سودوموناس های فلوروسنت:** 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 می کند. بیشترین میزان رشد هاله در غلظت صفر مشاهده شد که اختلاف آماری معنی داری با غلظت ۵۰ ماکرو گرم بر میلی لیتر آهن داشت (شکل ۳).

## بحث

با توجه به پتانسیل بالای بیماریزایی گونه های ریزوکتونیا در مراحل مختلف رشد چغندرقند 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* می تواند به انتخاب باکتریهای بازدارنده زیستی خاک کمک کند. با توجه به نتایج به دست آمده، بهترین محیط کشت جهت بررسی میزان بازدارندگی جدایه های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ ریزوکتونیا سولانی، محیط کشت PDA می باشد. هرچند که محیط کشت PDA یک محیط کشت اختصاصی قارچ است اما برای رشد هر دو نمونه قارچی و باکتریایی مناسب می باشد. در این محیط کشت قارچ سرعت رشد کمی نسبت به محیط کشت سابورودکستروز آگار داشت. محیط کشت مولرهینتون آگار نیز محیط کشت مناسب برای تست حساسیت آنتی بیوتیکی است که جهت جداسازی و حفظ گونه های نیسریا و موراکسلا استفاده می‌شود. محیط کشت سابورودکستروزآگار حاوی پپتون است و به گونه ای مانع از رشد باکتری می شود. در نتیجه برای بررسی بهتر و دقیق تر میزان بازدارندگی از محیط کشت PDA استفاده شد.

بر اساس آزمون کشت متقابل باکتری و قارچ و مشاهده هاله بازدارندگی، مشخص شد که در همه سویه ها اختلاف معنی داری 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 می باشد 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 بیوسنتز سیدروفور در باکتریهای سودوموناس فلورسنت بررسی گردید. مقایسه نتایج با نمونه شاهد PAO1، نشان داد که در بین سه سویه جداسازی شده، نمونه C7 واجد ژن بیوسنتز سیدروفور می باشد. 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 می تواند 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 سودوموناس ها برای رشد و تولید سیدروفورها وابسته به محتوی آهن و نوع منبع کربن در محیط وابسته است. در بررسی اثر آهن و مهار کننده های رشد در تولید سیدروفورها توسط سودوموناس فلوروسنت نشان داده شد که تحت شرایط غلظت کم آهن در دزهای پایین تر از ۱۶۰ ماکروگرم بر لیتر سودوموناس های مورد مطالعه تولید پپتیدهای سیدروفور سبز-زرد می کند و بالعکس افزایش آهن فریک در غلظتهای بالاتر از ۲۰۰ ماکروگرم بر لیتر تولید سیدروفور را سرکوب می کند

(۱۸). در تحقیق دیگری که به منظور بررسی نقش رقابت برای جذب آهن توسط سودوموناس های فلورسنت در کنترل *R. solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا صورت گرفت نشان داده شد که وجود آهن در محیط کشت باعث کاهش معنی داری در تولید سیدروفورمی شود به طوری که در غلظتها ی بالای ۵۰ میکرومول تولید سیدروفور به صفر می رسد (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 داولینگ و اوگرا مطابق است که بیان کردند که شواهد ژنتیکی و شیمیایی قابل توجهی وجود دارد که نشان می دهد بیوکنترلی عوامل بیماریزا 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 می دهد 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 آنتی بیوتیک، سیدروفور و سیانید هیدروژن در 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 جدایه ها را می توان 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 سودوموناس ها منجر به یک افزایش در عملکرد حبوبات به علت تولید متابولیتهای ثانویه از جمله سیدروفور شد (۲۲). نتایج دیگری نیز نشان داد که کاربرد سویه های تولید کننده سیدروفور در مقایسه با شاهد باعث افزایش معنی دار میزان جذب آهن، میزان کلروفیل و همچنین وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاه ذرت شده است (۹).

به نظر می رسد 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 می توان این جدایه ها را به عنوان کودهای بیولوژیک بالقوه و نیز به عنوان عوامل بازدارنده زیستی مورد استفاده قرار داد.

## منابع


1. 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.

2. 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.

3. 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.

4. 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 sidrophore 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, 200 ,۳The 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, Villacieros 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 fluorescents* 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