

بررسی برخی خصوصیات بیولوژیکی و ملکولی استرین UTPF-59 *Pseudomonas fluorescens* در کنترل *Rhizoctonia solani* روی لوبیا

حمیده افشارمنش^۱، مسعود احمد زاده^۲، محمد جوان نیکخواه^۲ و عباس شریفی تهرانی^۳

چکیده

اثر بازدارندگی استرین UTPF-59 *Pseudomonas fluorescens* علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا در آزمایشگاه و گلخانه، هم‌چنین تولید متابولیت‌های ثانویه ضد قارچ از جمله سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز توسط استرین UTPF-59 در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که استرین UTPF-59 از نظر تاثیر روی رشد قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاه نسبت به استرین استاندارد *P. fluorescens* CHA0 موثرتر بود به طوری که میانگین قطر هاله بازدارندگی در استرین UTPF-59، ۱۵ میلی‌متر و در استرین CHA0، ۱۰ میلی‌متر بود. در شرایط گلخانه استرین CHA0 تاثیر بیش‌تری در کنترل بیماری مرگ گیاهچه لوبیا داشت، چنان‌که در صد کاهش بیماری در تیمار بذر و خاک در استرین CHA0 به ترتیب ۳۵/۷۲ و ۶۰ درصد ولی در استرین UTPF-59 به ترتیب ۱۴/۲۹ و ۳۳/۳۴ درصد بود. استرین UTPF-59 هر سه متابولیت سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز را تولید کرد. نقش سیدروفور، ترکیبات فرار و غیر فرار در جلوگیری از رشد *R. solani* در آزمایشگاه در این استرین به اثبات رسید. بررسی کلونیزاسیون ریشه لوبیا در شرایط عاری از بیمارگر نشان داد که در مورد هر دو استرین جمعیت باکتری روی ریشه لوبیا نسبت به جمعیت اولیه باکتری‌ها روی بذور ($10^9 \times$ سلول باکتری) پس از یک ماه به تعداد 10^4 سلول باکتری کاهش یافت. ردیابی ژن‌های *phlA* و *phlD* (دو ژن موثر در سنتز آنتی‌بیوتیک دی استیل فلوروگلوسینول) به وسیله روش PCR و آغازگرهای اختصاصی این ژن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و وجود هر دو ژن *phlD* و *phlA* در استرین UTPF-59 به اثبات رسید.

کلمات کلیدی: UTPF-59 *Pseudomonas fluorescens*، *Rhizoctonia solani*، متابولیت‌های ضد قارچ، ژن‌های *phlA* و *phlD*

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲ و ۳. به‌ترتیب استادیاران و استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

مقدمه

مرگ گیاهچه در اثر قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn یکی از بیماری‌های شایع لوبیا در دنیا می‌باشد. تاثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزی، هزینه‌های اقتصادی آن از یک‌طرف و نگرانی‌های زیست‌محیطی و آلودگی چرخه غذایی به باقیمانده سموم شیمیایی از طرف دیگر سبب محدودیت کاربرد آن‌ها در سطح وسیع شده است. دلایل فوق دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر را به عنوان یک چالش جدی فرا روی پژوهشگران قرار داده است. در سال‌های اخیر بحث امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به‌خصوص باکتری‌های متعلق به سودمونس‌های فلورسنت از قبیل گونه‌های *P. fluorescens* (Trevisan) Migula و *P. putida* (Trevisan) Migula در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی اشاره شده است. اشتوتز و همکاران (۱۹۸۶) موفق شدند با جداسازی استرین *P. fluorescens* CHA0 از ناحیه ریزوسفر توتون، نقش آن را در کنترل بیماری پوسیدگی سیاه ریشه توتون به اثبات برسانند. این باکتری به‌دلیل تولید اغلب متابولیت‌های ضد میکروبی در حال حاضر یکی از موثرترین عوامل در کنترل بیولوژیکی محسوب می‌شود. تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک (پیکارد و همکاران، ۲۰۰۰)، سیدروفورهای نوع سودوباکتین^۱ (لینگ، ۱۹۸۶)، سیانید هیدروژن (ویسارد و همکاران، ۱۹۸۹) و آنزیم پروتئاز (کیل و دفاگو، ۱۹۹۷) از مهم‌ترین مکانیسم‌های موثر در کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی توسط این باکتری آنتاگونیست به‌شمار می‌روند. در بین آنتی‌بیوتیک‌های شناخته شده سودومونس‌های فلورسنت ترکیب ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوکوسینول به‌عنوان یک عامل موثر در کنترل بیولوژیکی شناخته شده است (ریجمیکرز و همکاران، ۱۹۹۹). با توجه به نقش موثر دی استیل فلوروگلوکوسینول در کنترل بسیاری از عوامل بیمارگر، ردیابی ژن‌های موثر در سنتز این آنتی‌بیوتیک و بررسی تنوع ژنتیکی سودومونس‌های فلورسنت تولید

1. pseudobactin

کننده این آنتی‌بیوتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (ماوردی و همکاران، ۲۰۰۱). ژن‌های مورد نیاز برای سنتز ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوکوسینول در *P. Q2-87 fluorescens* شناسایی و کلون شده‌اند (بانگرا و توماشو، ۱۹۹۹). چهار ژن *phlA*، *phlC*، *phlB* و *phlD* در بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک نقش دارند (بانگرا و توماشو، ۱۹۹۹). ژن *phlD* مسئول بیوسنتز منواستیل فلوروگلوکوسینول (MAPG) بوده و *phlA*، *phlC* و *phlB* در تبدیل منواستیل فلوروگلوکوسینول به دی استیل فلوروگلوکوسینول ضروری هستند. در چند سال اخیر در ایران نیز پژوهش‌هایی در زمینه تاثیر این باکتری‌ها در کنترل تعدادی از عوامل بیماری‌زای خاکزاد صورت گرفته است. شکبیا (۱۳۸۳) گزارش کرد که استرین‌های *P. fluorescens* با تولید آنتی‌بیوتیک و ترکیبات فرار از رشد قارچ *Tiarosporella phaseolina* (Tassi) van der Aa عامل پوسیدگی زغالی سویا جلوگیری کردند. خاطری (۱۳۸۱) و صابری‌ریسه و همکاران (۱۳۸۳) به ترتیب اثر چند باکتری آنتاگونیست را روی قارچ‌های *Phytophthora drechsleri* Tucker عامل بوته میری خیار و *P. Leonian* (R.E.Sm. and E. H. Sm.) عامل *citrophthora* عامل گموز پسته را بررسی کردند. رضانی و همکاران (۱۳۸۳) و جمالی و همکاران (۱۳۸۳) گزارش کردند استرین‌های *P. fluorescens* با تولید آنتی‌بیوتیک و ترکیبات فرار از رشد میسلیم قارچ *Fusarium oxysporum* Schaht عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز و نیز عامل پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی جلوگیری کردند.

در این پژوهش استرین UTPF-59 *P. fluorescens* که از ریزوسفر پیاز جدا شده بود و طی مطالعات قبلی توانایی زیادی را در کنترل پژمردگی فوزاریومی پیاز نشان داده بود (رضانی و همکاران، ۱۳۸۳)، به منظور مطالعات بیشتر انتخاب گردید. اثر بازدارندگی این استرین علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل مرگ گیاهچه لوبیا در آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز توسط استرین UTPF-59 و نقش متابولیت‌ها در جلوگیری از

آنزیم پروتئاز توسط باکتری‌ها از محیط Skim milk agar (SMA) و کشت نقطه‌ای باکتری‌ها روی این محیط مطابق روش مارهوفر وهمکاران (۱۹۹۵) استفاده شد. تشکیل هاله بیرنگ در اطراف پرگنه باکتری‌ها بعد از ۲۴ ساعت نشانه فعالیت پروتئاز است. تعیین توان تولید سیانید هیدروژن با استفاده از روش آلستروم و برنز (۱۹۸۹) انجام گردید. بدین منظور از محیط کینگ بی (KB) حاوی ۴/۴ گرم گلاسیسین در هر لیتر محیط و کاغذهای صافی آغشته به محلول معرف مرکب از کربنات سدیم ۲٪ و اسید پیکریک ۰/۵٪ استفاده شد. تشتک‌های پتری توسط نوار پارافیلیم مسدود شد و درون آنکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف ذکر شده از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ می‌یابد.

بررسی مکانیسم تاثیراترین‌های باکتریایی روی *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه

نقش ترکیبات فرار ضد قارچی روی رشد قارچ *R. solani* این آزمایش با کمی تغییر در روش کراس و لوپر (۱۹۹۰) انجام گردید. ابتدا، سوسپانسیون اترین‌های UTPF و CHA0 روی محیط KB حاوی ۴/۴ گرم در لیتر گلاسیسین پخش شد و پس از ۲۴ ساعت، قرصی به قطر ۵ میلی‌متر از قارچ *R. solani* در مرکز تشتک پتری حاوی محیط KB کشت گردید. سپس تشتک‌های پتری حاوی قارچ به طور وارونه روی تشتک‌های پتری حاوی باکتری‌های آنتاگونیست قرار داده شد به طوری که لبه تشتک‌های پتری روی هم قرار گرفته، توسط نوار پارافیلیم کاملاً مسدود گردیدند. تشتک پتری شاهد حاوی محیط KB به علاوه گلاسیسین بدون باکتری در مقابل محیط KB حاوی قطعه قارچ قرار داده شد. (در تشتک پتری شاهد به جای باکتری، از آب مقطر سترون استفاده گردید.) تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز نگهداری شدند.

رشد قارچ مذکور مورد ارزیابی قرار گرفت. ردیابی ژنهای *phlA* و *phlD* در این استرین از دیگر اهداف این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها

تهیه میکروارگانیسیم‌های مورد استفاده

استرین UTPF-59 *P. fluorescens* جدا شده از مزارع پیاز قره تپه از گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردید. استرین استاندارد *P. fluorescens* CHA0 که از دانشگاه پلی تکنیک زوریخ سوئیس دریافت شده بود، به منظور مقایسه با استرین ایرانی UTPF-59 در تمام آزمایش‌ها استفاده گردید. قارچ *Rhizoctonia solani* گروه آناستومی AG-4 عامل مرگ گیاهچه لوبیا که از روی ریشه و طوقه لوبیا از منطقه ورامین جدا شده بود و بیماری‌زایی آن روی لوبیا در گلخانه به اثبات رسیده بود، از گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران فراهم گردید.

بررسی قدرت بازداری از رشد قارچ بیمارگر درون تشتک پتری (Plate assay)

مطابق روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) یک لوپ از کشت باکتری‌های UTPF-59 و CHA0 برداشته و به صورت نقطه‌ای روی تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار روز نگهداری شدند، سپس قرصی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت ۴۸ ساعته قارچ *R. solani* در وسط تشتک‌های پتری قرار گرفت. زمانی که ریشه قارچ در تشتک پتری شاهد به لبه آن رسید، قطر هاله بازدارندگی اندازه‌گیری شد.

بررسی تولید برخی متابولیت‌های میکروبی موثر در خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌ها

برای بررسی تولید سیدروفور از محیط آبی رنگ CAS (Chrome Azurol S) و کشت نقطه‌ای باکتری‌ها روی این محیط مطابق با روش شاین و نیلندز (۱۹۸۷) استفاده شد. در صورتی که باکتری تولید سیدروفور کند، باعث تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی می‌شود. هاله نارنجی رنگ ایجاد شده در اطراف پرگنه‌های باکتری بعد از ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد. به منظور بررسی تولید

کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل دو عاملی با سه تیمار و سه تکرار انجام گرفت. فاکتور اول شامل دو استرین باکتری به علاوه شاهد و فاکتور دوم شامل محیط کشت KB و محیط کشت KB حاوی آهن می باشد. داده های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۱٪ انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیم محاسبه گردید.

تاثیر منابع مختلف کربن روی اثر بازداری استرین *R. solani* UTPF-59 علیه قارچ

برای انجام این آزمایش از محیط NBYA (Nutrient Broth Yeast Agar) مطابق روش دوفی و دفاگو (۱۹۹۰) استفاده گردید. این محیط را به پنج قسمت تقسیم کرده و به هر قسمت یک درصد از منابع کربنی گلیسرول، سوکروز، گلوکز، فروکتوز و آسپاراژین اضافه گردید. استرین UTPF-59 را به صورت نقطه ای در به فاصله ۵ میلی متر از لبه تشتک های پتری کشت داده و بعد از چهار روز، قرصی به قطر ۵ میلی متر از کشت ۴۸ ساعته قارچ در مرکز تشتک پتری قرار داده و سپس در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. بعد از اینکه ریشه قارچ در تشتک پتری شاهد به لبه آن رسید قطر هاله بازداری اندازه گیری شد. در تشتک پتری شاهد از محیط NBYA بدون استفاده از هیچ یک از منابع کربنی استفاده گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با شش تیمار در سه تکرار انجام گرفت و داده های به دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

ردیابی و اثبات وجود ژن های سنتز کننده آنتی بیوتیک دی استیل فلوروگلوکوسینول

از آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی دو ژن مهم در مسیر بیوسنتز ۲ و ۴- دی استیل فلوروگلوکوسینول به نام های *phlA* و *phlD* استفاده شد. آغازگرهای *phl2a* (5'-GAG GAC GTC GAA GAC CAC CA-3') و *phl2b* (5'-ACC GCA GCA TCG TGT ATG AG-3') که برای تکثیر ژن *phlD* طراحی شده اند، قادرند قطعه ای از DNA به طول ۷۴۵ جفت باز را تکثیر کنند

نقش ترکیبات غیر فرار ضد قارچی روی رشد قارچ *R. solani*

این آزمایش با کمی تغییر در روش کراس و لوپر (۱۹۹۰) انجام گردید. در ابتدا سوسپانسیون استرین های UTPF-59 و CHA0 به طور جداگانه روی محیط KB حاوی ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) پخش گردید و پس از سه روز، باکتری ها از سطح محیط کشت کاملاً شسته شدند. سپس پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری به صورت وارونه قرار داده شد. پس از یک ساعت تمام باکتری ها از بین رفتند. سپس قرصی به قطر ۵ میلی متر از قارچ *R. solani* در مرکز هر تشتک پتری قرار داده شد. در تشتک های پتری شاهد دارای محیط KB حاوی کلرید آهن به جای سوسپانسیون باکتری، از آب مقطر سترون استفاده گردید و پس از سه روز پنبه سترون آغشته به کلروفرم درون تشتک پتری به صورت وارونه قرار داده شد. تشتک های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگه داری شدند و اندازه گیری قطر رشد قارچ بعد از ۴۸ ساعت انجام گرفت.

آزمایش های فوق در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل دو تیمار در سه تکرار انجام گرفت. داده های به دست آمده از آزمایش (قطر رشد میسلیم) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد. درصد بازداری از رشد میسلیم محاسبه گردید.

نقش سیدروفور روی رشد قارچ *R. solani*

به منظور بررسی تاثیر سیدروفور روی رشد قارچ مطابق روش رشید و احمد (۲۰۰۵) از دو محیط KB حاوی ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) و محیط KB فاقد آهن استفاده گردید. در ابتدا سوسپانسیون استرین های TPF-59 و CHA0 روی هر دو محیط پخش شد و سپس چهار قرص از قارچ *R. solani* در هر پتری قرار داده شد. در تشتک های پتری شاهد به جای سوسپانسیون باکتری از آب مقطر سترون استفاده گردید. تشتک های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگه داری شدند و بعد از ۴۸ ساعت قطر رشد میسلیم اندازه گیری شد. آزمایش به صورت طرح

درجه افزایش در دمای اتصال آغازگر به شرح زیر انجام گرفت: ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد که بوسیله ۳۰ سیکل از ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد دنبال گردید.

واکنش PCR برای ردیابی ژن *phlA*

PCR در ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر انجام شد (رزونیکو و همکاران، ۲۰۰۳): ۴ میکرولیتر سلول متلاشی (لایز) شده، بافر PCR ۱۰x، ۴/۰ میلی‌مول مخلوط دی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs)، ۱/۵ واحد از آنزیم Smar Taq، ۲/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۴۰ پیکو مول از هر پرایمر، دی متیل سولفوکسید (DMSO) ۵٪. برنامه حرارتی برای واکنش PCR و تکثیر قطعات DNA با کمی تغییر در روش رزونیکو و همکاران (۲۰۰۳) به صورت زیر تنظیم گردید: ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد که بوسیله ۲۵ سیکل از ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۲ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد دنبال گردید.

همه مواد مصرفی به جز آغازگرها از شرکت سیناژن تهیه گردید. آغازگرها ساخت شرکت MWG Biotech کشور آلمان می‌باشد. به منظور اطمینان از صحت آزمایش از استرین CHA0 که دارای ژن‌های *phlA* و *phlD* است به عنوان شاهد مثبت و از بافر لایز به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. بعد از تکثیر DNA بوسیله هر دو آغازگر، محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد و بافر (EDTA) 1x Tris-borate-TBE ریخته شدند و به ولتاژ ۷۵ ولت وصل شد. جهت تخمین اندازه فرآورده‌های تکثیر شده در PCR، از نشانگر ژنومی یک کیلو جفت بازی (gene ruler 1kbp DNA ladder) و ۱۰۰ جفت بازی (gene ruler 100bp DNA ladder) ساخت شرکت MBI Fermentas کشور آلمان استفاده شد. سپس ژل را با محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی کرده، و با دستگاه Gel-Documentation (B & L system) IMAGO مدل عکس برداری صورت گرفت.

(ریجمیکرز و همکاران، ۱۹۹۷). آغازگرهای *phlA* با توالی 5'-TCA GAT CGA AGC CCT GTA CC-3' و *phlAr* با توالی 5'-GAT GCT GTT CTT GTC CGA GC-3' که برای تکثیر ژن *phlA* طراحی شده‌اند قادرند قطعه‌ای از DNA به طول ۴۱۸ جفت باز را تکثیر کنند (ریجمیکرز و همکاران، ۱۹۹۹). این آغازگرها می‌توانند ردیف نوکلئوتیدی *phlA* از سودوموناس‌های فلورسنت گروه یک (ARDRA (Amplified 16S ribosomal DNA analysis restriction) (مثل استرین CHA0) و گروه سه (مثل استرین F113) را تکثیر کنند، ولی قادر به تکثیر ژن *phlA* در سودوموناس‌های فلورسنت گروه دو (ARDRA (مثل استرین Q2-87) نمی‌باشند (رزونیکو و همکاران، ۲۰۰۳).

آماده سازی استرین‌های باکتری برای ردیابی ژن‌های *phlD* و *phlA*

برای آماده سازی استرین‌های UTPF-59 و CHA0 از روش ونگ و همکاران (۲۰۰۱) و رزونیکو و همکاران (۲۰۰۳) به ترتیب برای ردیابی ژن‌های *phlD* و *phlA* استفاده گردید. به منظور از بین بردن دیواره سلولی استرین‌های باکتریایی، سوسپانسیون باکتری را با ۹۵ میکرولیتر بافر لیز کننده (۵۰ میلی‌مول KCl، ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl (pH:8.3) و ۱۰ درصد Tween20) مخلوط کرده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد داخل دستگاه ترموسایکلر (مدل GP001 ساخت شرکت Research Corbett کشور استرالیا) قرار داده شد.

واکنش PCR برای ردیابی ژن *phlD*

PCR در ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر انجام شد (ونگ و همکاران، ۲۰۰۱): ۴ میکرولیتر سلول متلاشی (لایز) شده، بافر PCR ۱۰x، ۴/۰ میلی‌مول مخلوط دی نوکلئوزید تری فسفات (dNTPs)، ۱/۵ واحد از آنزیم Smar Taq، ۲ میلی‌مول کلرید منیزیم (MgCl₂)، ۴/۰ پیکو مول از هر پرایمر، دی متیل سولفوکسید (DMSO) ۵٪ و ۲۰ mg/ml آلبومین سرم گاوی (Bovine Serum Albumin=BSA). برنامه سیکل حرارتی PCR مطابق روش ونگ و همکاران (۲۰۰۱) با ۵

سالم بعد از دو هفته و وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی پس از یک ماه بود. آزمایش‌های فوق در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل پنج تیمار (دو استرین CHA0 و UTPF-59، شاهد سالم، شاهد آلوده و بنومیل) در چهار تکرار انجام گرفت. داده‌های به دست آمده از آزمایش (در صد مرگ گیاهچه‌ها، وزن خشک و تر ریشه و اندام‌های هوایی) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

$$100 \times \frac{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در تیمار} - \text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد سالم}}{\text{تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد}} = \text{درصد مرگ گیاهچه در تیمار}$$

درصد مرگ گیاهچه در تیمار - درصد مرگ گیاهچه در شاهد آلوده = درصد کاهش بیماری در تیمار

بررسی قدرت کلونیزاسیون ریشه لوبیا توسط باکتری‌های آنتاگونیست در شرایط عاری از بیمارگر در گلخانه

آزمایش مطابق روش کیل و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد. بذور با سوسپانسیون 1×10^9 سلول باکتری در میلی‌لیتر آغشته شده و پس از کاشت در خاک سترون، آبیاری با آب مقطر سترون انجام شد. چهار هفته بعد از کاشت، برای هر تیمار چهار گیاهچه انتخاب و ریشه‌های آن‌ها توزین گردید. ریشه‌ها درون ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شده و بعد از تهیه سری رقت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه روی محیط اختصاصی S_1 (گولد و همکاران، ۱۹۸۵) پخش گردید. پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، شمارش پرگنه باکتری صورت گرفت که موید جمعیت باکتری روی ریشه است. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل دو تیمار در چهار تکرار انجام گرفت. داده‌های به دست آمده از آزمایش (لگاریتم تعداد باکتری‌ها در هر گرم ریشه) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

به منظور بررسی اثر استرین‌های UTPF-59 و CHA0 روی میزان رشد گیاه، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و نیز وزن تر ریشه پس از یک ماه اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سه تیمار در چهار تکرار انجام گرفت. داده‌های به دست آمده از

بررسی خواص بازدارندگی استرین UTPF-59 در شرایط گلخانه علیه بیمارگر *Rhizoctonia solani*

آزمایش گلخانه‌ای به دو روش آغشته سازی خاک و آغشته سازی بذر انجام شد. برای تهیه زادمایه قارچ بیماری‌زا از روش هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) استفاده شد به این ترتیب که چند قطعه ۵ میلی‌متری از کشت دو روزه قارچ بر روی ۲۰۰ گرم بذور ارزن دو بار اتوکلاو شده قرار داده شد و سپس در محل تاریک و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت دو هفته نگهداری شد. سپس دو گرم بذر ارزن آغشته به قارچ با یک کیلو گرم خاک سترون مخلوط گردید. برای تهیه زادمایه استرین‌های آنتاگونیست از روش بور و همکاران (۱۹۷۸) استفاده شد. ابتدا باکتری‌ها روی محیط KB کشت و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. سپس سوسپانسیون باکتری‌ها در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه گردید و پس از هشت بار رقیق سازی، جمعیت آن‌ها با استفاده از لام هماسیتومتر تعیین گردید.

به منظور آغشته سازی بذور به استرین‌های آنتاگونیست از روش شر و همکاران (۱۹۸۳) استفاده گردید. بعد از ضد عفونی سطحی بذور لوبیا قرمز رقم ناز با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، بذور درون سوسپانسیون 1×10^9 سلول باکتری میلی‌لیتر حاوی کربوکسی متیل سلولز (CMC) ۰/۵ درصد به مدت دو الی سه ساعت روی شیکر دورانی قرار گرفتند. از قارچ‌کش بنومیل مطابق روش کایزر و همکاران (۱۹۸۹) جهت مقایسه با اثر باکتری‌های آنتاگونیست استفاده شد. در تیمار قارچ‌کش، بذور درون محلول بنومیل یک در هزار غوطه ور گردیدند. سپس در معرض جریان هوای استریل هود گذاشته شدند تا خشک شوند. برای آغشته سازی خاک آلوده به *R. solani* با باکتری‌های آنتاگونیست از روش ولر و کوک (۱۹۸۳) استفاده شد. مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون 1×10^{10} سلول باکتری حاوی کربوکسی متیل سلولز ۰/۵ درصد برای هر گلدان حاوی ۵۰۰ گرم خاک سترون استفاده گردید. در تیمار قارچ‌کش، ۵۰ میلی‌لیتر از محلول بنومیل یک در هزار به هر گلدان اضافه شد. پارامترهای مورد ارزیابی، تعداد گیاهچه‌های

UTPF-59 همانند استرین CHA0 باعث تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد به رنگ آجری شد.

بررسی مکانیسم تاثیر استرین UTPF-59 روی *R. solani* در شرایط آزمایشگاه

در استرین UTPF-59 نقش ترکیبات فرار و از جمله سیانید هیدروژن در جلوگیری از رشد قارچ *R. solani* روی محیط KB حاوی گلايسين به اثبات رسید و اثر بازدارندگی آن نیز بیشتر از استرین CHA0 بود (جدول ۱).

با استفاده از روش کاستریک و کاستریک (۱۹۸۳) مشخص گردید که یکی از ترکیبات فرار *P. fluorescens* گاز سیانید هیدروژن می‌باشد، هر چند که ترکیبات فرار دیگری مانند آلدهیدها نیز ممکن است تولید گردد. با توجه به اینکه در این آزمایش از محیط کینگی حاوی گلايسين استفاده گردید و گلايسين به عنوان یکی از پیش ماده‌های سنتز سیانید هیدروژن است، می‌توان گفت که این اثر بازدارندگی به احتمال زیاد مربوط به سیانید هیدروژن است. در بررسی نقش ترکیبات غیر فرار مانند آنتی‌بیوتیک‌ها در جلوگیری از رشد قارچ *R. solani*، مشاهده شد که هر دو استرین UTPF-59 و CHA0 توانستند در محیط کشت KB حاوی کلرید آهن، با تولید ترکیبات غیر فرار از رشد قارچ ممانعت به عمل آورند ولی درصد بازدارندگی از رشد قارچ در استرین UTPF-59 بیشتر از CHA0 بود (جدول ۲).

آزمایش (وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و وزن تر ریشه) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

محاسبات آماری

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن ($P \leq 0.05$) و با استفاده از نرم افزار SAS (Version 6.12) انجام گرفت. در مورد صفاتی که عدد صفر در بین آنها وجود داشت از تبدیل عددی $\sqrt{x+0.5}$ استفاده گردید.

نتایج و بحث

بررسی تاثیر استرین UTPF-59 در جلوگیری از رشد *Rhizoctonia solani* در شرایط آزمایشگاه و تولید متابولیت‌های ثانویه توسط این استرین

میانگین قطر هاله بازدارندگی در استرین UTPF-59، ۱۵ میلی‌متر و در استرین CHA0، ۱۰ میلی‌متر بود. استرین UTPF-59 مانند CHA0 توانست هر سه متابولیت سیدروفور، سیانید هیدروژن و پروتئاز را در محیط آزمایشگاه تولید کند. میانگین قطر هاله نارنجی رنگ در اطراف پرگنه باکتری روی محیط CAS (نشان دهنده تولید سیدروفور) در استرین‌های UTPF-59 و CHA0 به ترتیب ۸ و ۱۰ میلی‌متر و میانگین قطر هاله شفاف در اطراف پرگنه روی محیط SMA (نشان دهنده تولید پروتئاز) در استرین‌های UTPF-59 و CHA0 به ترتیب ۷ و ۱۱ میلی‌متر بود. از نظر تولید HCN، استرین

جدول ۱: تاثیر ترکیبات فرار استرین‌های UTPF-59 و CHA0 در جلوگیری از رشد میسلیوم *Rhizoctonia solani* روی محیط KB حاوی گلايسين

در صد بازدارندگی از رشد قارچ	میانگین قطر رشد پرگنه قارچ (میلی‌متر)	استرین‌های باکتری
۸۰ c	۸/۳۳	UTPF-59
۵۰ b	۲۰/۳۳	CHA0
۰ a	۴۰	شاهد

اعداد متن جدول میانگین ۳ تکرار می‌باشند.

اعداد هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری دارند.

جدول ۲: تاثیر ترکیبات غیر فرار استرین‌های UTPF-59 و CHA0 در جلوگیری از رشد میسلیم

R. solani روی محیط KB حاوی آهن

استرین های باکتری	میانگین قطر رشد پرگنه قارچ (میلی متر)	در صد بازداری از رشد قارچ
UTPF-59	۵/۲	۸۷ c
CHA0	۱۰/۶۶	۷۳ b
شاهد	۴۰	۰ a

اعداد متن جدول میانگین ۳ تکرار می‌باشند.

اعداد هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری دارند.

درصد بازداری از رشد قارچ با اضافه کردن آهن به محیط کشت، به میزان ۱۶ درصد افزایش یافت (از ۲۱٪ به ۳۷٪) اما در استرین UTPF-59 درصد بازداری از رشد قارچ با اضافه کردن آهن به محیط کشت، به میزان هشت درصد کاهش یافت (جدول ۳). بنابراین نقش سیدروفور در جلوگیری از رشد قارچ در استرین-UTPF-59 به اثبات رسید ولی در مورد CHA0 این قضیه ثابت نشد (جدول ۳). به دلیل اینکه سیدروفور در شرایط کمبود آهن تولید می‌گردد، بنابراین می‌توان این هشت درصد بازدارندگی بیشتر در محیط KB فاقد آهن را به تولید سیدروفور نسبت داد. بنابراین نقش سیدروفور در جلوگیری از رشد قارچ *R. solani* در استرین UTPF-59 به اثبات رسید. در استرین CHA0 ظاهراً سیدروفور نقشی در بازدارندگی قارچ نداشت و می‌توان بازدارندگی از رشد قارچ را به تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نسبت داد.

نتایج اشتوتز و همکاران (۱۹۸۶) نشان داد که استرین CHA0 سیدروفور و آنتی‌بیوتیک تولید می‌کند ولی مکانیسم کنترل بیماری، تولید سیانید هیدروژن می‌باشد. سیدروفورها موادی با وزن مولکولی پایین بوده که در شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند و دارای قدرت جذب یون فریک (Fe^{+3}) می‌باشند (لینگ، ۱۹۸۶). سیدروفورها با جذب آهن به رشد گیاه نیز کمک می‌کنند (کلپر و همکاران، ۱۹۸۰).

به دلیل اضافه کردن آهن به محیط کشت می‌توان گفت که اثر بازدارندگی ایجاد شده به احتمال قوی مربوط به تولید ترکیبات غیر فرار و از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها توسط باکتری‌ها می‌باشد، زیرا سیدروفور در شرایط کمبود آهن تولید می‌گردد آنزیم‌ها نیز لزوماً بعد از تماس سلولی ایجاد می‌گردند و چون در این آزمایش سلول‌های باکتری از سطح محیط کشت کاملاً شسته شده و از بین رفته‌اند و سپس قارچ کشت شده است لذا این بازدارندگی نمی‌تواند مربوط به اثر آنزیم باشد. سیانید هیدروژن نیز چون گازی است فرار، نمی‌تواند تأثیر چندانی در جلوگیری از رشد قارچ داشته باشد و باید محیط بسته‌ای برای آن فراهم شود تا بتواند موثر واقع شود.

در بررسی نقش سیدروفور روی رشد قارچ *R. solani*، در هر دو محیط KB حاوی آهن و KB فاقد آهن هر دو استرین توانستند از رشد قارچ جلوگیری به عمل آورند. با توجه به نتایج جدول ۴ از نظر جلوگیری از رشد میسلیمی قارچ *R. solani* بین باکتری‌ها در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری مشاهده می‌شود اما بین دو محیط کشت تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. اثر متقابل باکتری و محیط کشت بسیار معنی‌دار می‌باشد. با توجه به جدول ۳، بیش‌ترین درصد بازدارندگی مربوط به استرین UTPF-59 در محیط کشت KB حاوی آهن بود (۸۸٪) که با همین استرین در محیط کشت فاقد آهن اختلاف معنی‌داری نشان داد. در استرین CHA0

جدول ۳: تاثیر متقابل باکتری و محیط کشت در جلوگیری از میزان رشد میسلیومی قارچ *R. solani*

تیمار	میانگین قطر رشد پرگنه قارچ (میلی متر)	در صد بازداری از رشد قارچ
CHA0+(KB+Fe)	۱۸/۸۳	۳۷ c
CHA0+KB	۲۳/۶۷	۲۱ d
UTPF-59+KB	۶/۱۷	۸۰ b
UTPF-59+(KB+Fe)	۳/۶۷	۸۸ a
+KB شاهد	۳۰	۰ e
+(KB+Fe) شاهد	۳۰	۰ e

اعداد متن جدول میانگین سه تکرار است.

اعداد هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری دارند.

جدول ۴: تجزیه واریانس تاثیر باکتری و محیط کشت در کنترل رشد میسلیومی قارچ *R. solani*

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	
۷۶۹/۴۶۱ **	۹۷۲/۵۱۴	۲	باکتری
	۱/۲۶۴	۶	خطا
۱/۹۰۳ ns	۲/۷۲۲	۱	محیط کشت
۱۴/۵۷۲ **	۲۰/۸۴۷	۲	باکتری × محیط کشت
	۱/۴۳۱	۶	خطا

ns: عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها.

** : وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۱٪ بین تیمارها.

تاثیر منابع مختلف کربن روی اثر بازدارندگی استرین UTPF-59 علیه قارچ *R. solani*

نتایج این پژوهش نشان داد که محیط NBYA حاوی ۱٪ سوکروز دارای بیش‌ترین قطر هاله بازدارندگی در اثر استرین UTPF-59 می‌باشد که با شاهد و با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری را نشان داد. محیط NBYA حاوی ۱٪ گلوکز هیچ‌گونه هاله بازدارندگی ایجاد نکرد.

قندهای سوکروز، گلیسرول و فروکتوز باعث تحریک خاصیت بازدارندگی در استرین UTPF-59 علیه قارچ *R. solani* شدند ولی گلوکز نقش جلوگیری کننده در خاصیت بازدارندگی داشت. آسپاراژین نیز تاثیر محسوسی در افزایش یا کاهش خاصیت بازدارندگی نشان نداد (جدول ۵).

جدول ۵: تاثیر منابع مختلف کربن روی اثر بازدارندگی استرین UTPF-59 علیه *R. solani* روی محیط NBYA

میانگین قطر هاله قارچ (میلی متر)	منابع مختلف کربن
۲۱/۳۳ a	سوکروز
۱۸ b	گلیسرول
۱۷ b	فروکتوز
۱۴/۵ c	آسپاراژین
۰ d	گلوکز
۱۳/۵ c	شاهد

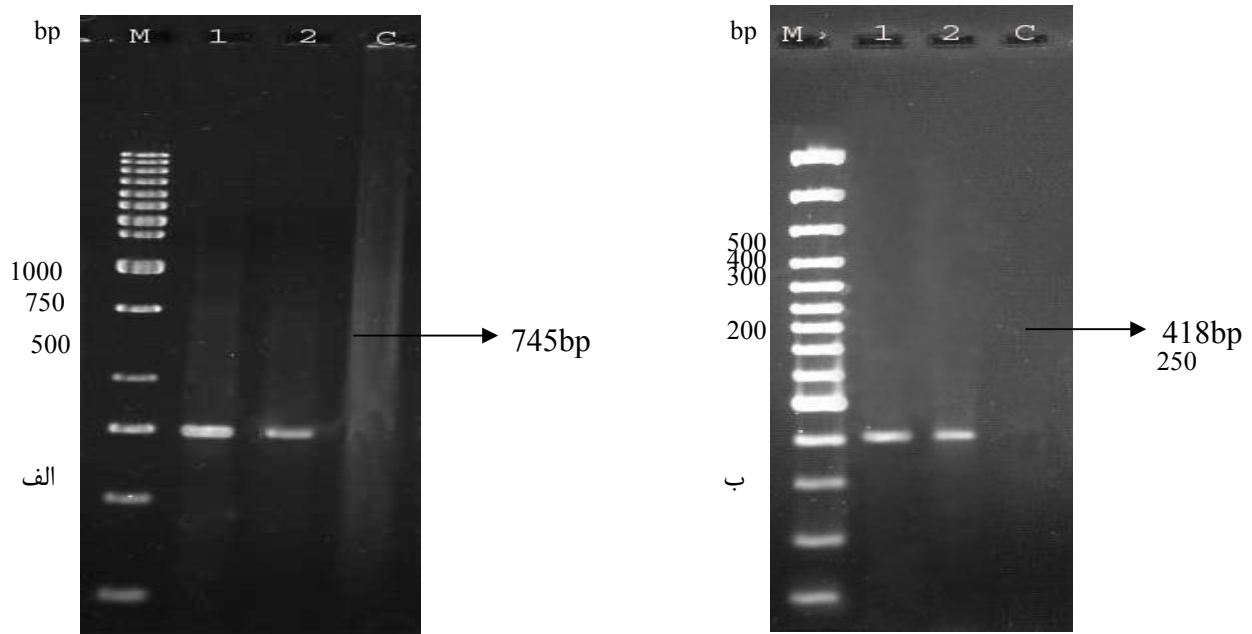
اعداد متن جدول میانگین ۳ تکرار می‌باشند.

اعداد هر ستون که با حروف یک‌سان نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

آغازگرها قادر به تکثیر این ژن در یک قطعه ۷۴۵ کیلوبازی در استرین UTPF-59 می‌باشند (شکل ۱ الف)، که این نتیجه‌گیری با یافته‌های ونگ و همکاران (۲۰۰۱) مطابقت دارد. ردیابی ژن *phlA* به‌وسیله آغازگرهای *phlA_f* و *phlA_r* نشان داد که استرین UTPF-59 دارای این ژن بود (شکل ۱ ب). این آغازگرها قادر به تکثیر ژن *phlA* در یک قطعه ۴۱۸ جفت بازی هستند، که این نتیجه‌گیری با یافته‌های رزونیکو و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. در ردیابی هر دو ژن از استرین CHA0 به عنوان شاهد مثبت و از بافر لیز کننده به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

دوفی و دفاگو (۱۹۹۹) بیان کردند که افزودن گلیسرول، گلوکز، مانیتول و فروکتوز به محیط کشت NBY در استرین CHA0 باعث افزایش تولید آنتی‌بیوتیک‌های فلوروگلوکوسینول و پیروول نیتیرین گردید. افزودن منابع کربنی فوق به استثناء گلوکز به محیط NBY، همچنین باعث افزایش تولید پایلوتئورین می‌گردد، گلوکز از تولید پایلوتئورین ممانعت می‌کند (دوفی و دفاگو، ۱۹۹۹).

ردیابی ژن‌های *phlA* و *phlD* به‌وسیله PCR
ردیابی ژن *phlD* با استفاده از تکنیک PCR و آغازگرهای *phl2a* و *phl2b* نیز نشان داد که این



شکل ۱: الف) ردیابی ژن *phlD* با استفاده از آغازگرهای *phl2a* و *phl2b* ، CHA0=۱ ، UTPF-59 =۲ ، C=شاهد منفی (بافر لایز)، M= نشانگر ژنومی یک کیلو جفت بازی (ب) ردیابی ژن *phlA* با استفاده از آغازگرهای *phlA_f* و *phlA_r* ، CHA0=۱ ، UTPF-59 =۲ ، C=شاهد منفی (بافر لایز)، M= نشانگر ژنومی ۱۰۰ جفت بازی

می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. با توجه به اینکه آنتی‌بیوتیک ۴۰۲- دی استیل فلوروگلوکوسینول به عنوان یک عامل موثر در کنترل بیولوژیکی شناخته شده است، ردیابی ژن‌های موثر در سنتز این آنتی‌بیوتیک، بررسی تنوع ژنتیکی سودوموناس‌های فلورسنت تولید کننده دی‌استیل فلوروگلوکوسینول و مطالعه جمعیت این باکتری‌ها در خاک و ریزوسفر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (ماورودی و همکاران، ۲۰۰۱).

دستیابی به اطلاعات ژنتیکی می‌تواند ما را در شناسایی و جداسازی عوامل بیوکنترل یاری نماید زیرا معمولاً مطالعات بیوکنترل با جمع آوری تعداد زیادی جدایه‌های باکتریایی آغاز شده و سپس آزمایش‌هایی برای قابلیت بازدارندگی بیمارگرها توسط آن‌ها صورت می‌گیرد. با توجه به این فرضیه که جدایه‌های دارای ژنوتیپ یک‌سان، عملکرد مشابهی دارند، جدایه‌های کم‌تری با اطمینان بیشتر برای تست‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای

یافته‌های شریفی‌تهرانی و همکاران (۱۹۹۸) و کارهای هاجدرن و همکاران (۱۹۸۹) مطابقت دارد. در هر دو استرین روش آغشته سازی خاک بر آغشته سازی بذور ارجحیت داشت. جی و همکاران (۱۹۸۰) در پژوهشی نشان دادند که کاربرد باکتری باسیلوس به صورت اضافه نمودن سوسپانسیون به خاک موثرتر از غوطه‌ور کردن ریشه‌ها در سوسپانسیون باکتری می‌باشد.

بررسی قدرت کلونیزاسیون ریشه لوبیا توسط استرین UTPF-59 در شرایط گلخانه

بر اساس نتایج محاسبه جمعیت اولیه باکتری‌ها روی بذور و تعیین جمعیت باکتری‌ها روی ریشه بعد از یک ماه در خاک سترون عاری از عامل بیمارگر می‌توان گفت که در هر دو استرین UTPF-59 و CHA0 جمعیت باکتری روی ریشه لوبیا نسبت به جمعیت اولیه باکتری-ها روی بذور (1×10^9 سلول باکتری) کاهش یافت (جدول ۱۰).

بررسی اثر استرین‌های باکتری در کاهش بیماری مرگ گیاهچه لوبیا ناشی از *R. solani* در شرایط گلخانه

در هر دو روش آغشته سازی خاک و آغشته سازی بذور با باکتری‌های آنتاگونیست هیچ‌یک از استرین‌ها نتوانستند به طور کامل از ایجاد بیماری ممانعت نمایند ولی در مقایسه با شاهد آلوده باعث کاهش بیماری شدند. در هر دو روش استرین UTPF-59 توانایی کم‌تری در کنترل بیماری مرگ گیاهچه لوبیا نسبت به استرین CHA0 داشته است (جدول ۶ و ۷). بررسی اثر استرین‌های باکتری بر روی فاکتورهای رشدی گیاه (وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی) پس از یک ماه نشان داد که در هر دو روش تیمار خاک و تیمار بذور استرین CHA0 افزایش بیش‌تری را روی وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی نسبت به استرین UTPF-59 داشته است (جدول ۸ و ۹).

ضریب همبستگی بین نتایج بازداری از رشد قارچ *R. solani* در شرایط آزمایشگاه با نتایج به‌دست آمده از کارهای گلخانه‌ای معنی‌دار نشد. این نتیجه‌گیری با

جدول ۶: بررسی اثر استرین‌های UTPF-59 و CHA0 در کاهش بیماری مرگ گیاهچه لوبیا در روش تیمار بذور

تیمار	درصد گیاهچه‌های سالم	درصد مرگ گیاهچه	درصد کاهش بیماری
CHA0	۵۰	۴۲/۸۵	۳۵/۷۲ ab
UTPF-59	۳۱/۲۵	۶۴/۲۸	۱۴/۲۹ bc
بنومیل	۶۲/۵	۲۸/۵۷	۵۰ a
شاهد آلوده	۱۸/۷۵	۷۸/۵۷	۰ c
شاهد سالم	۷۸/۵	۰	۷۸/۵۷ a

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار است.

اعداد هر ستون که با حروف یک‌سان نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۷: بررسی اثر استرین‌های UTPF-59 و CHA0 در کاهش بیماری مرگ گیاهچه لوبیا در روش تیمار خاک

تیمار	درصد گیاهچه‌های سالم	درصد مرگ گیاهچه	درصد کاهش بیماری
CHA0	۷۵	۲۰	۶۰ ab
UTPF-59	۵۰	۴۶/۶۶	۳۳/۳۴ bc
بنومیل	۵۰	۴۶/۶۶	۳۳/۳۴ bc
شاهد آلوده	۱۸/۷۵	۸۰	۰ c
شاهد سالم	۹۳/۷۵	۰	۸۰ a

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار است.

اعداد هر ستون که با حروف یک‌سان نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۸: بررسی اثر استرین‌های UTPF-59 و CHA0 بر روی فاکتورهای رشدی گیاه لوبیا در روش تیمار بذر

تیمار	میانگین وزن تر هوایی (گرم)	میانگین وزن خشک هوایی (گرم)	میانگین وزن تر ریشه (گرم)	میانگین وزن خشک ریشه (گرم)
CHA0	۲/۳۴۵ bc	۰/۱۹۷ bc	۰/۸۹ bc	۰/۲۳۷ bc
UTPF-59	۱/۶۷۲ c	۰/۲۳۲ bc	۰/۴۳ bc	۰/۱۹ bc
بنومیل	۲/۹۱ bc	۰/۴۴۵ ab	۰/۵۳۲ bc	۰/۱۸۷ bc
شاهد آلوده	۰/۸۷۵ c	۰/۱۳ c	۰/۲۳۵ c	۰/۰۹۵ c
شاهد سالم	۵/۹۲ a	۰/۶۱ a	۲/۰۵ a	۰/۷۷ a

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار است.

اعداد هر ستون که با حروف یک‌سان نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۹: بررسی اثر استرین‌های UTPF-59 و CHA0 بر روی فاکتورهای رشدی گیاه لوبیا در روش تیمار خاک

تیمار	میانگین وزن تر هوایی (گرم)	میانگین وزن خشک هوایی (گرم)	میانگین وزن تر ریشه (گرم)	میانگین وزن خشک ریشه (گرم)
CHA0	۳/۶۲۵ ab	۰/۴۵۲ ab	۱/۰۷۷ ab	۰/۳۲۵ ab
UTPF-59	۲/۰۱ bc	۰/۳۳۲ bc	۰/۵۰۷ b	۰/۱۵۲ bc
بنومیل	۱/۸۳۲ bc	۰/۲۵۵ bc	۰/۴۳ b	۰/۱۴۷ bc
شاهد آلوده	۱/۲۴۷ c	۰/۱۲۷ c	۰/۳۲۷ b	۰/۰۴۲ c
شاهد سالم	۵/۱۷ a	۰/۶۷ a	۱/۵۱ a	۰/۳۵۷ a

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار است.

اعداد هر ستون که با حروف یک‌سان نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

جدول ۱۰: مقایسه قدرت کلونیزاسیون ریشه لوبیا توسط جدایه‌های سودوموناس‌های فلورسنت در شرایط عاری از

بیمارگر

استرین‌های باکتری	میانگین تعداد باکتریها در هر گرم ریشه
CHA0	$2/39 \times 10^4$ a
UTPF-59	$2/07 \times 10^4$ ab

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار است.

اعداد هر ستون که با حروف یک‌سان نشان داده شده‌اند، در سطح ۵٪ بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

سپاسگزاری

بخشی از هزینه انجام این پژوهش از بودجه مرکز قطب کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران تامین گردیده است که بدین‌وسیله از مسئولین محترم این مرکز قدرانی می‌شود.

ریشه گیاهان ظرفیت معینی از نظر میزان کلونیزاسیون دارد. سودوموناس‌ها ریشه گندم را با جمعیت 10^5 - 10^6 باکتری در هر گرم ریشه کلونیزه می‌کنند (وینسنت و همکاران، ۱۹۹۱). جمعیت‌های کم‌تر از این مقدار قادر به تاثیر مثبت روی گیاه و بیوکنترول نمی‌باشند (ولر و همکاران، ۲۰۰۲).

منابع

- جمالی، ف.، شریفی تهرانی، ع.، اخوت، م. و زاگری، زهرا. ۱۳۸۳. بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* بر قارچ *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی نخود ایرانی. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز، ج ۲، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز، ص ۱۸۴.
- خاطری، ه. ۱۳۸۱. بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Phytophthora drechsleri* عامل بوته میری فیتوفترایی خیار. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۸۸ صفحه.
- رضائی باغمیشه، م.، شریفی تهرانی، ع.، زاد، ج.، روحانی، ح. و زاگری، زهرا. ۱۳۸۳. بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Fusarium oxysporum* عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز در گلخانه و شرایط مزرعه. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز، ج ۲، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز، ص ۲۳۹.
- شکیبا، ب. ۱۳۸۳. بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست روی قارچ *Tiarospora phaseolina* عامل پوسیدگی زغالی سویا (لوبیا روغنی). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۴۴ صفحه.
- صابری ریشه، ر.، شریفی تهرانی، ع.، حجارود، ق. و محمدی، م. ۱۳۸۳. بررسی اثر چند باکتری آنتاگونیست بر *Phytophthora citrophthora* عامل بیماری گموز (پوسیدگی طوقه و ریشه) پسته. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز، ج ۲، بیماری‌های گیاهی و علف‌های هرز، ص ۳۸۱.
- Alstrom, S. and Burns, R. G. 1989. Cyanid production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biol. Fertil. Soils*, 7:232-238.
- Bangera, M. G. and Thomashow, L. S. 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2, 4- diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *J. Bacteriol*, 181: 3155-3163.
- Burr, T. J., Scroth M. N. and Suslow, T. 1978. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P.putida*. *Phytopathology*, 68:1377-1383.
- Castric, K. F. and Castric, P. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol*, 45: 701-702.
- Duffy, B. K. and Defago, G. 1999. Enviromental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol*, 65: 2429-2438.
- Gould, W. D., Hagedorn, C., Bardinelli, R. T. and Zablutowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol*, 49: 28-32.
- Hagedorn, C., Gould, W. D. and Bradinelli, R. T. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Appl. Environ. Microbiol*, 55:2793-2797.
- Jee, H. J., Nam C. G. and Kim, C. H. 1980. Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red-pepper. Isolation of antagonistic and evaluation of antagonistic activity *in vitro* and greenhouse. *Korean J. Plant Pathol*, 4: 305-312.
- Kaiser, W. J., Hannan R. M. and Weller, D. M. 1989. Biological control of seed rot and pre-emergence damping-off of chickpea with fluorescent pseudomonads. *Soil. Biol. Biochem*, 21: 269-273.
- Keel, C. and Défago, G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. pp: 27-46. In: Gange, A. C. and Brown, V. K. (Eds). *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Blackwell Scientific Publishers, London, England.
- Keel, C., Voisard, C., Berling, C-H., Kahr, G. and Défago, G. 1989. Iron sufficiency, a prerequisite for the suppression of tobacco black root-rot by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*, 79:584-589.

- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintz, M. and Schroth, M. N. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease suppressive soils. *Current Microbiol*, 4: 317-320.
- Kraus, J. and Loper, J. E. 1990. Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: mechanistic studies. pp. 172-175. In: Keel, C., Koller, R. and Defago, G. (Eds). Plant growth-promoting rhizobacteria. The 2nd int. Workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, Interlaken, Switzerland.
- Leong, J. 1986. Siderophore: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology*, 24: 187-209.
- Maurhofer, M., Keel, C. Haas D. and Defago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant pathol*, 44: 40-50.
- Mavrodi, O. V., McSpadden Gardener, B. B., Mavrodi, D. V., Bonsall, R. F., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 91:35-43.
- Picard, C., Di Cello, F. Ventura, M., Fai, R. and Guckert A., 2000. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol -producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl. Environ. Microbiol*, 66: 948-955.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol*, 63: 881-887.
- Raaijmakers, J. M., Bonsall R. F. and Weller, D. M. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 89: 470-475.
- Rachid, D. and Ahmed, B. 2005. Effect of iron and growth inhibitors on siderophores production by *Pseudomonas fluorescens*. *African J. Biotechnol*, 4: 697-702.
- Rezzonico, F., Moënne-Loccoz, Y. and Défago, G. 2003. Effect of stress on the ability of a *phlA*-based quantitative competitive PCR assay to monitor biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Appl. Environ. Microbiol*, 69: 686-690.
- Scher, F. M., Zeigle, J. S. and Kloepper, J. W. 1983. A method for assaying the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Can. J. Microbiol*, 30:151-157.
- Schipper, B., Bakker, A. W. and Bakker, A. H. M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Ann. Rev. Phytopathology*, 25: 339-359.
- Schwyn, B. and Neilands, J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 160: 47-56.
- Sharifi –Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz Y. and Defago, G. 1998. Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4–diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *Eur. J. Plant Pathol*, 104:631-643.
- Stutz, E., Defago, G. and Kern, H. 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonad involved suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology*, 76: 181-185.
- Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J., Kovacevich, P., Mukerji, P., Weller, D. M. and Pierson, E. A. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soil-borne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol*, 57: 2928-2934.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. and Defago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* help suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *J. EMBO*, 8: 351-358.
- Wang, C., Ramette, A., Punjasamarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y. and Défago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD* containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiol, Ecol*, 37: 105-116.
- Weller, D. M. and Cook, R. J. 1983. Suppression of take all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73: 463-469.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B. and Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathology*, 40: 309-348.

Study on Some Biological and Molecular Characteristics of *Pseudomonas fluorescens* Strain UTPF-59 in Control of *Rhizoctonia solani* on Bean

Afsharmanesh¹, H., Ahmadzadeh², M., Javan-Nikkhah², M. and Sharifi-Tehrani³, A.

Abstract

In this study antagonistic activity of *Pseudomonas fluorescens* UTPF-59 against *Rhizoctonia solani*, the causal agent of bean damping-off *in vitro* and *in vivo* was assessed. Production of secondary antifungal metabolites such as HCN, siderophore and protease by *P. fluorescens* UTPF-59 *in vitro* were evaluated. Results showed that *in vitro*, strain UTPF-59 reduced mycelial growth of *R. solani* more than strain *P. fluorescens* CHA0. Average of inhibition zone in strain UTPF-59 was 15mm while it was 10mm in strain CHA0. Strain CHA0 had more effect on control of bean damping off *in vivo*, disease intensity in CHA0 for soil drenching and seed coating was 60% and 35.72%, respectively, while UTPF-59 reduced the disease by 33.34% and 14.29% in soil drenching and seed coating respectively. Strain UTPF-59 produced siderophore, HCN and protease *in vivo*. In strain UTPF-59 involvement of siderophore, volatile and non-volatile metabolites on inhibitory of mycelial growth of *R. solani in vitro* was observed. Investigation on colonization of root of bean in absence of the pathogen showed that population of both bacteria reduced by 10^4 cfu g⁻¹ root as compared with primary population of the bacteria on seeds (10^9 cfu seed⁻¹) after one month. In this survey, detection of *phlD* and *phlA* genes (responsible for biosynthesis of diacetylphloroglucinol) was evaluated with PCR. Both genes detected in strain UTPF-59.

Key words: *Pseudomonas fluorescens* UTPF-59, *Rhizoctonia solani*, Antifungal metabolites, *phlD*, *phlA*