ردیابی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن در سودوموناس‌های فلورسنت بازدارنده رشد *R. solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند

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

مریم کنجدی[1]، جعفر وطن‌دوست[2]*و علی‌اکبر جنت‌آبادی[3]

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

م. کنجدی، ج. وطن دوست و ع.ا. جنت آبادی. ۱۳۹٤. ردیابی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن در سودوموناس‌های فلورسنت بازدارنده رشد *R. solani* عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند. **چغندرقند، ۳۱(۱): ۵۹- ٤۹**

چکیده

برای ردیابی ژن سیانید هیدروژن و تعیین قابلیت سودوموناس‌های فلورسنت در تولید سیانید هیدروژن و بازدارندگی از رشد بیمارگر *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند از ریزوسفر مزارع چغندرقند سبزوار نمونه‌برداری شد. پس از جمع‌آوری نمونه‌های خاک و خالص‌سازی، ۳۱ سویه سودوموناس جداسازی شده و در محیط اختصاصی سودوموناس آگارF، سودوموناس‌های فلورسنت براساس آزمون‌های میکروبی تفکیک و شناسایی شدند. نتایج PCR برای ردیابی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن نشان داد که سه سویه حاوی ژن بیوسنتز سیانید هیدروژن بودند. در بررسی کیفی تولید سیانید هیدروژن در محیط کشت میکروبی نیز مشخص شد که این سویه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن را به مقادیر مختلف دارند. جهت بررسی میزان بازدارندگی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ *R. solani*، درصد کاهش رشد قارچ در حضور باکتری محاسبه گردید. از میان سه سویه سودوموناس فلوروسنت، نمونه C7 بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ و بیشترین مقدار تولید سیانید هیدروژن را داشت که به‌عنوان کاندیدای مناسب بیوکنترل معرفی می شود.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی ریزوکتونیای ریشه و طوقه، چغندرقند، سودوموناس‌فلورسنت، کنترل بیولوژیک

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

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

۳- استادیار گروه دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار

مقدمه

چغندرقند یکی از گیاهان مهم صنعتی است که عامل تولید یکی از اساسی‌ترین نیازهای ابتدایی جامعه یعنی قند و شکر می‌باشد. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند، پوسیدگی ریشه می‌باشد (Hecker and Ruppel 1977). پوسیدگی ریشه در مزارعی که ریشه چغندرقند در معرض رطوبت بیش از حد معمول خاک قرار می‌گیرد، مشاهده شده است (Habibi 1975). عامل پوسیدگی‌های ریشه و طوقه، پوسیدگی خشک و پوسیدگی بنفش ریشه چغندرقند، قارچی از جنس Rhizoctonia است که گونه معروف آن *Rhizoctonia solani* می‌باشد و در خاک زندگی می‌کند. این قارچ به ریشه چغندرقند حمله می‌کند 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 (Sheikholeslam *et al.* 2006). از آن‌جایی که این گونه عامل پوسیدگی ریشه و طوقه، مرگ گیاهچه و بلایت برگی چغندرقند بوده و تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از جمعیت آن گزارش گردیده است، لذا به آن گونه مرکب اطلاق شده است (Vilgalys and Cubeta 1994). گونه *R. solani* اولین بار در ایران از گیاه سیب‌زمینی و کاج ایرانی توسط شریف و ارشاد و از گیاه لوبیا توسط منوچهری و قنادزاده گزارش گردید (Ershad 1977Balali and Moharabi 2006). علاوه‌بر *R. solani*، قارچ‌های بیماری‌زای بسیار دیگری سبب ایجاد پوسیدگی ریشه چغندرقند در مراحل مختلف می‌شوند (Whitney and Duffos 1991). قارچ Fitzp Pythiumaphanidermatum (Edson) به‌عنوان یکی از عوامل فساد بذر، مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه در ایران شناخته شده است (Ahmadinejad and Okhovat 1976). هم‌چنین از قارچ Rhizopus arrhizus Fischer به‌عنوان یکی از عوامل پوسیدگی طوقه چغندرقند در ایران نام برده شده است (Habibi 1977).

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

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

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

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

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

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

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

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

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

جهت کشت باکتری، ابتدا سوسپانسیونی از ۱۰ گرم مخلوط نمونه‌های هر مزرعه با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه و به‌مدت دو ساعت راکد ماند تا مایع رویی شفاف شود. سپس از هر نمونه کشت خطی روی محیط سودوموناس آگارF انجام شد. بعد از انکوباسیون به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸°C، پرگنه‌های رشد یافته از لحاظ شکل ظاهری کلونی‌ها، قطر و هاله کلونی‌ها، رنگ و اندازه کلونی بررسی شدند. در مرحله بعد پرگنه‌ها مجدداً جهت خالص‌سازی روی محیط سودوموناس آگارF رشد داده شدند و تا زمان رسیدن به تک کلونی واکشت انجام شد.

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

ردیابی ژن *hcnBC*

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

DNAهای استخراج شده با استفاده از آغازگرهای طراحی شده hcn-F وhcn-R (جدول ۱) مورد آزمون PCR

قرار گرفتند. طراحی پرایمر با نرم‌افزار GeneRunner انجام شد. PCR در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ µl شامل 20 ng DNA، ۲/۵ µl بافر 10 X PCR، ۱/۵ µl از $MgCl_2$50 mM، ۱ µl dNTP 10 mM، ۱ µl از 0.2 mM هر پرایمر، ۰/۵ واحد آنزیم Taq polymerase و با شرایط زیر انجام گرفت: واسرشت شدن اولیه در ۹۴ °C به مدت چهار دقیقه، سپس سی چرخه شامل ۶۰ ثانیه در ۹۴°C، ۶۰ ثانیه در ۵۲ °C و دو دقیقه در ۷۲ °C انجام شد. پس از این مراحل نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ °C به منظور حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها قرار گرفتند. روش کار و غلظت مواد مصرفی برای تمامی نمونه‌ها یکسان بود. جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TAE 1X استفاده گردید. ژل با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد و در دستگاه ژل نگار مورد بررسی قرار گرفت. تکرارهای متوالی و تغییر شرایط (گرادیان دمایی، گرادیانDNA، گرادیان $MgCl_2$) با هدف باند گرفتن از نمونه‌ها انجام شد.

جدول ۱ آغازگرهای PCR مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های بیوسنتز hcnBC

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

تولید سیانید هیدروژن در جدایه‌ها

این آزمون با هدف میزان تولید سیانید هیدروژن توسط هریک از نمونه‌های سودوموناس فلورسنت به روش آلستروم و برانز (Alström and Burns 1989) انجام شد. ابتدا کاغذ صافی را روی درب تشتک قرار داده و سپس تشتک‌ها استریل شد. محیط کشت نوترینت آگار (NA) همراه با گلایسین (۴/۴g/l) آماده و استریل شد و پس از سرد شدن به داخل تشتک‌های استریل ریخته و بعد از ۲۴ ساعت جدایه‌ها به صورت خطی کشت داده شد. کاغذ صافی را با دو میلی‌لیتر محلول اسید پیکریک استریل خیس کرده و روی محیط گذاشته شد. درب تشتک‌ها را بسته و با پارافیلم محکم کرده و به منظور تولید متابولیت‌های گازی تولید شده توسط ریزوباکتری‌های آنتاگونیست، اجازه واکنش با اسید پیکریک روی سطح محیط کشت داده شد. پس از انکوباسیون به‌مدت یک هفته در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد تغییر رنگ کاغذ صافی را که نشانه پتانسیل تولید سیانیدهیدروژن در ریزوباکتریای آنتاگونیست است مورد ارزیابی قرار گرفت.

بازدارندگی از رشد بیمارگر

جهت به دست آوردن قارچ *R. solani*، ابتدا قطعاتی به ابعاد ۱×۱×۱ سانتی‌متر از چغندرهای سالم و آلوده جدا شد. بعد از استریل کردن، نمونه‌ها به‌صورت مجزا در وسط تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA قرار گرفتند و به‌مدت یک هفته در دمای ۲۵°C انکوبه شد. برای شناسایی کامل قارچ از روش پارمتر و وایتنی (Parmeter Jr and Whitney 1970) استفاده گردید و جهت انتخاب دمای بهینه رشد، رشد قارچ در دماهای مختلف صورت گرفت.

برای بررسی توان بازدارندگی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از رشد قارچ *R. solani* از کشت متقابل باکتری و قارچ در محیط کشت PDA استفاده شد. ابتدا باکتری در تمام سطح تشتک پتری کشت شد. پس از کشت باکتری به‌مدت ۲۴ساعت و در دمای ۲۵°C، از حاشیه کشت جوان سه روزه قارچ عامل بیماری، دیسکی به اندازه ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر به صورت وارون در وسط تشتک پتری که باکتری رشد کرده بود قرار داده شد. به‌دنبال انکوباسیون تشتک پتری ها در دمای ۲۵°C به مدت ۴۸ ساعت، رشد یا عدم رشد قارچ در کشت متقابل و در حضور باکتری بررسی گردید.

این آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً تصادفی در شش تکرار انجام شد و میزان رشد میسلیوم قارچ در حضور باکتری اندازه گیری شد. داده‌های به‌دست آمده از آزمایش مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SAS تحلیل گردید. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن ($P\geq 1\ \%$) انجام شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

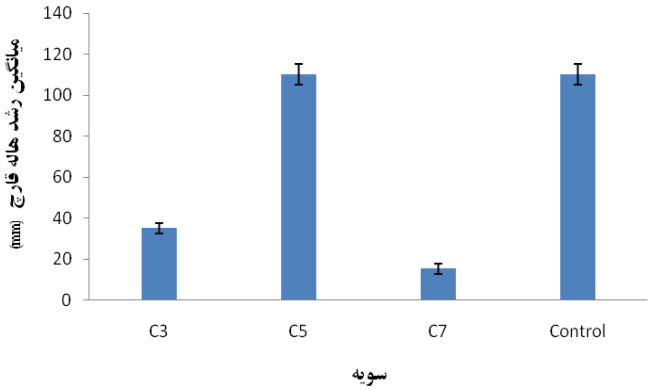
بر اساس آزمون‌های انجام شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی، ۳۱ سویه باکتری سودوموناس جداسازی شد که از بین این سویه‌ها، سه سویه به‌عنوان سودوموناس فلورسنت شناسایی شدند. این سه سویه از مزرعه C شناسایی شدند که با نام‌های C3,C5,C7 بودند. نتایج آزمون‌های شناسایی در جدول ۲ آمده است.

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

سویه باکتری	گرم	اکسیداز	کاتالاز	سیترات	نیترات	ذوب ژلاتین	حرکت	تولیدH2S	ایندول	MR	VP	مقاومت به کاناماسین	شکل	رشد هوازی	رشد بیهوازی
C3	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	حساس	میله‌ای	+	-
C5	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	حساس	میله‌ای	+	-
C7	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	حساس	میله‌ای	+	-

بررسی توان بازدارندگی بین قارچ و باکتری

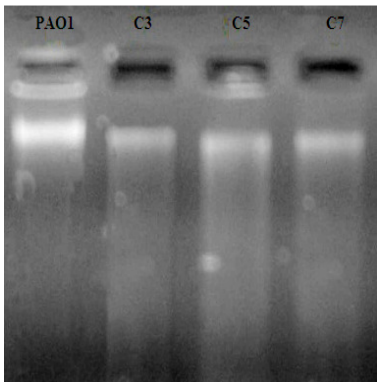
جهت بررسی میزان رشد قارچ *R. solani* در حضور جدایه‌های سودوموناس فلورسنت از آزمون کشت متقابل استفاده شد. بر اساس این آزمون و از نظر میزان رشد هاله قارچ در مقابل باکتری، نمونه C5 بیشترین میزان رشد هاله قارچ و نمونه C7 کمترین میزان رشد هاله را دارا بود (شکل ۱). این بدان معناست که سویه C7 بیشترین توان بازدارندگی، سویه C3 با بازدارندگی متوسط و سویه C5 بدون خاصیت بازدارندگی بود.



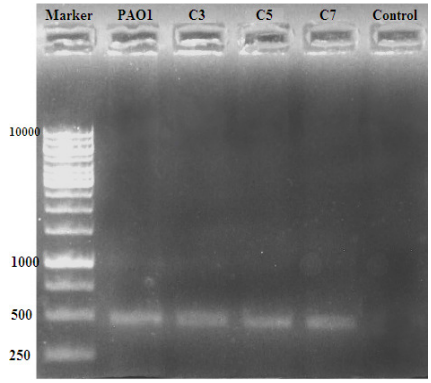
شکل ۱ میزان رشد هاله قارچ در برابر سویه‌ها

استخراج DNA

پس از استخراج DNA به روش KOH5%، کیفیت DNA استخـراج شده از نمونه‌ها، روی ژل الکتروفورز ۱٪ بـررسی شد تا از استخراج صحیح اطمینان حاصل شود (شکل۲).



شکل ۲ نتایج استخراج DNA



شکل ۳ الگوی باندی حاصل از PCR

آزمون PCR جهت ردیابی ژن *hcnBC*

با استفاده از روش PCR و به کمک آغازگرهای hcn-F وhcn-R قطعه DNA به طول تقریبی ۵۸۷ جفت باز از دسته ژنی بیوسنتز متابولیت ثانویه سیانیدهیدروژن تکثیر گردید. طول محصول انتظاری بین این پرایمرها، ۵۸۷ باز بود که شامل ۱۵۶ باز انتهایی از ژن hcnB و ۴۳۶ باز ابتدایی از ژن hcnC می‌باشد. بر اساس نتایج حاصل از این مرحله و مقایسه آن با سویه استاندارد PAO1، سویه‌های C3,C5,C7 واجد ژن بیوسنتز سیانیدهیدروژن بودند (شکل۲).

بررسی توانایی جدایه‌های آنتاگونیست در تولید سیانیدهیدروژن

در بررسی کیفی تولید سیانیدهیدروژن به‌روش آلستروم مشخص شد که تمام سویه‌ها توانایی تولید سیانیدهیدروژن را دارند، اما در مقدار تولید این گاز تفاوت‌هایی وجود دارد. در مورد مقادیر تولید سیانیدهیدروژن با توجه به‌شدت رنگ ایجاد شده ارزیابی می‌گردد. پس از انکوباسیون نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد، تغییر رنگ کاغذ صافی به

قهوه‌ای، نشانه تولید ضعیف سیانیدهیدروژن در ریزوباکتریای آنتاگونیست است. اگر رنگ کاغذصافی به قهوه‌ای متمایل به نارنجی تبدیل شود، تولید سیانیدهیدروژن متوسط می‌باشد و اگر تغییر رنگ به نارنجی مایل به قرمز باشد، تولید سیانیدهیدروژن قوی است. عدم تغییر رنگ به منزله عدم تولید سیانیدهیدروژن است که در هیچ نمونه‌ای مشاهده نشد. این مشاهدات نشان داد که بیشترین مقدار گاز توسط نمونه C7 بعد از نمونه شاهدPAO1 و کمترین مقدار در نمونه C5 تولید شده است.

بحث

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

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

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

باکتری‌های بیوکنترلی خاک در برابر بیمارگرهای منتقل شونده از راه خاک را می‌توان یکی از مؤثرترین و کارآمدترین مکانیسم‌هایی دانست که در کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی کمتر موردتوجه قرار گرفته است. این نتایج می‌تواند با بررسی‌های بیشتر در این زمینه جهت بررسی امکان استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان کود زیستی تکمیل گردد.

منابع مورد استفاده: References:

Adesina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K. Screening of bacterial isolates from various European soils for antagonistic activity towards Rhizoctonia solani and Fusarium oxysporum:Site-dependent composition and diversity revealed. Soil Biology and Biochemistry. 2007; 39(11): 2818-2828.

Adhikari A, Dutta S, Nandi S, Bhattacharya I, De Roy M, Sarkar G, Mandal T. Antagonistic potentiality of native rhizobacterial isolates against root rot disease of okra, incited by Rhizoctonia solani. African Journal of Agricultural Research. 2013; 8(4): 405-412.

Ahmadinejad A, Okhovat M. Pathogenicity test of some soil-borne fungi on some important field crops. Journal of Plant Pathology. 1976; 12: 13-17.

Alström S, Burns R. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soils. 1989; 7(3): 232-238.

Arcury T, Quandt S, Mellen B. An exploratory analysis of occupational skin disease among Latino migrant and seasonal farmworkers in North Carolina. Journal of Agricultural safety and Health. 2003; 9(3): 221-232.

Balali GR, Moharabi Z. Study of Intraspecific variation of anastomosis group AG-2 of Rhizoctonia solani isolated from lawn (*Lolium perene* L.) using pectic zymorgan marker. Iranian Journal of Biology. 2006; 19(3): 241-250 (In Persian)

Behbodi K, Sharifi A. The effects of pseudomonas fluorescent on fungus Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary, root rot of sunflower. Agricultural Sciences of Iran. 2006; 36(4): 791-803. (In Persian)

Ershad J. Fungi of Iran, Avin Publisher, Tehran, 1977; pp.52. (In Persian)

Gerhardson B. Biological substitutes for pesticides. Trends in Biotechnology. 2002; 20(8): 338-343.

Girard G, Barends S, Rigali S, Van Rij ET, Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV. Pip, a novel activator of phenazine biosynthesis in Pseudomonas chlororaphis PCL1391. Journal of bacteriology. 2006; 188(23): 8283-8293.

Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nature Reviews Microbiology. 2005; 3(4): 307-319.

Habibi B. Some observations on the ecology of Phytophthora drechsleri, a fungus causing sugar beet root rot. Journal of Plant Pathology. 1975; 11: 88-98.(In Persian)

Habibi B. Rubenkopffaule und deren beziehung zu dem pilz Rhizopus arrhizus. Ent. Phyt. Appliq. 1977; 45: 56-64.

Hecker R, Ruppel E. Rhizoctonia root rot resistance in sugar beet: breeding and related research. J. Am. Soc. Sugar Beet Technol. 1977; 19(3): 246-256.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology, Williams and Wilkins Publisher, Baltimore, 1994; pp.78

Jayaprakashvel M, Mathivanan N. Management of Plant Diseases by Microbial Metabolites. Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management. 2011: 237-265.

Kapsalis A, Gravanis F, Gowen S. Involvement of phenazine-1-carboxylic acid, siderophores and hydrogen cyanide in suppression of Rhizoctonia solani and Pythium spp. damping-off by Pseudomonas oryzihabitans and Xenorhabdus nematophila. Journal of Food Agriculture and Environment. 2008; 6(1): 168.

Kidarsa TA, Shaffer BT, Goebel NC, Roberts DP, Buyer JS, Johnson A, Kobayashi DY, Zabriskie TM, Paulsen I, Loper JE. Genes expressed by the biological control bacterium Pseudomonas protegens Pf5 on seed surfaces under the control of the global regulators GacA and RpoS. Environmental Microbiology. 2013; 15(3): 716-735.

Kumar B, Dube H. Seed bacterization with a fluorescent Pseudomonas for enhanced plant growth, yield and disease control. Soil Biology and Biochemistry. 1992; 24(6): 539-542.

Pal KK, Gardener BM. Biological control of plant pathogens. The plant health instructor. 2006; 2: 1117-1142.

Parmeter Jr J, Whitney H. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state Rhizoctonia solani, biology and pathology, University of California Press Publisher, Berkeley, 1970; pp.7-19.

Ramette A, Frapolli M, Défago G, Moënne-Loccoz Y. Phylogeny of HCN synthase-encoding hcnBC genes in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. Molecular Plant-Microbe Interactions. 2003; 16(6): 525-535.

Ramette A, Frapolli M, Saux MF-L, Gruffaz C, Meyer J-M, Défago G, Sutra L, Moënne-Loccoz Y. *Pseudomonas protegens sp*. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2, 4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. Systematic and applied microbiology. 2011; 34(3): 180-188.

Saharan B, Nehra V. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. Life Science and Medical Research. 2011; 21: 1-30.

Sheikholeslam M, Younesi H, Safaee D. Characterization of the fungi involved in sugar beet root rot and their distribution in Kermanshah province. Journal of Sugar Beet. 2006; 21(1): 99-100. (In Persian, abstract in English)

Shivani B, Dubey R, Maheshwari D. Enhancement of plant growth and suppression of collar rot of sunflower caused by Sclerotium rolfsii through fluorescent Pseudomonas. Indian Phytopathol. 2005; 58(1): 17-24.

Suresh A, Pallavi P, Srinivas P, Kumar VP, Chandra SJ, Reddy SR. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Reserch. 2010; 4(14): 1491-1494.

Tian H, Riggs RD. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, Heterodera glycines. Journal of nematology. 2000; 32(4): 377.

Vilgalys R, Cubeta M. Molecular systematics and population biology of Rhizoctonia. Annual Review of Phytopathology. 1994; 32(1): 135-155.

Weller DM. Pseudomonas biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. Phytopathology. 2007; 97(2): 250-256.

Whitney E, Duffos J. Compendium of Beet Diseases and Insects, American Phytopathological Society Press Publisher, PaulMinnesota, USA, 1991; pp.76