نقش رقابت برای جذب آهن توسط سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل *Rhizoctonia solani* (Kühn) عامل مرگ گیاهچه لوبیا

روح اله شریفی* - مسعود احمد زاده - عباس شریفی تهرانی - وحید فلاح زاده[1]

تاریخ دریافت:۸۶/۱۱/۱۵
تاریخ پذیرش:۸۷/۶/۲۷

چکیده

سودوموناس‌هاس فلورسنت با به کارگیری مکانیسم‌های متعددی ازجمله رقابت بر سر کسب آهن به وسیله سیدروفور باعث کنترل بیمارگرهای خاکزاد می‌شوند. برای بررسی نقش سودوموناس‌های فلورسنت در رقابت برای جذب آهن در کنترل بیماری مرگ گیاهچه لوبیا، پنج استرین سودوموناس شامل سه استرین داخلی *Pseudomonas fluorescens* (UTPF5, UTPF61, UTPF76)، استرین *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 و موتانت پایووردین آن *P. aeruginosa* MPFM1 به کار برده شدند. میزان تولید سیدروفور این استرین‌ها به صورت کمی تعیین شد. استرین 7NSK2 با تولید ۶۲۵/۲۹ میکرومول پایووردین بیشترین مقدار تولید سیدروفور را به خود اختصاص داد. نقش غلظت‌های مختلف آهن در تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور به عنوان متابولیت‌های تحت تنظیم آهن بررسی شد. افزایش غلظت آهن به صورت معنی داری تولید سیانید هیدروژن را افزایش و تولید سیدروفور را کاهش داد. در آزمون گلخانه ای اثر کلاته کننده‌های آهن و سولفات روی، روی کاهش بیماری توسط استرین‌های آنتاگونیست مورد مطالعه قرار گرفت. کلاته کننده‌های آهن با فراهم آوردن آهن و درنتیجه کاهش تولید سیدروفور میزان بیوکنترل را کاهش دادند. بیشترین تاثیر کلاته کننده‌ها روی فعالیت استرین UTPF5 با ۷۶٪ بازداری از کنترل بود. این استرین در عدم حضور کلات‌های آهن علاوه بر کنترل بیماری باعث افزایش رشد گیاه در مقایسه با شاهد شد. استرین موتانت MPFM1 در مقایسه با استرین وحشی از قابلیت بیوکنترل پائین تری برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس‌های فلورسنت، سیدروفور، پایووردین، لوبیا، *Rhizoctonia solani*

مقدمه

اگرچه آهن از نظر فراوانی چهارمین عنصر خاک است اما در pH سازگار با رشد گیاهان به واسطه اکسیداسیون سریع و در پی آن تشکیل هیدروکسیدهای غیر محلول، آهن آزاد و قابل جذب خاک خیلی اندک است (۵). میزان آهن قابل جذب، با فسفر و کلوئیدهای خاک نیز ارتباط منفی دارد بنابراین غلظت در دسترس آن در خاک‌های کشاورزی که مصرف کودهای فسفره متداول است معمولا پائین است (۱۶). در فراریشه[2] به واسطه مصرف آهن توسط ریشه و میکرو فلور خاک غلظت آن کمتر هم می‌شود. غلظت پایین آهن محلول و نیاز بالای موجودات هوازی به آن، منجر به رقابت شدید برای جذب آهن (Fe^{3+}) در فراریشه می‌شود.

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، استاد، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
* - نویسنده مسئول Email: rsharifi@ut.ac.ir

2- Rhizosphere

آهن یک عنصر ضروری برای موجودات هوازی است در اغلب موارد کمبود آن یک فاکتور محدود کننده برای رشد و فعالیت میکروبی در خاک و به‌خصوص فراریشه محسوب می‌شود (۸). اغلب موجودات هوازی مکانیسم‌های فعالی را برای کسب آهن توسعه داده اند. در میکروارگانیسم‌ها این مکانیسم بر پایه ترشح سیدروفور و ایجاد کلات آهن- سیدروفور است. این کلات به‌وسیله میکروارگانیسم تولید کننده سیدروفور به‌طور اختصاصی شناسایی شده و جذب می‌گردد (۲۴). تولید این متابولیت تحت تاثیر جمعیت باکتری بوده و توسط سیستم Quorum sensing با ترشح سیگنال شیمیایی ان- اسیل همو سرین لاکتون (AHL)[1] تنظیم می‌شود (۲۲). کمبود آهنی که در نتیجه جذب آهن توسط جوامع فعال میکروبی و گیاهان به‌وجود می‌آید و بالا رفتن تراکم سودوموناس‌های فلورسنت در منطقه فراریشه که باعث افزایش تولید AHLs می‌شوند، شرایط را برای تولید سیدروفور در فراریشه مناسب می سازد. این فرضیه با استفاده از روش الایزا با آنتی بادی مخصوص پایووردین و ژن گزارشگر *inaZ* تحت کنترل پروموتور پایووردین اثبات شده است (۱۵). با توجه به رقابت شدید بر سر گرفتن آهن در فراریشه و میل ترکیبی بالای سیدروفور پایووردین برای آهن انتظار می‌رود این مولکول نقش مهمی در تامین آهن مورد نیاز سایر موجودات خاک داشته باشد. از دهه ۱۹۸۰ تا کنون مطالعات بسیاری در مورد نقش پایووردین تولید شده توسط سودوموناس‌های فلورسنت در بازداری بیمارگرهای خاکزاد و افزایش رشد گیاه انجام شده است. مطالعات روی نقش احتمالی پایووردین در بازداری بیمارگرهای خاکزاد با گزارش کلوپر و همکاران (۱۴) شروع شد که اظهار داشت افزودن استرین *Pseudomonas* sp. B10 یا پایووردین آن به خاک موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی و پاخوره غلات می‌شود. این گروه علاوه بر این نشان دادند که افزودن آهن به خاک اثر مثبت تلقیح باکتری و یا افزودن پایووردین به خاک را از بین می‌برد. نقش پایووردین‌ها در توان آنتاگونیستی تعدادی از سودوموناس‌های فلورسنت علیه بیمارگرهای گیاهی (*F. oxysporum*, *Pythium* spp.) و میکروارگانیسم‌های زیان آور[2] با استفاده از موتانت‌های که توانایی تولید سیدروفور را از دست داده بودند اثبات شده است (۹). علاوه بر این، مارهوفر و همکاران (۱۷) نشان دادند که استرین *P. fluorescens* CHA0 باعث القای مقاومت سیستمیک[3] (ISR) علیه ویروس موزائیک توتون می‌شود. در حالی که موتانت پایووردین این باکتری تاثیر خیلی کمی دارد. این نتیجه می‌تواند نشان دهنده اهمیت پایووردین در ایجاد ISR به‌وسیله استرین CHA0 باشد. در مورد *Arabidopsis thaliana* و بیمارگر *Peronospora parasitica* موتانت پایووردین استرین CHA0 همانند استرین وحشی به طور موثری باعث محافظت از گیاه می‌شد (۱۲). علاوه بر کنترل بیمارگر سیدروفور پایووردین به عنوان منبعی برای تامین آهن گیاهان نیز مطرح است. افزودن آهن- پایووردین در مقایسه با Fe-EDTA، به صورت بسیار معنی داری باعث افزایش رشد، میزان کلروفیل و آهن در *Arabidopsis thaliana* شده است (۲۳). در ایران نیز رسولی صدقیانی (۱) با استفاده از پیووردین متصل به آهن نشان دار نشان داد که سیدروفور نوع پیووردین سودوموناس‌های فلورسنت نقش مهمی در تامین آهن برای گندم ایفا می‌کند.

مواد و روش‌ها

انتخاب وشرایط نگهداری استرین‌های باکتری

از بین استرین‌های برتر کلکسیون باکتریهای آنتاگونیست در دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، بر اساس میزان‌هاله بازدارندگی علیه قارچ *R. solani* و همچنین تولید

1- N-acyl-homoserine lactone, AHL

2- Deleterious microorganism

3- Induced systemic resistance (ISR)

سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری، سه استرین UTPF5 (جدا شده از فراریشه پیاز، مازندران)، UTPF76 و UTPF61 (جداشده از مزارع برنج، الموت قزوین) انتخاب شدند.

استرین *P. aeruginosa* 7NSK2 جدا شده از مزارع جو در بلژیک به عنوان استرین مرجع مورد استفاده قرار گرفت (۱۱). طبق گزارش بویسنس و همکاران (۶) این استرین فاقد توانایی تولید آنتی بیوتیک‌های دی استیل فلوروگلوسینول و پیولوتئورین است و در شرایط کمبود فسفات می‌تواند پیوسیانین تولید کنند. وجود سه نوع سیدروفور پایووردین، پایوچلین و سالیسیلیک اسید در این استرین به اثبات رسیده است که باعث القای مقاومت به بیماریها می‌شوند.

استرین *P. aeruginosa* MPFM1 موتانت پایووردین استرین 7NSK2 و مقاوم به آنتی بیوتیک کانامایسین می‌باشد (*pvd-, kan+*). این استرین فاقد توانائی تولید سیدروفور نوع پایووردین می‌باشد. دو استرین آخر توسط دکتر میر حسن رسولی صدقیانی عضو هیت علمی گروه خاکشناسی دانشگاه ارومیه و از پروفسور هوفته از بلژیک تهیه شده اند.

از بین استرین‌های مورد استفاده استرین UTPF5 به علت تولید سیدروفور بالا و نتایج آزمایشات گلخانه ای انتخاب و آزمایشات تکمیلی روی سیدروفور آن صورت گرفت.

باکتریها روی محیط King's B مورب[1] داخل لوله آزمایش کشت داده شدند و بعد از رشد کامل، روی آن پارافین مایع دو بار استریل شده (اتوکلاو شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه) ریخته شد و در دمای منهای چهار درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

نگهداری در گلیسرول ۴۰٪: چند لوپ پر از باکتری کشت شده روی محیط کینگ بی به محیط NGY (بروث غذائی ۰/۸ گرم، گلیسرول ۴۰ میلی لیتر، عصاره مخمر ۰/۲ گرم، گلوکز ۰/۵ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل) اضافه شد و سوسپانسیون حاصل درون لوله‌های یک و نیم میلی لیتری درب دار در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۳).

اندازه گیری میزان تولید سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات (K_2HPO_4; 6.0 g/l, KH_2PO_4; 3.0g/l, $MgSO_4$. $7H_2O$; 0.2 g/l, NH_4SO_4; 1.0 g/l; succinic acid 4.0 g/l) به ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۴۰ میلی لیتر محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژ کردن در g۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر(PG^+ instruments T70) قرائت شد. داده‌های حاصله با استفاده از فرمول $A=\varepsilon BC$ به مول در لیتر تبدیل شد (۷).

A= میزان جذب　　ε = ضریب جذب مولی

B = قطر کوت　　C= غلظت ماده

نقش روی و آهن در تولید سیدروفور

غلظت‌های مختلف روی (۷۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرومول و شاهد همراه یا بدون افزودن ۵۰ میکرومول آهن)، آهن (۲۵، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومول) از استوک این عناصر که با فیلتر ۰/۲ میکرون و با دستگاه میلی پور استریل شده بود تهیه شده و به ارلن‌های حاوی ۴۰ میلی لیتر محیط کشت سوکسینات اضافه شدند. هر تیمار دارای سه تکرار بود.

برای تلقیح، استرین UTPF5 به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت سوکسینات در دمای ۲۷°C و ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط به محیط‌های جدید حاوی تیمارها منتقل شد و در شرایط مشابه با بالا و به مدت ۴۰ ساعت نگهداری شدند.

1- Slant

اندازه گیری جمعیت باکتری و تولید سیدروفور

سلول‌های باکتری با سانتریفوژ ۱۰۰۰۰g دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند و مایع روی برای تائین مقدار سیدروفور جدا شد. میزان رشد باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر و تولید سیدروفور نوع پایووردین در طول موج ۴۰۰ نانومتر به روش اسپکتروفتومتری محاسبه شد. با استفاده از ضریب مولی پایووردین این ایزوله میزان تولید پایووردین به صورت کمی به‌دست آمد.

نقش آهن در تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش آلستروم وهمکاران (۲) با کمی تغییرات استفاده گردید. محیط King's B که دارای ۴/۴ گرم گلایسین در لیتر می‌باشد، تهیه گردیده و اتوکلاو شد. هنگامی که دمای محیط اتوکلاو شده به حدود ۴۰ درجه سانتی گراد رسید غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰و ۲۰۰ میکرومول آهن از استوک یک میلی مول $FeCl_3.6H_2O$ (دراسید کلریدریک ۱۰ میلی مولار) که با فیلتر ۰/۲ میکرون استریل شده بود تهیه شد. محلول‌های حاصل در پتری‌ها ریخته شدند. هر پتری توسط ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تلقیح شد. سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد در قسمت درب پلیت قرار داده شد. یک پلیت نیز به عنوان شاهد بدون تلقیح باکتری در نظر گرفته شد. پلیت‌های پتری توسط نوار پارافیلم مسدود شد، تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی شکل از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری به عمل آید، آنگاه این ظروف به صورت واژگون به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتریها، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه ای روشن، قهوه ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ می‌یابد که به ترتیب از صفر تا چهار مقیاس دهی شدند. آزمایش با سه تکرار و در قالب طرح کرت‌های کاملا تصادفی انجام گرفت.

نقش سودوموناس‌های فلورسنت در افزایش رشد گیاه و کاهش بیماری

برای تهیه مایه تلقیح قارچ *R. solani* از روش پال وهمکاران (۱۹) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا قارچ روی محیط کشت PDA به مدت سه روز در دمای ۲۷°C کشت گردید. سپس پنج قطعه پنج میلی‌متری از این محیط کشت حاوی قارچ در یک ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ گرم بذر ارزن و مقدار ۴ گرم پودر برگ و ریشه لوبیا خیس خورده واتوکلاو شده قرار داده شد. این ارلن به مدت دو هفته در دمای ۲۷°C نگهداری شد.

روش آغشته سازی بذر با باکتری‌های آنتاگونیست

بذرهای لوبیا قرمز رقم ناز(تهیه شده از گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه تهران) به مدت سه دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد کلر فعال ضد عفونی سطحی شدند و با چهار بار شستشو در آب مقطر هیپو کلریت آن زدوده شد. به منظور آغشته سازی بذر به استرین‌های آنتاگونیست از روش ولر و همکاران (۲۵) استفاده شد. یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته هر استرین آنتاگونیست روی محیط کینگ بی، به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع کینگ بی منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۷°C قرار گرفتند. سلول‌های باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰g سانتریفوژ وچند بار با محلول نمک فیزیولوژیک (۰/۱۴ مول NaCl) برای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی شستشو شدند. سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفوژ مجدد از این محلول جدا سازی شده سوسپانسیون ۱×۱۰^{۹} آنها با استفاده از منحنی استاندارد با روش اسپکتروفتومتری در

محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز (Aldich, USA) تهیه گردید.

بذر لوبیا درون سوسپانسیون‌های باکتریایی ریخته شده و به مدت نیم ساعت روی شیکر با ۷۰ دور درقیقه در دمای C 27^{o} قرار داده شدند. در تیمار شاهد بذور درون کربوکسی متیل سلولز یک درصد فاقد باکتری غوطه ور شدند. بذرهای آغشته شده در معرض جریان هوای استریل هود گذاشته شدند تا خشک شوند.

اثر منابع آهن و روی در میزان بیوکنترل استرین‌های آنتاگونیست

این آزمون بر اساس آزمایشات فاکتوریل (۴×۶) و در قالب طرح کاملا تصادفی اجراء شد. فاکتور اول شامل پنج استرین باکتری و شاهد بدون باکتری و فاکتور دوم شامل کلات‌های آهن، سولفات روی و شاهد بود. با توجه به آزمایشات قبلی روی جدایه بیمارگر مقدار ۱/۵ گرم اینوکلوم بذر ارزن آلوده به *R.solani* برای تلقیح یک کیلوگرم خاک (۰/۴۳٪ مواد آلی کل، pH ۷/۷ و ۲/۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم آهن) به کار گرفته شد. بدین ترتیب که که نصف گلدان با خاک آلوده پر شد و سپس یک لایه خاک استریل به ارتفاع دو سانتی متر روی آن ریخته شد. سه عدد بذر لوبیا رقم ناز که با استرین‌های مختلف تیمار شده بود در خاک استریل کاشته شده و پس از ۲۴ ساعت میزان ۲۵ میلی لیتر از محلول یک میلی مولار کلاته کننده‌های Fe-EDDHA و Fe-EDTA و ۲۰ میلی گرم بر لیتر $ZnSO_4$ به گلدان‌ها اضافه شد. گلدان‌های کاشته شده در شرایط گلخانه (دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۹۰-۸۰٪) نگهداری شدند. برای حفظ رطوبت و جلوگیری از سله بستن سطح خاک، گلدان‌ها به صورت یک روز در میان و از طریق زیر گلدانی آبیاری شدند. بعد از سه هفته ریشه‌ها به ملایمت در زیر آب شسته شدند و شدت بیماری آنها با بر اساس مقیاس یک تا پنج و با استفاده از روش اصلاح شده کیم وهمکاران (۱۳) به صورت زیر ارزیابی شدند.

۰= گیاهان سالم بدون هیچگونه علائم آلودگی

۱= کمتر از ۲۰٪ ریشه آلوده شده و حداقل یک شانکر قهوه ای درشت داشته باشد

۲= حدود ۵۰٪ ریشه دارای شانکرهای تیپیک باشد.

۳= بیش از ۷۰-۶۰٪ ریشه دارای شانکر باشد

۴= مرگ گیاهچه پس از درآمدن از خاک (Postemergence)، طول گیاهچه کمتر از پنج سانتی متر باشد.

۵= مرگ گیاهچه قبل از در آمدن از خاک (Preemergence) یا پوسیدگی بذر

شاخص بیماری بر حسب درصد و با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\%DI = \frac{\sum_{i=1}^{n}(\text{مقیاس آلودگی} \times \text{گیاهچه های تیمار})}{5 \times \text{تعداد کل گیاهچه ها}} \times 100$$

مخرج کسر حداکثر مقیاس آلودگی × تعداد گیاهچه‌های کشت شده است که نتیجه آن حداکثر شدت بیماری ممکن می‌باشد. اثر تیمارها روی افزایش وزن تر و خشک بوته‌ها نیز محاسبه شد.

محاسبات آماری

تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات به روش حداقل تفاوت معنی دار[1] (LSD, P < ۰/۰۵) و با استفاده از روش مدل خطی SAS[2]، (SAS 9.1 SAS institute, Cary, NC) انجام گرفت. نرمال بودن پراکنش داده‌ها قبل از آنالیز آماری با نرم افزار SAS مورد آزمایش قرار گرفت. در مورد صفاتی که عدد صفر در بین آنها وجود داشت از تبدیل عددی $\sqrt{x+0.5}$ استفاده گردید. برای مقایسه اختصاصی

1- Least significant difference (LSD)
2- SAS general linear model procedure (GLM)

تیمارهای مورد نظر از رویه مقایسات گروهی مستقل استفاده شد.

نتایج و بحث

تولید سیانید هیدروژن استرین‌ها در غلظت‌های مختلف آهن

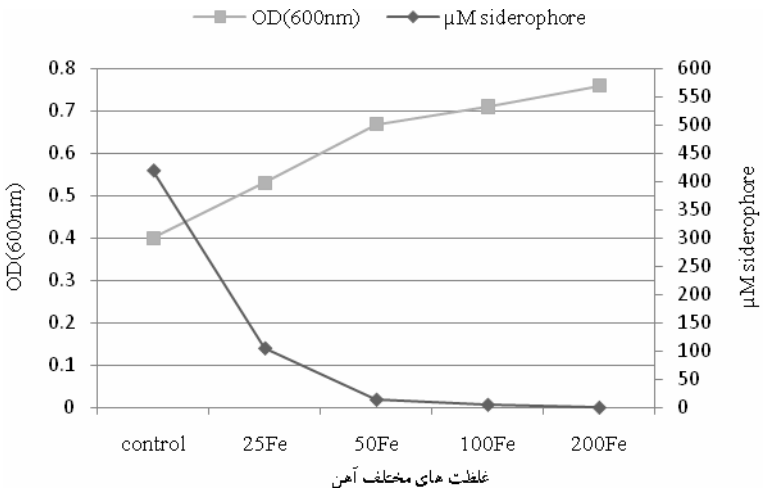
با توجه به اینکه یون آهن عامل مهمی در تنظیم تولید HCN می‌باشد غلظت‌های مختلف آهن به محیط کشت اضافه شد. استرین‌های خارجی مورد استفاده فاقد توانائی تولید سیانید هیدروژن بودند. اضافه کردن غلظت‌های مختلف آهن نیز باعث تحریک تولید این متابولیت نشد. در بین سایر استرین‌ها که از قابلیت بالائی در تولید سیانید هیدروژن برخوردار بودند که بیشترین مقدار مربوط به استرین UTPF5 بود. میزان تولید HCN در این استرین به شدت تحت تاثیر میزان آهن محیط بود به طوریکه با افزایش غلظت آهن میزان تغییر رنگ کاغذ صافی به وضوح قابل تمایز بود. در سایر استرین‌ها با اضافه کردن آهن میزان تولید بیشتر شد ولی اختلاف ایجاد شده نسبتا ضعیف بود (جدول ۱). در استرین UTPF76 بالا رفتن غلظت آهن به جای ایجاد تغییر رنگ در کاغذ صافی به وضوح باعث تغییر رنگ کلونی باکتری شد. شدت تغییر رنگ از زرد کمرنگ تا قرمز مایل به قهوه ای رابطه مستقیمی با غلظت آهن داشت. این رنگ ممکن است مرتبط با تولید آنتی بیوتیک فنازین باشد (دکتر Bakker مکاتبات شخصی).

جدول۱- اثر غلظت‌های مختلف آهن در تولید سیانید هیدروژن استرین‌های سودوموناس

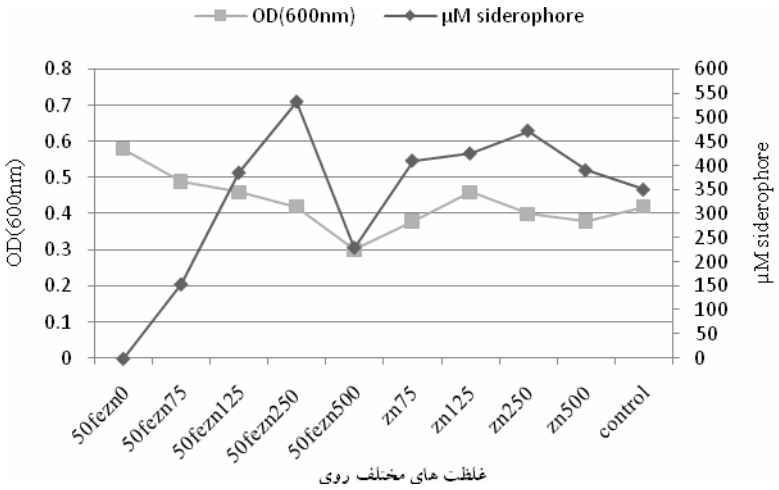
	غلظت‌های آهن				
استرین باکتری	شاهد	M۲۵µ	M۵۰µ	M۱۰۰µ	M۲۰۰µ
UTPF5	۱	۱	۲	۳	۴
UTPF61	۱	۱	۲	۲	۲
UTPF76	۳	۲	۴	۴	۴
7NSK2	۰	۰	۰	۰	۰
MPFM1	۰	۰	۰	۰	۰

نقش آهن و روی در تولید سیدروفور

وجود آهن در محیط کشت باعث کاهش معنی داری در تولید سیدروفور شد به طوری‌که در غلظت های بالای ۵۰ میکرومول تولید سیدروفور به صفر رسید در حالی‌که افزایش غلظت آهن به صورت معنی داری باعث افزایش رشد باکتری می‌گردید (شکل ۱). مطالعات ملکولی مشخص کرده است که بیان ژن های تولید سیدروفور تحت تنظیم میزان آهن محیط است لذا افزودن آهن نیاز به تولید سیدروفور را در این باکتری مرتفع می‌سازد (۲۴). همان‌طور که در شکل دو نشان داده شده است عنصر روی بر خلاف آهن، به صورت معنی داری باعث افزایش تولید سیدروفور شد. حتی در حضور ۵۰ میکرومول آهن که بازدارنده تولید سیدروفور است تیمارهای حاوی غلظت‌های مختلف روی میزان سیدروفور بالایی تولید کردند و در عین حال تولید بیوماس نیز در مقایسه با تیمارهای فاقد آهن بالاتر بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده و گزارش صدیقی و همکاران (۲۱) می‌توان تا حدودی علت تاثیر عنصر روی در بالا بردن کارائی سودوموناس های بیوکنترلی را به نقش تنظیمی مثبت آن در تولید سیدروفور نسبت داد. طبق گزارش روسباچ و همکاران (۲۰) افزایش روی باعث افزایش بیان ژن‌های تولید سیدروفور در استرین‌های پزشکی *P. fluorescens* می‌شود. محیط کشت سوکسینات دارای تولید سیدروفور بالایی است، ولی پایین بودن میزان تولید بیوماس آن در مقایسه با محیط های با منابع کربن تجاری مثل گلوکوز و سوکروز مانع آن می‌شد که این محیط برای تولید تجاری پیشنهاد شود. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که روی می‌تواند تا حدودی این مشکل را حل کند در عین حال که سایر کارایی‌های بیوکنترلی نیز در حضور این عنصر بهبود می‌یابد.



شکل ۱- رشد و تولید سیدروفور توسط ایزوله UTPF5در حضور غلظت‌های مختلف آهن



شکل ۲- رشد و تولید سیدروفور توسط ایزوله UTPF5 در حضور غلظت‌های مختلف روی با یا بدون ۵۰ میکرومول آهن

اندازه گیری میزان تولید سیدروفور در استرین‌ها

در این روش به صورت اختصاصی، مقدار تولید سیدروفور نوع پایووردین قابل ارزیابی است. نتایج به دست آمده از میزان جذب مایع روئی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب مولی پایووردین خالص به میکرومول پایووردین تبدیل شد. از بین استرین های مورد آزمایش 7NSK2 با تولید ۶۲۵/۲۹ میکرومول پایووردین بیشترین مقدار تولید را داشت و از لحاظ آماری با سایر استرین‌ها اختلاف معنی داری نشان داد. به دنبال آن UTPF61 ، UTPF5 و UTPF76 با تولید ۴۹۸/۸۲، ۴۸۷/۰۵ و ۲۳۴/۱۱ میکرومول پایووردین در گروههای بعدی قرار گرفتند. همان طور که انتظار می‌رفت موتانت MPFM1 فاقد توانایی تولید پایووردین بود.

استرین UTPF76 که در روش‌های کیفی مثل CAS- آگار بیشترین تولید سیدروفور را دارا بود در این روش جزء باکتری های برتر قرار نگرفت. همان‌طور که قبلا ذکر شد، روش اسپکتروفتومتری به صورت اختصاصی فقط قادر به تعیین کمیت سیدروفور نوع پایووردین است، چراکه سیدروفورهای مختلف طول موج‌های متفاوتی دارند. لذا می‌توان این چنین فرض کرد که استرین فوق الذکر علاوه بر پایووردین قادر است سیدروفور های دیگری را در حجم بالا تولید کند که عامل گسترش هاله نارنجی در محیط CAS- آگار می‌باشند.

درنتیجه از روی اختلافات موجود بین داده های روش های CAS- آگار و روش اسپکتروفتومتری می‌توان به تولید و مقدار تولید سیدروفورهای غیر از پایووردین در جدایه‌های سودوموناس‌های فلورسنت پی برد.

اثر منابع آهن و روی در کاهش بیماری *R. solani* به واسطه استرین‌های باکتری

به علت توان تهاجمی بالای جدایه قارچی به کار رفته در این آزمایش اکثر گیاهچه‌های شاهد دچار مرگ گیاهچه قبل و بعد از بالا آمدن از خاک شدند. از نتایج جدول تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها می‌توان چنین استنباط کرد که اغلب باکتری‌های مورد استفاده در این آزمایش به صورت معنی داری باعث کاهش شدت بیماری شدند. بیشترین بازدارندگی مربوط به استرین UTPF5 بود که شدت بیماری را تا ۷۰٪ کاهش داد. باکتری UTPF76 نیز کنترل رضایت بخشی را نشان داد. کمترین میزان بازدارندگی از بیماری مربوط به استرین موتانت MPFM1 بود، همان‌طور که در شکل چهار قابل مشاهده است این باکتری از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با شاهد آلوده نشان نداده است. اختلاف معنی دار بین استرین 7NSK2 به عنوان استرین وحشی با موتانت پایووردین همین باکتری گواهی بر اهمیت نقش این متابولیت در کنترل بیماری‌های گیاهی دست کم در این استرین است.

نتایج به دست آمده نشان داد که استرین‌های باکتریایی پاسخ مشابه ای به افزودن کلات‌های آهن و سولفات روی نشان ندادند. از بین استرین‌های مورد استفاده، بازدارندگی از بیماری در UTPF5 بسیار وابسته به تغییرات خاک بود. افزودن کلات کننده‌های آهن به خاک گلدان‌های حاوی این استرین به صورت بسیار معنی داری میزان کنترل بیماری را کاهش می‌داد. از بین دو کلات کننده مورد استفاده Fe-EDDHA بیشتر از Fe-EDTA باعث کاهش توان بیوکنترلی می‌شد. این اختلاف فقط مربوط به استرین UTPF5 نبود و در مورد سایر استرین‌ها نیز این روند با نرخ کمتری قابل مشاهده بود. همان‌طور که نتایج کاربرد عناصر نشان داد غلظت‌های بالای آهن محیط باعث بازداری کامل از تولید سیدروفور در باکتری‌ها می‌شوند. کلات کننده‌های آهن نیز با فراهم آوردن آهن قابل جذب برای باکتری مانع تولید سیدروفور در آن می‌شوند یا تولید آن را به شدت کاهش می‌دهند (۱۵). قابل توجه است که افزودن آهن در فرم‌های غیر کلات به خاک‌ها مخصوصا در خاک‌های آهکی ایران تاثیری زیادی در فراهم آوردن آهن برای گیاه و میکروارگانیسم‌های خاک ندارد. چراکه این آهن آزاد به سرعت هیدراته شده و به صورت هیدروکسیدهای آهن رسوب می‌کند، لذا قابل استفاده نیست (۳). در مورد کلات آهن Fe-EDTA نیز حالتی مشابه ایجاد می‌شود زیرا که پایداری این کلات در خاکهایی ایران پایین است و به سرعت قسمت اعظمی از آهن خود را از دست داده و آن را با عناصر فلزی دیگر مثل مس و روی جایگزین می‌کند (۱۶). آهن جدا شده از کلات رسوب می‌کند و از دسترس موجودات خاک خارج می‌شود، در عوض کلات‌های مس و روی ایجاد شده قابل استفاده هستند. در مورد استرین UTPF61 اختلاف بین کلات‌ها کاملا مشهود بود به

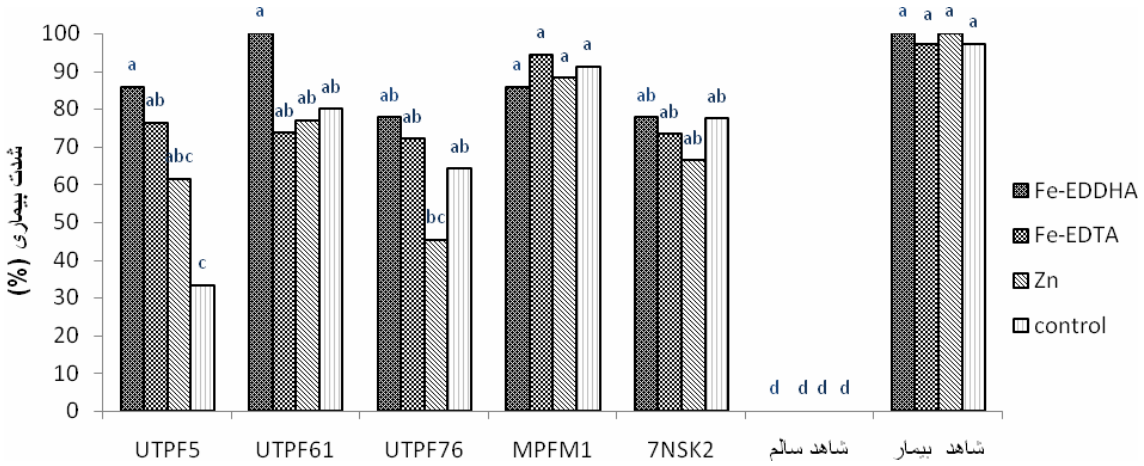
طوری‌که کلات آهن Fe-EDDHA باعث بازداری کامل از بیوکنترل باکتری می‌شد، اما کلات Fe-EDTA از لحاظ آماری هیچ تفاوتی با شاهد بدون کلات کننده نشان نداد. لازم به ذکر است که کلات‌های آهن علاوه بر اثری که در فراهم آوردن آهن برای باکتری دارند روی سایر موجودات درگیر در این پاتوسیستم یعنی بیمارگر و میزبان نیز اثر می‌گذارند، لذا فراهم آوردن آهن برای آنها نیز ممکن است عامل مهمی در ایجاد این نتایج باشند.

همان‌طور که قبلا ذکر شده است عنصر روی با افزایش دادن میزان تولید سیدروفور و بهبود پایداری باکتری در خاک می‌تواند اثر مثبتی را در بیوکنترل داشته باشد (۲۱). نتایج آزمایشات گلخانه ای نشان داد که روی باعث افزایش کارایی استرین‌ها در خاک می‌شوند هرچند این تغییرات در اغلب موارد معنی داری نمی شد. در بین استرین‌های مورد استفاده بیشترین اثر ناشی از افزودن سولفات روی در استرین UTPF76 مشاهده شد. در این تیمار شدت بیماری از ۶۵٪ در شاهد به ۴۵٪ کاهش یافت. با توجه به اثر مثبتی که این عنصر روی رشد گیاه دارد می‌توان کاربرد توام آن را با باکتری‌های آنتاگونیست توصیه کرد. توان بیوکنترل باکتری UTPF5 در این آزمایش به صورت منفی تحت تاثیر روی قرار گرفت، با افزودن سولفات روی میزان شدت بیماری به صورت معنی داری از ۳۳٪ به ۶۲٪ افزایش پیدا کرد. عنصر روی کوفاکتور تولید هورمون اکسین از تریپتوفان می‌باشد که در غلظت‌های پائین رشد گیاه را افزایش داده ولی در غلظت‌های بالا (بالاتر از یک میلی گرم در لیتر) باعث کاهش رشد مخصوصاً در ریشه می‌شود (۴). طبق تحقیقات انجام شده (داده‌ها منتشر نشده است) سویه UTPF5 دارای میزان تولید اکسین بالائی می‌باشد که در اثر افزودن روی این تولید افزایش یافته و ممکن است روی گیاه اثر منفی داشته باشد.

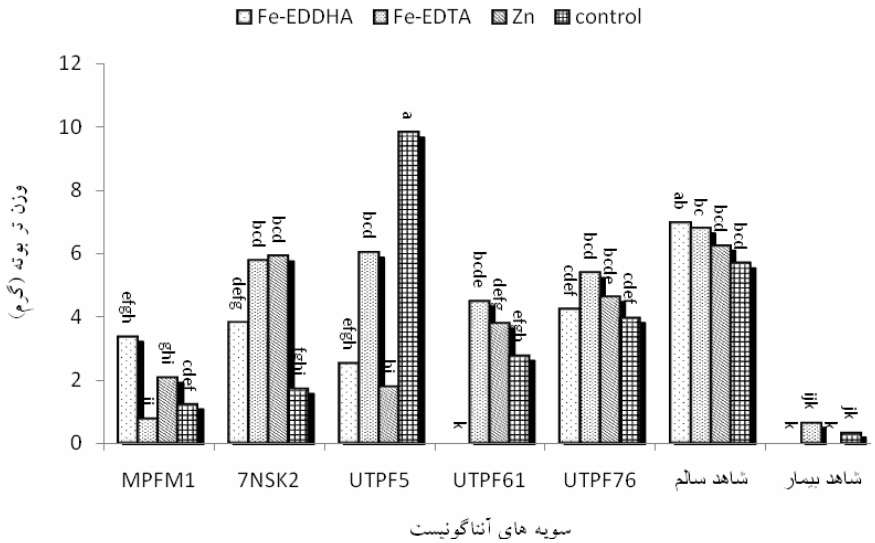
در آزمایش‌های توان بیوکنترل، تیمارها علاوه بر تاثیراتی که در کاهش بیماری داشتند رشد گیاه را نیز تحت تاثیر قرار دادند. در آزمایش قبلی مشخص شد که کلات آهن Fe-EDDHA به صورت معنی داری باعث افزایش رشد و تولید کلروفیل در گیاه می‌شود. در آزمایش بیوکنترل نتایج بدین گونه بود که در استرین‌های که مکانیسم کنترل آنها به نحوی مرتبط با میزان آهن خاک و در پی آن تولید سیدروفور بود افزودن کلات آهن نه تنها باعث افزایش رشد نمی‌شد بلکه وزن بوته را نیز به شدت کاهش می‌داد. افزودن این کلات و در کل کلات‌های آهن باعث افزایش شدت بیماری شد، درنتیجه بافت‌های ریشه نکروز شده و کارایی خود در فعالیت‌های فیزیولوژیکی طبیعی را به صورت جزیی یا کامل از دست دادند. این ریشه‌ها قادر به تامین نیازیهای گیاه نبودند و میزان محصول به شدت کاهش پیدا کرد. وزن بوته در تیمارهای دارای استرین MPFM1 به افزودن کلات‌های آهن پاسخ مثبت نشان داد. چراکه این استرین توان تولید پیووردین را ندارد و مکانیسم بیوکنترل آن وابسته به آهن نیست. همان‌طور که قبلا ذکر شد روی باعث افزایش کارایی باکتری‌های آنتاگونیست مورد آزمایش می‌شود به غیر از استرین UTPF5 که کارایی آن کاهش پیدا کرد. نتایج این اثر در وزن بوته نیز مشهود بود. تمام تیمارها دارای اثر متقابل مثبتی با روی بودند به غیر از باکتری UTPF5. در این آزمایش روی بیشترین اثر مثبت را روی باکتری 7NSK2 داشت ومیزان رشد گیاه را در مقایسه با تیمار بدون روی سه برابر افزایش داد. درمجموع داده‌های حاصل از تجزیه واریانس و مقایسه میانگین اثرات متقابل، تیمار UTPF5 بدون به کارگیری منابع آهن و روی به‌عنوان بهترین تیمار شناخته شد.

نتایج مقایسات گروهی مستقل (Orthogonal comparisons) نشان دادند که استرین MPFM1 به صورت بسیارمعنی داری چه در کنترل بیماری و چه در افزایش رشد

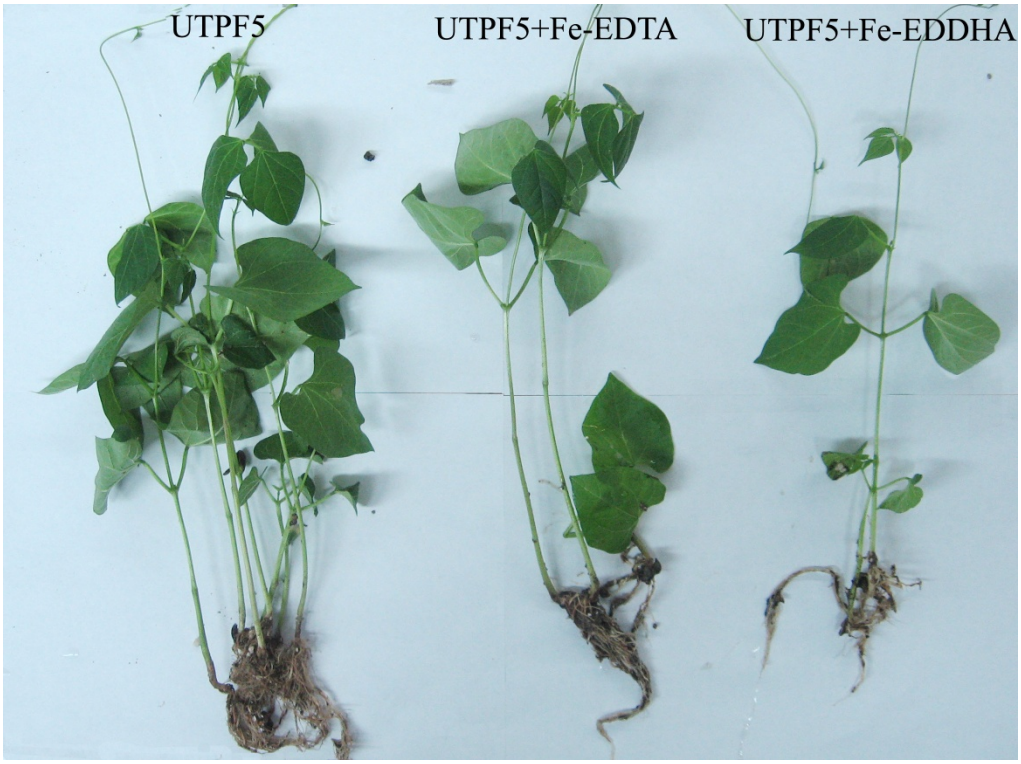
گیاه از استرین وحشی خود 7NSK2 ضعیف تر عمل می‌کند. با توجه به اینکه موتاسیون در این باکتری بر مبنای ترانسپوزون پنج و به صورت اختصاصی صورت گرفته لذا تنها تفاوت این دو استرین فقط مربوط به توانایی تولید سیدروفور آنهاست و در نتیجه اختلافات ایجاد شده در فعالیت بیوکنترلی و محرک رشد گیاهی این دو استرین نیز نتیجه همین توانایی است.



شکل۴- اثر استرین‌های مختلف باکتری در حضور کلات کننده‌های آهن و سولفات روی، روی شدت بیماری مرگ گیاهچه لوبیا با عامل *Rhizoctonia solani*. حروف روی ستون‌ها مربوط به مقایسه میانگین اثرهای متقابل در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی داری با هم ندارند.



شکل ۵- اثر استرین‌های مختلف باکتری در حضور کلات کننده‌های آهن و سولفات روی، روی افزایش وزن تر بوته‌های آلوده شده با *Rhizoctonia solani*. حروف روی ستون‌ها مربوط به مقایسه میانگین اثرهای متقابل در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. میانگین‌های دارای حروف مشابه در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی داری با هم ندارند.



شکل ۶: اثر افزودن کلات کننده‌های آهن در کاهش کنترل بیماری به‌وسیله استرین UTPF5. هر گروه مربوط به تمام بوته‌های زنده آن تیمار است

سپاسگزاری

از دکتر میر حسن رسولی صدقیانی عضو هیت علمی دانشگاه ارومیه برای تهیه استرین‌های مرجع، پروفسور Jean Marie Meyer برای کمک در استخراج پایووردین و از دکتر Peter A.H.M. Bakker به خاطر راهنمایی‌های فنی تشکر می‌گردد.

منابع

۱-رسولی صدقیانی، م.، خاوازی، ک.، رحیمیان، ح.، ملکوتی، م. ج.، اسدی رحمانی، ه. ۱۳۸۵. ارزیابی توان سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور. علوم خاک و آب. ۲۰(۱): ۱۴۳-۱۳۵.

2. Alstrom, S. and Burns, R. G. 1989. Cyanid production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biol. Fertil. Soil **7:** 232-238.
3. Banaei, M. H., Moameni, A., Baybordi, M., and Malakouti, M. J. 2005. The soils of Iran, new achievements in perception. Managements and use. Sana publications, Tehran. Iran.
4. Barazani, O.Z., Friedman, J. 1999. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? J. Chem. Ecol. 25: 2397-2406.
5. Budzikiewicz, H. 1997. Siderophores of fluorescent pseudomonads. Z. Naturforsch 52: 713–720.
6. Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J., and Hofte, M. 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdin in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Appl. Environ. Microbiol. 62: 865–871.

7. Castaneda, G. C., Munoz, T. J. J., and Videa, J. R. P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent Pseudomonas in the presence of copper and iron. Microchemical Journal 81: 35– 40.
8. Crowley, D. 2006. Microbial Siderophores in the Plant Rhizosphere. Pp.169–198, In L. L. Barton, and J. Abadía (Eds.). Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms, Springer, Netherlands.
9. Duijff, B. J., Meijer, J. W., Bakker, P. A. H. M., and Schippers, B. 1993. Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of Fusarium wilt of carnation by fluorescent Pseudomonads spp. Neth. Plant. Pathol. 99: 277–289.
10. Geels, F. P., Schmidt, E. D. L., and Schippers, B. 1985. The use of 8-hydroxyquinoline for the isolation and prequalification of plant growth-stimulating rhizosphere pseudomonads. Biol. Fertil. Soil 1: 167–173.
11. Hofte, M., Seong, K. Y., Jurkevitch, E., Verstraete, W. 1991. Pyoverdin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK2: Ecological significance in soil. Plant Soil 130: 249-257.
12. Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A., Metraux, J. P. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Mol. Plant-Microbe Interact. 16: 851–858.
13. Kim, D. S., Cook, R. J., and Weller, D. M. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root diseases of wheat grown with reduced tillage. Phytopathology 87: 551-558.
14. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M., Schroth, M. N. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. Current Microbiol. 4: 317–320.
15. Lemanceau, P., Robin, A., Mazurier, S., and Vansuyt, G. 2006. Implication of Pyoverdines in the Interactions of Fluorescent Pseudomonads with Soil Microflora and Plant in the Rhizosphere. Pp. 165-192, *In* A. Varma, and S. Chincholkar (Ed.). Microbal siderophore. Springer-Verlag, Berlin.
16. Lindsay, W. L. 1979. Chemical equilibria in soils. Wiley, New York.
17. Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Metraux, J. P., Défago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. Phytopathology 84: 139–146.
18. Meyer, J. M., Abdallah, M. A. 1978. The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: biosynthesis, purification and physico-chemical properties. J. Gen. Microbiol. 107: 319–328.
19. Pal, K. K., Tilak, K. V. B. R., Saxena, A. K., Dey, R., and Singh, C. S. 2001. Suppression of maize root diseases caused by *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium moniliforme* and *Fusarium graminearum* by plant growth promoting rhizobacteria. Microbiol. Res. 156: 209–223.
20. Rossbach, S., Wilson, T. L., Kukuk, M. L., Carty, H. A. 2000. Elevated zinc induces siderophore biosynthesis genes and a zntA-like gene in *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol. Lett. 191:61-70.
21. Siddiqui, I. A., Shaukat, S. S., Hamid, M. 2002. Role of zinc in rhizobacteria-mediated suppression of root-infecting fungi and root-knot nematode. J. Phytopathol. 150: 569–575.
22. Stintzi, A., Evans, K., Meyer, J. M., Poole, K. 1998. Quorum sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: lasR/lasI mutants exhibit reduced pyoverdine synthesis. FEMS Microbiol. Lett. 166: 341–345.
23. Vansuyt, G., Robin, A., Briat, J. F., Curie, C., and Lemanceau, P. 2007. Iron Acquisition from Fe-Pyoverdine by *Arabidopsis thaliana*. Mol. Plant-Microbe Interact. 20: 441–447.
24. Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I. L. 2007. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. Trends Microbiol. 15: 22-30.
25. Weller, D. M., Cook, R. J. 1983. Suppression of Take-All of Wheat by Seed Treatments with Fluorescent Pseudomonads. Phytopathology 78: 463-469.

Competition for Iron Uptake by Fluorescent Pseudomonads to Control of *Rhizoctonia Solani* Kuhn Causing Agent of Bean Damping-Off Disease

R. Sharifi* - M.Ahmadzadeh – A.Sharifi Tehrani – V.Fallahzadeh[1]

Abstract

Fluorescens pseudomonads can suppress soil-borne plant pathogens by employing several mechanisms such as competition for iron by means of siderophores. Three indigenous strains *Pseudomonas fluorescens* (UTPF5, UTPF61 and UTPF76), *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 and its pyoverdin mutant, MPFM1, were used for investigation the effect of iron competition on bean damping-off suppression. The rates of siderophore produced by strains were determined quantitatively. Results demonstrated that 7NSK2 with 625.29 µM had the most ability of pyoverdine production. Study of the role of different iron and zinc concentration on siderophore and HCN production exhibited that iron increased HCN and decreased siderophore production significantly. Appling of iron chelates and purified pyoverdine indicated that susceptibility to iron competition is correlated to type of chelates and fungi species. *Pythium aphanidermatum* and *R. solani* exhibited the most and the lowest susceptibility, respectively. Effects of iron chelates and zinc sulphate on biocontrol activity of strains were assessed in greenhouse condition. By providing of iron and subsequently decrease of iron competition, chelates reduced biocontrol activity especially in the case of UTPF5. This strain suppressed disease and increased plant growth in absence of iron chelates. Pyoverdine mutant, MPFM1, showed moderate biocontrol activity in compartion with wild type.

Keywords: Bean, Fluorescent Pseudomonads, *Rhizoctonia solani*, Siderophore

* - Corresponding author Email: rsharifi@ut.ac.ir
1- Contribution from Collrge of Agriculture University of Tehran