گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۸ شماره ۱، بهار ۹۴

شناسایی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور استان قزوین و بررسی اثر بازدارندگی آنها بر *Rhizobium vitis*، عامل گال ریشه و طوقه انگور

مونا اسمعیلی[۱] و علیرضا معرفت[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۲*- **نویسنده مسوول:** دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران (marefat@razi.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۷ تاریخ دریافت: ۹۳/۰۷/۰۷

چکیده

گال طوقه و ریشه ناشی از باکتری *Rhizobium vitis* از مهمترین بیماری‌های انگور در سراسر جهان به‌شمار می‌آید. از آنجایی‌که تاکنون کنترل شیمیایی موثری برای این بیماری ارائه نشده است، کنترل آن با برخی باکتری‌های آنتاگونیست مورد توجه قرار گرفته است. این پژوهش با هدف شناسایی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور استان قزوین و بررسی اثر آنتاگونیستی آنها بر *Rh. vitis* انجام شد. از نمونه‌های جمع‌آوری شده از خاک و ریشه و طوقه انگور در ۲۲ منطقه استان، ۲۱۰ جدایه به‌دست آمد و پس از گروه بندی، ۷۳ جدایه برای بررسی بیشتر انتخاب شدند. شناسایی جدایه‌ها با آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انجام شد. به‌علاوه، از آغازگرهای Bsub3R/Bsub5F برای تایید شناسایی جدایه‌های مشکوک به *Bacillus subtilis* استفاده شد. توانایی جدایه‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز بررسی گردید و جهت شناسایی جدایه‌های سودوموناس‌فلئورسنت دارای ژن‌های *Phl*D و *hcn*ABC، به‌ترتیب از آغازگرهای PhI2b/PhI2a و PM7-26R/PM2 استفاده شد. اثر آنتاگونیستی پنج جدایه، انتخاب شده از بین باکتری‌های مختلف شناسایی شده، بر باکتری عامل بیماری روی قطعات شلغم و هویج بررسی گردید. بر اساس نتایج، جدایه‌های آنتاگونیست به بیوارهای I، III و IV از *Pseudomonas fluorescens* و *B. subtilis* تعلق داشتند. همه جدایه‌های مذکور با تولید آنتی‌بیوتیک از رشد *Rh. vitis* جلوگیری کردند. به‌علاوه، بیوارهای I، III و IV از *P. fluorescens* قادر به تولید پروتئاز و سیانید هیدروژن بودند اما در تولید سیدروفور، نتایج متفاوتی را نشان دادند. آغازگرهای اختصاصی وجود ژن‌های *Phl*D و *hcn*ABC را در بعضی از جدایه‌های بیووارهای I و IV از *P. fluorescens* به اثبات رساندند. دو جدایه از بیووار I و یک جدایه از بیووار IV از *P. fluorescens* و نیز دو جدایه از *B. subtilis* به‌طور کامل از تشکیل گال توسط *Rh. vitis* روی قطعات شلغم و هویج جلوگیری کردند.

کلید واژه‌ها: کنترل بیولوژیک، آگروباکتریوم، سودوموناس، باسیلوس

مقدمه

بیماری گال ریشه و طوقه انگور ناشی از *Rhizobium vitis* (syn: *Agrobacterium vitis*) ، از خسارت زا ترین بیماری‌های این گیاه در سطح جهان محسوب می‌شود. تاکنون روش قطعی برای کنترل این بیماری توصیه نشده است و تنها اقدام موثر برای کنترل برخی جدایه‌های این جنس، استفاده از

جدایه‌های K84 و K1026 از باکتری غیر بیماری‌زا و آنتاگونیست *Agrobacterium radiobacter* می-باشد. این باکتری تنها توانایی کنترل اگروباکتریوم های دارای اوپاین از نوع نوپالین و اگروسین را دارد. اما اوپاین تولید شده توسط جدایه‌های انگور از نوع اکتوپین می باشد، لذا به دلیل غیر موثر بودن جدایه‌های K84 و *A. radiobacter* K1026 ،کنترل بیولوژیکی گال طوقه وریشه با دیگر باکتری های آنتاگونیست متعلق به جنس های *Pseudomonas* و *Bacillus* مورد توجه قرار گرفته است. سودوموناس‌های فلئورسنت قادرند با تولید ۲،۴- دی استیل فلورگلوسینول، سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم های پروتئاز مستقیما عوامل بیماریزای گیاهی را تحت تاثیر قرار دهند و همینطور با تولید هورمون های گیاهی و تحریک رشد گیاه و یا القای مقاومت در گیاه به طور غیر مستقیم بر عوامل بیماریزا موثر باشند (ناگراج کومار و همکاران[1]، ۲۰۰۴). کنث و همکاران[2]، (۲۰۰۶) در تحقیقی در کلمبیا و کانادا از باکتری‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* برای کنترل بیولوژیکی بیماری گال طوقه و ریشه انگور استفاده کردند. آنان شناسایی اولیه‌ی جدایه‌های *Pseudomonas* قادر به کنترل *Agrobacterium* های بیماریزا را از طریق آنالیز استرمتیل اسیدهای چرب و آزمون‌هایی مبنی بر استفاده از کربن انجام دادند و پس از شناسایی دقیقتر جدایه‌های *P. fluorescens* بر اساس توالی rDNA، درنهایت *P. fluorescens* 1100-6 ، جدا شده از گیاه سیب، را معرفی کردند که توانایی جلوگیری از تشکیل گال توسط *A. vitis* روی *Nicotiana giauca* را داشت. در تحقیقی دیگر، جداسازی و شناسایی گونه های *Bacillus* در خاک اطراف ریشه درخت سیب صورت گرفت و جدایه‌های EN63-1 و EN71-1، که قادر به تولید آنتی بیوتیک و بازدارندگی از رشد *R. vitis* روی محیط کشت PDA بودند، شناسایی شدند (بیچارد و همکاران[3]، ۱۹۹۸). همچنین در مطالعه‌ای دیگر ممانعت از رشد *A. vitis* توسط جدایه‌های *P. fluorescens* B4118، *P. fluorescens* Q8r-96 و *Seratia plymuthica* در محیط کشت PDA گزارش گردید (داندوریشیولی و همکاران[4]، ۲۰۱۰). در تحقیقی دیگر در ژاپن، برای کنترل گال طوقه انگور از جدایه غیر بیماریزای *A. vitis* VAR03-1 استفاده شد. در این بررسی قلمه‌های انگور و نشاء گوجه فرنگی ابتدا به سوسپانسیون حاوی این باکتری‌های آنتاگونیست آغشته و سپس در خاک آلوده به *A. vitis*، کشت شدند. این اولین گزارش در مورد استفاده از جدایه غیر بیماریزای *A. vitis* برای کنترل گال طوقه ناشی از *A. vitis*، *A. rhizogenes* و *A. tumefaciens* بود (کاواگوچی و همکاران[5]، ۲۰۰۸) مطالعه انجام شده توسط کرمی و همکاران (۱۳۹۲) تنها تحقیق انجام شده در ایران در مورد بررسی امکان کنترل گال باکتریایی انگور با باکتری‌های آنتاگونیست می‌باشد که طی آن به جداسازی و شناسایی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور در استان زنجان و بررسی اثرات آنتاگونیستی آنها روی *Rh. vitis* پرداخته شده است. با توجه به اهمیت انگور و از سوی دیگر، شیوع و خسارت زیاد گال باکتریایی در استان قزوین، این تحقیق به منظور شناسایی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور و بررسی اثر آنتاگونیستی مهمترین آنها بر باکتری عامل گال طوقه و ریشه در این استان انجام شد.

مواد و روش ها

جمع آوری جدایه های باکتری های اپی‌فیت و ساپروفیت طی فصل رشد سال ۱۳۹۱ از مناطق عمده پرورش

1- Nagarajkumar *et al.*
2- Kenneth *et al.*
3- Bechard *et al.*
4- Dandurishivili *et al.*
5- Kawaguchi *et al.*

انگور در استان قزوین نمونه هایی از ریشه و طوقه انگور همراه با مقداری خاک اطراف درختان آلوده و سالم جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جداسازی باکتری ها، ۱۰۰ گرم از هر نمونه خاک یا قطعات ریز شده گیاهی در ارلن ریخته شد و با مقداری آب و یک قطره توین-۲۰ روی شیکر با حرکت ملایم به مدت ۲۰ دقیقه شستشو داده شد و پس از نگهداری نمونه‌ها به‌طور ثابت به مدت ۱۰ دقیقه، از محلول رویی روی سه محیط کشت آگار غذایی [nutrient agar (NA)]، آگار غذایی دارای ۱٪ سوکروز (NAS) و کینگ-ب [King's B (KB)] کشت مخطط انجام گردید. پس از سه روز نگهداری تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس، تک کلنی‌ها جدا و به صورت لکه‌ای کشت داده شدند (شاد و همکاران[1]، ۲۰۰۱). جدایه *Rh. vitis* Beh1 که قبلا از انگور در استان قزوین جداسازی، شناسایی و اثبات بیماریزایی آن انجام شده بود (معرفت،۱۳۹۰)، از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه زنجان و جدایه *P. fluorescens* CHAO از کلکسیون باکتری شناسی مرکز تحقیقات گیاهپزشکی کشور اخذ گردید.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه ها روی *Rh. vitis*

از نمونه‌های جمع‌آوری شده، ۲۱۰ جدایه باکتریایی به دست آمد. جدایه‌ها براساس مناطق نمونه‌برداری؛ خصوصیات مرفولوژیکی کلنی روی محیط کشت همچون اندازه، رنگ و تولید لعاب؛ و نیز بر اساس نتایج چند آزمون اولیه همچون گرم، اکسیداز و رشد بی هوازی گروه بندی و در نهایت ۷۳ جدایه برای بررسی اثر آنتاگونیستی روی *Rh. vitis* Beh1 انتخاب شدند.

بررسی توانایی جدایه ها در تولید آنتی بیوتیک

این آزمون در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار [potato dextrose agar (PDA)] و برای همه ۷۳ جدایه انجام گردید. بدین صورت که ابتدا جدایه ها به صورت لکه ای روی PDA کشت داده شده و تشتک‌های پتری به مدت ۲-۶ روز در دمای ۲۴ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. سپس با استفاده از پنبه استریل باکتری از روی محیط پاک گردید و تشتک پتری به مدت ۲۰ دقیقه زیر اشعه ماورای بنفش UV قرار داده شد. سوسپانسیونی از *Rh. vitis* Beh1 در آب مقطر استریل تهیه و OD_{600} آن با دستگاه اسپکتروفتومتر روی 0.01 تنظیم گردید (معادل حاوی تقریبا 10^{6-7}cfu/ml) و ۱۰۰ میکرولیتر از آن به طور یکنواخت روی محیط پخش گردید. این آزمون برای هر جدایه مورد آزمون در سه تکرار انجام شد و یک تشتک پتری که فاقد هرگونه باکتری آنتاگونیست بود به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. تشتک ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از دو تا سه روز که سطح تشتک شاهد کاملا توسط *Rh. vitis* پوشیده شد، هاله بازدارندگی از رشد باکتری عامل بیماری، ایجاد شده توسط باکتری‌های آنتاگونیست، در سه تکرار اندازه‌گیری و میانگین گرفته شد (چن و همکاران[2]، ۲۰۰۷).

بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید سیدروفور

برای این آزمون جدایه های سودوموناس روی محیط KB حاوی غلظت های صفر، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن (III) کشت و به مدت ۴ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس کلنی ها با استفاده از پنبه استریل از سطح تشتک پاک و به مدت ۲۰ دقیقه زیر UV قرار داده شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *Rh.* Beh1 *vitis* در آب مقطر استریل با $OD_{600} = 0.01$ روی محیط به‌طور یکنواخت پخش گردید. برای هر جدایه مورد آزمون سه تکرار درنظر گرفته شد و یک تشتک فاقد هرگونه باکتری آنتاگونیست و دارای همان غلظت از آهن به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. تولید هاله‌ی بازدارندگی از رشد Beh1

1- Schaad *et al.*

2- Chen *et al.*

Rh. vitis و کاهش اندازه آن با افزایش غلظت کلرید آهن (III) به عنوان تولید سیدروفور ثبت گردید (ولر و کوک[1]، ۱۹۸۳).

بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن ابتدا سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته هر یک از جدایه‌های سودوموناس در یک میلی لیتر آب مقطر استریل تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر آن روی محیط آگار غذایی پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲٪ کربنات سدیم و ۵٪ اسید پیکریک) در قسمت درب تشتک قرار داده شد و درب تشتک با نوار پارافیلم مسدود گردید تا از خروج هر گونه متابولیت فرار و گازی از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری شود. تشتک-های پتری به صورت وارونه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور به مدت یک هفته نگهداری شدند. تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری با تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد به نارنجی، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره، و آجری مشخص و ثبت گردید (کاستریک و کاستریک[2]، ۱۹۸۳).

بررسی توانایی جدایه ها در تولید پروتئاز

بررسی تولید آنزیم پروتئاز با استفاده از محیط کشت skim milk agar (SMA) صورت گرفت. هر جدایه به صورت لکه‌ای روی محیط مذکور کشت گردید و تشتک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری به عنوان نشانه فعالیت پروتئاز ثبت گردید (چانتاواناکول و همکاران[3]، ۲۰۰۲).

شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* دارای ژن *PhID*

از آغازگرهای اختصاصی PhI2a و PhI2b (جدول ۱) برای شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* دارای ژن *PhID*، موثر در مسیر بیوسنتز DAPG، استفاده گردید (راج میکرز و همکاران[4]، ۱۹۹۷). از جدایه *P. fluorescens* CHAO به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. آماده سازی DNA به روش لیز قلیایی انجام شد. برای این منظور، سوسپانسیون رقیقی از کشت ۲۴ ساعته هر جدایه روی محیط آگار غذایی (NA) در آب مقطر تهیه و سپس ۲۰ میکرولیتر آن با ۱۰۰ میکرولیتر KOH (۰/۰۵ درصد) مخلوط گردید. نمونه ها پس از نگهداری در آب جوش به مدت ۶-۹ دقیقه، به مدت سه دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. لایه شفاف رویی به عنوان نمونه حاوی DNA جدا و در لوله-های دیگری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (رید میکر و دی برون[5]، ۱۹۹۷). تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش انجام شد شامل: یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها با غلظت 10 µM، ۱۲/۵ میکرولیتر master mix (2×) (CinnaGen, Tehran)، یک میکرولیتر از نمونه DNA و ۹/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل. برنامه سیکل حرارتی شامل واسرشت اولیه ۹۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه: ۳۵ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و بسط نهایی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود (راج میکرز و همکاران، ۱۹۷۷). واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر GeneAtlas-G02 (Astec, Japan) انجام شد. محصول PCR روی ژل آگاروز یک

1- Weller & Cook
2- Castric & Castric
3- Chantawannakul *et al.*
4- Raaijmakers *et al.*
5- Rademaker & de Bruijn

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر*

هدف از استفاده	منبع	توالی	نام
شناسایی اختصاصی جدایه های *Bacillus subtilis*	واتیو و همکاران، ۲۰۰۱	5'-AAGTCGAGCGGACAGATGG-3'	Bsub5F
		5'-CAGTTTCCAATGACCCTCCC-3'	Bsub3R
شناسایی جدایه‌های *P. fluoresence* دارای ژن *Phl*D	راج میکرز و همکاران، ۱۹۷۷	5'-GAGGACGTCGAAGACCACCA-3'	PhI2a
		5'-ACCGCAGCATCGTGTATGAG-3'	PhI2b
شناسایی جدایه‌های *P. fluoresence* دارای ژن *hcn*ABC	سورسل و همکاران، ۲۰۰۷	5'-TGCGGCATGGGCGTGTGCCATTGCTGCCTGG-3'	PM2
		5'-CGCTCTTGATCTGCAATTGCAGGCC-3'	PM7-26R

* کلیه آغازگرها توسط شرکت Bioneer کره جنوبی ساخته شدند.

درصد با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شد. ژل با محلول ایتیدیوم بروماید (۰/۶ میکروگرم در لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی و سپس با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌بری گردید و با دستگاه Gel-Documentation عکس برداری از ژل صورت گرفت.

شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* دارای ژن *hcnABC*

از آغازگرهای اختصاصی PM2 و PM7-26R (جدول ۱) برای شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* دارای ژن *hcnABC* استفاده گردید (سورسل و همکاران[1]، ۲۰۰۷). از جدایه *P. fluorescens* CHAO به عنوان شاهد استفاده شد. آماده سازی DNA به روش لیز قلیایی و طبق آنچه که در مورد تهیه نمونه برای ردیابی ژن *Phl*D در جدایه-های *Pseudomonas* ذکر گردید انجام شد. تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش شامل: یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت 10 µM، ۱۲/۵ میکرولیتر master mix (2×) (CinnaGen, Tehran)، یک میکرولیتر از نمونه DNA و ۹.۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. برنامه سیکل حرارتی شامل واسرشت اولیه ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۷ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در ۷۲ دمای درجه سلسیوس؛ و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود (سورسل و همکاران، ۲۰۰۷). واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر GeneAtlas-G02 (Astec, Japan) انجام شد. الکتروفورز محصول PCR و رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری از ژل مطابق آنچه در قسمت قبل ذکر گردید، انجام شد.

شناسایی جدایه ها

نوزده جدایه که در آزمون‌های آزمایشگاهی فوق بیشترین اثر بازدارندگی از رشد *Rh. vitis* Beh1 را داشتند برای شناسایی بیشتر انتخاب شدند. شناسایی جدایه‌ها با آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لازم از جمله گرم (به روش حلالیت در پتاس سه درصد)، اکسیداز، تولید لوان، رشد هوازی و بی هوازی، لهانیدن سیب زمینی، احیای نیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، تولید سولفید هیدروژن، ایجاد فوق حساسیت در برگ شمعدانی، تولید رنگدانه فلئورسنتی در KB، لسیتیناز، تولید اسید از قندهای مختلف و مصرف منابع کربوهیدراتی مختلف انجام شد (شاد و همکاران، ۲۰۰۱).

1- Svercel *et al.*

شناسایی جدایه‌های مشکوک به *Bacillus subtilis* با آغازگرهای اختصاصی

برای شناسایی دقیقتر جدایه های مشکوک به *Bacillus subtilis* از جفت آغازگر اختصاصی Bsub5F و Bsub3R استفاده گردید (جدول ۱).

آماده سازی DNA به روش لیز قلیایی و طبق آنچه که در مورد تهیه نمونه برای ردیابی ژن *Phl*D در جدایه‌های *Pseudomonas* ذکر گردید، انجام شد. مخلوط واکنش عبارت بود از یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرها (10 pmol/µl)، ۱۲/۵ میکرولیتر از master mix (2×) (CinnaGen, Tehran) و یک میکرولیتر از نمونه DNA که با آب مقطر استریل به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد و برنامه سیکل حرارتی عبارت بود از واسرشت اولیه ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس؛ و ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۲ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس (واتیو و همکاران[1]، ۲۰۰۱) که در دستگاه GeneAtlas-G02 (Astec, Japan) انجام گردید. الکتروفورز محصول PCR و رنگ‌آمیزی و عکس‌برداری از ژل مطابق آنچه در قسمت‌های قبل ذکر گردید، انجام شد.

بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست بر *Rh. vitis* روی برش‌های گیاهی

برای اطمینان از بیماری‌زا بودن جدایه *Rh. vitis* Beh1، اخذ شده از کلکسیون، ابتدا سوسپانسیون رقیقی از کشت ۲۴ ساعته این باکتری روی محیط آگار غذایی (NA) تهیه گردید. گیاهان یک‌ماهه توتون (*Nicotiana tabacum*) و گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum*) به عنوان محک استفاده شد و پس از ایجاد خراش سطحی در ساقه آن‌ها، باکتری مایه زنی گردید و محل مایه زنی به مدت ۲۴ ساعت با پلاستیک پوشانده شد. گیاهان مایه زنی شده در گلخانه نگهداری شدند و پس از ۱۵ تا ۲۰ روز از زمان مایه زنی، تشکیل گال‌های کوچک در محل مایه زنی و اطراف آن بررسی گردید. جداسازی مجدد باکتری از گال‌ها و مقایسه آن با باکتری مایه زنی شده با چند آزمون بیوشیمیایی انجام شد. جدایه های P_{k12}، P_{A8}، P_{E9}، B_{I7} و B_{C4} که در آزمون‌های روی محیط کشت بیشترین اثر بازدارندگی را بر *Rh. vitis* Beh1 نشان دادند برای این آزمون انتخاب شدند و تاثیر آنها بر باکتری عامل بیماری روی قطعات تهیه شده از هویج (*Daucus carota*) و شلغم (*Brassica rapa*) به روش آرک و شروت[2] (۱۹۵۸) بررسی گردید. غده-های هویج و شلغم ابتدا با آب شیر شستشو داده شدند و پس از ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم (محلول ۷۰ درصد از فرم تجاری ۵ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه و بعد با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۲ دقیقه، مجدد با آب مقطر استریل آبکشی شدند. سپس در محیط استریل زیر هود برش-هایی از غده‌ها تهیه و در پتری های استریل تقسیم گردید. سوسپانسیونی با $OD_{600}= 0.1$ از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های آنتاگونیست تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی تکه های هویج و شلغم پخش گردید. بعد از ۲۴ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *Rh. vitis* Beh1 با $OD_{600} = 0.01$ روی تکه های هویج و شلغم پخش گردید. قطعات گیاهی تلقیح شده با جدایه *Rh. vitis* Beh1 به تنهایی، به عنوان شاهد مثبت و قطعات تلقیح شده با آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شدند. به منظور تامین رطوبت، مقداری آب مقطر استریل به هر تشتک اضافه شد به-طوری که حداکثر تا نیمه هر برش گیاهی در آب قرار گیرد. تشتک‌ها به مدت ۱۵-۱۰ روز در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام شد و

1. Wattiau *et al.*

2- Ark & Schroth

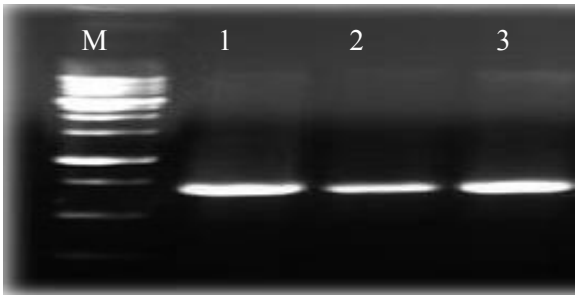
صفت مورد آزمایش تاثیر هر جدایه باکتری آنتاگونیست بر تعداد و اندازه گال‌های تشکیل شده توسط *Rh. vitis* Beh1 روی تکه‌های هویج و شلغم بود.

نتایج

از نمونه‌های جمع آوری شده از ریشه و طوقه انگور در باغهای مناطق مختلف استان قزوین در مجموع ۲۱۰ جدایه باکتریایی روی محیط‌های کشت NA، PDA و KB بدست آمد که پس از گروه‌بندی بر اساس منطقه جداسازی، خصوصیات مرفولوژیکی کلنی روی محیط کشت و نتایج چند آزمون کلیدی همچون گرم، اکسیداز و رشد هوازی یا بی هوازی، ۷۳ جدایه برای بررسی اثر آنتاگونیستی بر *Rh. vitis* Beh1 انتخاب شدند. نوزده جدایه که بیشترین اثر بازدارندگی از رشد باکتری عامل بیماری را نشان دادند برای شناسایی بیشتر با آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی انتخاب شدند که نتایج آن به شرح زیر بود:

گروه اول، باکتری‌های گرم مثبت که نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی آنها همچون رشد در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، رشد در حضور ۷ درصد نمک طعام، هیدرولیز نشاسته؛ و تولید اسید از آرابینوز و مانیتول با خصوصیات ذکر شده برای باکتری *Bacillus subtilis* در منابع (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) مطابقت داشت. همچنین آغازگرهای Bsub 5F و Bsub 3R، مورد استفاده برای شناسایی اختصاصی *B. subtilis*، توانستند یک قطعه دی ان ای به اندازه ۵۹۵ جفت باز از ژنوم اعضای این گروه تکثیر نمایند (شکل ۱). جدایه‌های B_{L3}، B_{I7} و B_{C4} به عنوان نماینده این جدایه‌ها درنظر گرفته شدند. توانایی جدایه‌های این گروه در تولید آنتی بیوتیک و اثر بازدارندگی بر *Rh. vitis* Beh1 متفاوت بود. بعضی جدایه‌ها مثل B_{C4} و B_{I7} قادر به تولید آنتی‌بیوتیک و بعضی مثل جدایه B_{L3} قادر به تولید آن نبودند (جدول ۲).

گروه دوم، باکتری‌های گرم مثبتی که براساس نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی به عنوان *Bacillus sp.* شناسایی شدند و آغازگرهای Bsub 5F و Bsub 3R هیچ قطعه‌ای از ژنوم این جدایه‌ها را تکثیر ننمودند. چون اثر بازدارندگی قابل توجهی بر *Rh. vitis* Beh1 نداشتند، از شناسایی بیشتر آنها خودداری شد.



شکل ۱- شناسایی جدایه های *Bacillus subtilis* جداشده از خاک باغ‌های انگور استان قزوین با آغازگرهای اختصاصی Bsub5F و Bsub3R

M: Marker (1kb DNA ladder, Gene ruler), 1: *B. subtilis* B_{I7}, 2: *B. subtilis* B_{C4}, 3: *B. subtilis* B_{L3}

گروه سوم، باکتری‌های گرم منفی، هوازی، اکسیداز مثبت، قادر به تولید آنزیم‌های کاتالاز و آرجنین دهیدرولاز، ناتوان در لهانیدن ورقه های سیب زمینی و ایجاد فوق حساسیت در شمعدانی و نیز قادر به تولید رنگدانه فلئورسنت در محیط KB بودند که بر این اساس به گروه سودوموناس‌های فلئورسنت تعلق داشتند. برخی از آنها به‌علاوه قادر به تولید لوان و آنزیم لیستیناز و هیدرولیز ژلاتین بودند اما نیترات را احیاء نکردند لذا *P. fluorescens* biov. I شناسایی شدند (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) و جدایه‌های P_{A8}، P_{E9} و P_{L16} به عنوان نماینده این جدایه‌ها در نظرگرفته شدند. جدایه‌های دیگری از این گروه که قادر به تولید لسیتیناز و هیدرولیز ژلاتین بودند اما تولید لوان و احیای نیترات آنها منفی بود با *P. fluorescens* biov. III مطابقت داشتند (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) و جدایه P_{B8} به عنوان نماینده این جدایه‌ها در نظر گرفته شد. به علاوه برخی جدایه‌ها نیترات را احیا و ژلاتین را هیدرولیز کردند و قادر به تولید لوان و آنزیم‌های لیستیناز، کاتالاز و آرجنین دهیدرولاز بودند که از این نظر به *P. fluorescens* biov. IV

جدول ۲-مهمترین باکتری‌های خاکزی جدا شده از باغ های انگور استان قزوین و بعضی خواص آنتاگونیستی آنها علیه *Rhizobium vitis*

شناسه جدایه	جدایه باکتری	تولید سیانید هیدروژن	تولید پروتئاز	تولید سیدروفور	تولید آنتی‌بیوتیک
B_{L3}	*Bacillus subtilis*	-	-	-	- (0)*
B_{I7}	*Bacillus subtilis*	-	-	-	+ (3.2)
B_{C4}	*Bacillus subtilis*	-	-	-	+ (2.6)
P_{A8}	*P. fluorescens* biov.I	+	+	+	+ (2.6)
P_{B8}	*P. fluorescens* biov.III	+	+	-	+ (1.7)
P_{B6}	*P. fluorescens* biov.IV	+	+	+	+ (2.9)
P_{E9}	*P. fluorescens* biov.I	+	+	-	+ (3.6)
P_{K12}	*P. fluorescens* biov.IV	+	+	-	+ (2.3)
P_{L16}	*P. fluorescens* biov.I	+	+	-	+ (1.5)

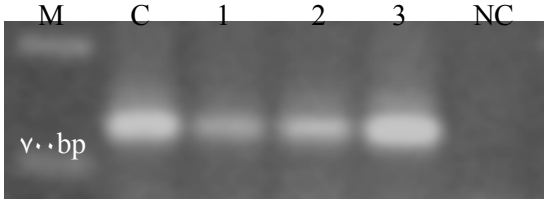
* عدد داخل پرانتز بر حسب سانتی‌متر و میانگین سه تکرار مربوط به قطر هاله بازدارندگی از رشد *Rh. vitis* در محیط PDA می باشد.

شباهت داشتند (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) و جدایه‌های P_{K12} و P_{B6} به عنوان نماینده این جدایه‌ها انتخاب گردیدند. همه جدایه‌های شناخته شده به عنوان بیووارهای I، III و IV از باکتری *P. fluorescens* روی محیط کشت PDA از رشد *Rh. vitis* Beh1 به‌طور قابل‌توجهی جلوگیری کردند، همچنین نتیجه آزمون تولید پروتئاز و تولید سیانید هیدروژن برای آنها مثبت بود (جدول ۲). اما در بررسی تولید سیدروفور در محیط KB، نتایج متفاوتی را نشان دادند. به طوریکه برخی از جدایه‌ها هیچگونه هاله بازدارندگی از رشد *Rh. vitis* Beh1 را ایجاد نکردند و اندازه هاله بوجود آمده توسط بعضی با افزایش غلظت کلرید آهن (III) در محیط تغییری نشان نداد که بیانگر تولید ماده بازدارنده دیگری همچون آنتی‌بیوتیکها بود. اما هاله بازدارندگی از رشد *Rh. vitis* Beh1 ایجاد شده توسط دو جدایه P_{A8} و P_{B6}، به ترتیب متعلق به *P. fluorescens* biov. I و *P. fluorescens* biov. IV، با افزایش غلظت کلرید آهن (III)، در هر سه تکرار به‌طور چشمگیری کاهش نشان داد که می تواند دلیلی بر تولید سیدروفور توسط این دو جدایه باشد (جدول ۲).

خصوصیات تعداد کمی از سودوموناس‌های فلئورسنت از جمله اکسیداز مثبت و تولید آنزیم آرجنین دهیدرولاز و عدم توانایی آنها در احیاء نیترات، تولید لوان، تولید لیستیناز، ایجاد فوق حساسیت در شمعدانی و لهانیدن ورقه های سیب زمینی با خصوصیات ذکر شده برای *P. putida* همخوانی داشت (شاد و همکاران، ۲۰۰۱) اما هیچیک از آنها در هیچ‌کدام از آزمون‌ها نتوانستند از رشد باکتری بیماری‌زا جلوگیری کنند.

شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens*، دارای ژن *PhID*

آغازگرهای PhI2a و PhI2b توانستند دی ان ای با اندازه ۷۴۵ جفت باز از ژنوم جدایه های P_{K12}، P_{A8}، P_{E9} و همچنین جدایه *P. fluorescens* CHAO، شاهد مثبت، تکثیر نمایند (شکل ۲).

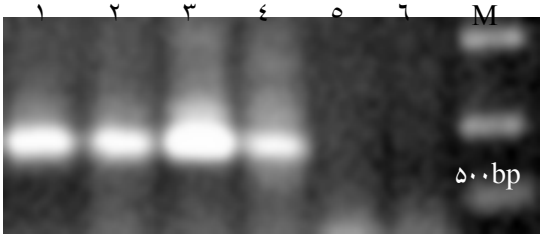


شکل ۲- شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* دارای ژن *PhID*، جدا شده از خاک باغ‌های انگور در استان قزوین با استفاده از آغازگرهای PhI2a و PhI2b

M: Marker (1kb DNA ladder, Gene ruler), C: *P. fluorescens* CHAO (the positive control), 1: *P. fluorescens* P_{K12}, 2: *P. fluorescens* P_{E9}, 3: *P. fluorescens* P_{A8}, NC: negative control (no DNA)

شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens*، دارای ژن *hcnABC*

آغازگرهای PM2 و PM7-26R توانستند دی ان ای با اندازه ۵۷۰ جفت باز از ژنوم جدایه های P_{K12}، P_{A8}، P_{E9} و همچنین جدایه *P. fluorescens* CHAO تکثیر نمایند (شکل ۳).



شکل ۳- شناسایی جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* دارای ژن *hcnABC* جدا شده از خاک باغ‌های انگور در استان قزوین با استفاده از آغازگرهای PM2 و PM7-26R

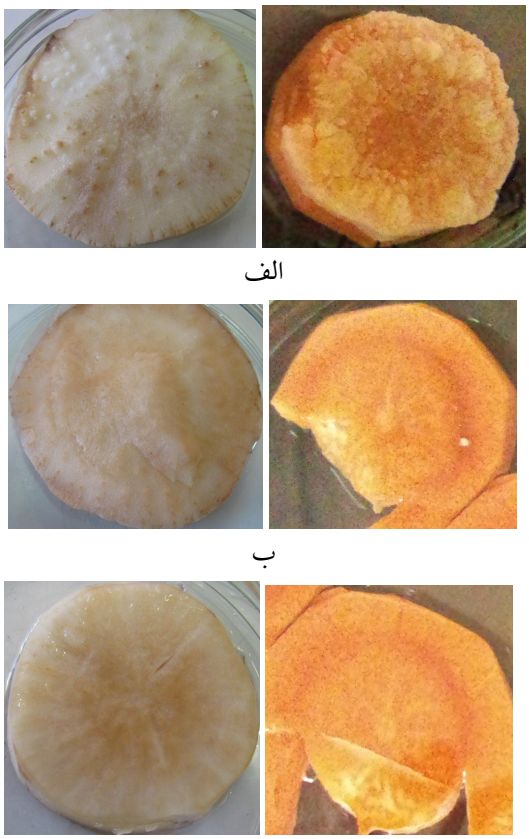
1: *P. fluorescens* P_{K12}, 2: *P. fluorescens* P_{E9}, 3: *P. fluorescens* CHAO (the positive control), 4: *P. fluorescens* P_{A8}, 5: negative control (no DNA), 6: *Bacillus* sp., M: Marker (1kb DNA ladder, Gene ruler)

بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست بر *Rh. vitis* روی برش‌های گیاهی

بیماری‌زا بودن *Rh. vitis* Beh1 با تشکیل گال‌های کوچکی در ساقه توتون و گوجه فرنگی پس از دوهفته از زمان تلقیح (شکل ۴) و جداسازی مجدد آن از گال‌ها به اثبات رسید. در آزمون اثر بازدارندگی جدایه-های آنتاگونیست بر *Rh. vitis* Beh1 ، هر یک از جدایه‌های P_{k12}، P_{A8}، P_{E9}، B_{I7} و B_{C4} توانستند از تشکیل گال روی برش‌های هویج و شلغم در همه تکرارها جلوگیری کنند در حالیکه در تیمارهای شاهد گال‌های متعدد با اندازه‌های مختلف مشاهده گردید. به عنوان نمونه، نتایج مربوط به تاثیر *P. fluorescens* biov. IV (P_{K12}) بر جلوگیری از تشکیل گال توسط *Rh. vitis* Beh1 روی برش‌های هویج و شلغم در شکل ۵ نشان داده شده است.

الف ب

شکل ٤- گال‌های تشکیل شده در ساقه گیاهان تلقیح شده با *Rhizobium vitis* Beh1، الف: توتون، ب: گوجه فرنگی



الف

ب

پ

شکل ۵- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست بر *Rhizobium vitis* Beh1 روی برش‌های هویج و شلغم. الف: برش‌های هویج و شلغم تلقیح شده با *Rh. vitis* Beh1 (شاهد مثبت)، ب: برش‌های هویج و شلغم تلقیح شده با آب مقطر استریل (شاهد منفی)، پ: برش‌های شلغم و هویج تلقیح شده با *Rh. vitis* Beh1 و *P. fluorescens* biov. IV (P_{K12})

بحث

طی این تحقیق که برای اولین بار در استان قزوین جهت بررسی امکان کنترل باکتری عامل گال ریشه و طوقه انگور توسط باکتری های خاکزی انجام شد، مشخص گردید که باکتری‌های متنوعی عمدتا متعلق به بیوارهای I، III، IV از باکتری *P. fluorescens* و نیز *B. subtilis* به طور پراکنده در باغ های انگور استان قزوین وجود دارند که قادرند از رشد باکتری عامل بیماری جلوگیری نمایند. هرچند گزارش های متعددی در خصوص استفاده از این باکتری‌ها علیه سایر عوامل بیماریزا وجود دارد اما گزارش در مورد استفاده از آنها علیه باکتری عامل سرطان ریشه و طوقه انگور زیاد نیست و به چند گزارش محدود می‌گردد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، باکتری‌های آنتاگونیست متعلق به دو جنس سودوموناس و باسیلوس شناسایی شدند. اما ممکن است باکتری‌های دیگری متعلق به سایر جنس‌ها نیز یافت شوند که توانایی بازدارندگی از رشد باکتری عامل بیماری را داشته باشند. برای مثال در بررسی چن و همکاران[1] (۲۰۰۷) جدایه‌ای از *Enterobacter agglomerans* از باغ انگور آلوده به *A. vitis* جداسازی شد که علاوه بر ممانعت از رشد *A. vitis* توانست از فعالیت گونه های دیگر این باکتری از جمله *A. tumefacines* و *A. rhizogenes* در شرایط آزمایشگاهی و شرایط مزرعه جلوگیری کند. اثر بازدارندگی باکتری‌های آنتاگونیست بر *Rh. vitis* می تواند به سه صورت اثر بر جمعیت این باکتری، تعداد سلول گیاهی ترانسفرم شده توسط آن و یا میزان رشد و اندازه گال ناشی از سلول‌های ترانسفرم شده نمایان شود و برای بررسی این سه اثر، به ترتیب اندازه‌گیری جمعیت باکتری بیماریزا، شمارش تعداد گال‌های تشکیل شده در محل تلقیح و مساحت معینی از اطراف آن و اندازه گیری میزان رشد گال تشکیل شده با استفاده از دیسک‌هایی با مساحت معین، عکسبرداری دقیق و آنالیز کامپیوتری عکس‌های گرفته شده می تواند انجام پذیرد (کنث و همکاران[2]، ۲۰۰۶) . در تحقیق حاضر، مشخص گردید که جدایه‌های انتخاب شده با قدرت زیاد و با بیشتر از یک مکانیسم قادرند از رشد باکتری عامل بیماری در محیط‌های کشت جلوگیری نمایند لذا تاثیر منفی آنها بر جمعیت باکتری عامل بیماری تاحدودی مشخص بود. بنابراین تاثیر آنها روی تعداد و اندازه گال‌های ناشی از باکتری بیماریزا روی بافت‌های گیاهی بررسی گردید. نتیجه این بررسی یعنی ممانعت کامل از تشکیل گال روی بافت گیاهی توسط جدایه‌های آنتاگونیست، با نتایج بدست آمده توسط خلایف[3] (۲۰۰۶) و کنث و همکاران (۲۰۰۶) همخوانی داشت. داندوریشیولی و همکاران[4] (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند جدایه‌های Q8RL و B-4117 از باکتری *P. fluorescens* به‌طور چشمگیری باعث کاهش حجم توده‌های گال ایجاد شده توسط *A. vitis* در گوجه فرنگی شدند. در تحقیق حاضر، هماهنگی کاملی بین نتایج آزمون‌های بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیستی در محیط‌های کشت و روی بافت‌های گیاهی دیده شد به‌طوری که جدایه‌هایی از *P. fluorescens* و *B. subtilis* که در محیط‌های کشت با چند مکانیسم و با قدرت بیشتر از رشد *Rh. vitis* جلوگیری کردند، از تشکیل گال روی تکه‌های هویج و شلغم جلوگیری کردند. تنوع در مکانیزم‌های آنتاگونیستی باکتری‌های شناسایی شده، اعم از تولید آنتی‌بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز نقطه قوتی برای استفاده از آنها به عنوان عوامل بیوکنترل محسوب می‌گردد. در ادامه این تحقیق بررسی تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست بر باکتری عامل بیماری، روی انگور در شرایط گلخانه‌ای در حال انجام است.

1- Chen *et al.*

2- Kenneth *et al.*

3- Khlaif

4- Dandurishivili *et al.*

منابع

۱. کرمی. م.، معرفت. ع. و قاسمی. ا. ۱۳۹۲. شناسایی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور دراستان زنجان و بررسی اثر بازدارندگی آنها بر *Rhizobium vitis* عامل گال طوقه و ریشه. مجله آفات و بیماری‌های گیاهی. ۸۱(۱): ۱-۱۰.

۲. معرفت ع ۱۳۹۰. تعیین خصوصیات جدایه های *Agrobacterium* جدا شده از باغهای انگور استان زنجان. مجموعه مقالات پنجمین همایش منطقه ای یافته های پژوهشی کشاورزی (غرب کشور). دانشگاه کردستان، سنندج، ایران: ۵۵-۵۱.

3. Ark, P. A. and Schroth, M. N. 1958. Use of slices of carrot and other fleshy roots detect crown gall bacteria in soil. Plant Disease Reporter, 42: 1279-1281.

4. Bechard, J., Eastwell, K. C., Sholberg, P. L., Mazza, G., and Skura, B. 1998. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis.* Journal of Agriculture and Food Chemistry, 46: 5355–5361.

5. Castric, K.F., and Castric, P. 1983. Method for rapid detection of cyanogenic bacteria. Journal of Applied and Environmental Microbiology: 45: 701-702.

6. Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., and Lumyong, S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. Science, 28: 241-245.

7. Chen, F., Guo, Y.B., and Wang, H.M. 2007. Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatitis* HX_2. Plant Disease, 91: 957-963.

8. Dandurishivili, N., Toklishivili, N., Ovadis, M., Eliashivili, P., Giorgobian, N., Khemel, I., Szegedi, E., and Chernin, L. 2010. Broad- range antagonistic rhizobacterial *Pseudomonas fluorescens* and *Serratia Plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumors on tomato plant. Journal of Applied Microbiology, 10: 341-352.

9. Kawaguchi, A., Inoue, K., and Ichinose. 2008. Biological control of crown gall of grapevine, rose and tomato by nonpathogenic *Agrobacterium vitis* strain VAR03-1. Phytopathology, 98: 1218-1225.

10. Kenneth, C. E., Peter. L. S., and Ronald. J. S. 2006. Characterizing potential bacterial biocontrol agents for suppression of *Rhizobium vitis*, causal agent of crown gall disease in grapevines. Crop Protection, 25: 1191- 1200.

11. Khlaif, H. 2006. Characterization and biocontrol of crown gall disease in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 2: 265-273.

12. Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., and Velazhahan, R. 2004. Involvement of se condary metabolites and lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* i n inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. Journal of Microbiology, 159: 73-81.

13. Raaijmakers, J.M., Weller, D.M., and Thomashow, L.S., 1997. Frequency of

antibiotic- producing *Pseudomonas spp.* in natural environments. Applied and Environmental Microbiology, 63: 881–887.

14. Rademaker, J.L.W., and de Bruijn, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In 'DNA Markers: Protocols, Application and Overviews', 16: 151-171.

15. Schaad, N. w., Jones, J. B., and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.[3rd] edition, APS press, USA, 396.

16. Svercel, M., Duffy, B., and Defago, G. 2007. PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnABC* in *Pseudomonas* spp. Journal of Microbiology, 70: 209-213.

17. Wattiau, P.M.E., Renard, P., Ledent Debois, V., Blackman, G., and Agathos, S.N., 2001, A PCR test to identify *Bacillus subtilis* and closely related species and its application to the monitoring of wastewater bio-treatment. Applied Microbiology and Biotechnology, 56: 816-819.

18. Weller, D.M., and Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatment with *fluorescent Pseudomonas.* Phytopathology, 73: 463-496.