آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۱، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۲

شناسائی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور در استان زنجان و بررسی اثر بازدارندگی آن‌ها علیه *Rhizobium vitis* عامل گال ریشه و طوقه

معصومه کرمی[۱]، علیرضا معرفت[۲]✉ و ابوالقاسم قاسمی[۳]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان؛ ۲- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی

۳- موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۰؛ تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۱)

چکیده

بیماری سرطان ریشه و طوقه ناشی از *Rhizobium vitis* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگور در کشورهای مختلف از جمله ایران است. این بیماری در استان زنجان سالانه خسارت قابل توجهی به درختان انگور وارد می‌نماید. در برخی مطالعات بررسی امکان کنترل استرین‌های این باکتری با استفاده از باکتری‌های خاکزی آنتاگونیست نتایج مطلوبی را به همراه داشته است. در این بررسی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور در استان جداسازی و اثر بازدارندگی برخی از آن‌ها علیه *Rh. vitis* بررسی گردید. بدین منظور، در سطح استان از ناحیه ریشه درختان انگور و خاک اطراف آن‌ها نمونه برداری شد. جدایه‌های حاصل بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی و بیوشیمیایی گروه‌بندی و از بین آن‌ها ۲۰۰ جدایه برای مطالعات آنتاگونیستی انتخاب شد. پنجاه جدایه در آزمون کشت متقابل تولید هاله بازدارندگی علیه *Rh. vitis* کردند. سیزده جدایه با بیشترین میزان بازدارندگی در کشت متقابل برای مراحل بعدی انتخاب گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی، باکتری‌های آنتاگونیست متعلق به بیوارهای یک، سه و پنج *Pseudomonas fluorescens*، *P. putida*، *Bacillus subtilis*، *Pseudomonas* sp. و *Bacillus* sp. بودند. همچنین در ردیابی ژن‌های *hcnABC*، ژن موثر در سنتز سیانید هیدروژن، وجود این ژن در پنج استرین سودوموناس به اثبات رسید. تأثیر هفت جدایه بر کاهش جمعیت باکتری بیماری‌زا در محیط خاک در شرایط گلخانه بررسی شد، که دو جدایه متعلق به بیوارهای سه و پنج باکتری *P. fluorescens* و نیز یک جدایه از *B. subtilis* با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد، سبب کاهش جمعیت *Rh. vitis* در خاک شدند.

واژه‌های کلیدی: سرطان طوقه، انگور، کنترل بیولوژیکی، *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*.

Identification of soil inhabiting bacteria of vineyards in Zanjan province and investigation of their antagonistic effect on *Rhizobium vitis* the causal agent of root and crown gall

M. KARAMI[1], A. MAREFAT[2]✉ and A. GHASEMI[3]

1- Plant Protection Dept., University of Zanjan, Zanjan, Iran; 2- Plant Protection Dept., University of Razi, Kermanshah, Iran

3- Iranian Research Institute of Plant Protection, P. O. Box 1454, Tehran 19395, Iran

Abstract

Crown and root gall caused by *Rhizobium vitis*, is one of the most important diseases of grapevine worldwide. In Iran, the disease has been reported in different areas such as Zanjan province. Despite the importance of the disease in the orchards, there is no an effective control measure for the disease. In this study the most important soil-inhabiting bacteria from vineyards in Zanjan province were isolated and were identified. Antagonistic effects of some isolates were investigated against the pathogen. For this mean, samples were collected from grapevine roots with surrounding soil in vineyards in different areas of the province. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics, 200 isolates were selected and their inhibitory effects were investigated on the pathogen *in vitro* for antibiotic production. Fifty isolates with the most inhibitory-effect in the tests were identified to genus and species levels. Some isolates identified as *Pseudomonas* spp. were further studied for the *hcnABC* gene. Biochemical tests identified representatives as *Pseudomonas fluorescens* biovare I, III and V, *P. putida*, *Basillus subtilis*, *Pseudomonas* sp., and *Bacillus* sp. Identified Pseudomonads showed significant inhibitory effect on *R. vitis* on King-B medium also via HCN production. In the PCR, *hcnABC* gene was amplified from five *Pseudomonas* strains. Indeed, seven strains with the most inhibitory-effect *in vitro* were selected across identified *Pseudomonas* and *Bacillus* strains and their antagonistic effect on the pathogen population was studied in the soil environment. Based on the results, all tested bacteria showed significant inhibitory effect on the pathogen population. However, *Pseudomonas fluorescens* bv. V, III and *Bacillus subtilis* were more effective.

Key words: crown gall, grapevine, biological control, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Bacillus*.

✉ **Corresponding author: Marefat345@gmail.com**

مقدمه

بیماری سرطان طوقه و ریشه انگور که عامل آن *Rhizobium vitis* (syn: *Agrobacterium vitis*) می‌باشد، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه به شمار می‌آید. باکتری عامل بیماری خاکزی است و معمولاً به طوقه و ریشه حمله کرده، سبب تشکیل گال می‌گردد. این بیماری اولین بار در سال ۱۹۷۰ از آمریکا (Tzvi and Citovsky, 2003) و سپس از کشورهای مختلف گزارش شده است. در ایران این بیماری از بیماری‌های قدیمی انگور است و تا کنون روش قطعی برای کنترل این بیماری در انگور ذکر نشده است. کنترل بیولوژیکی گونه‌های دیگر باکتری عامل گال از جمله جدایه‌های درختان میوه هسته‌دار با جدایه *Rh. radiobacter* K84 با موفقیت همراه بوده است (Tzvi and Citovsky, 2003). این جدایه مفید با تولید آنتی بیوتیک Agrocin 84 باعث مرگ جدایه‌های بیماری‌زا می‌گردد. در مورد نقش و استفاده از سایر باکتری‌های آنتاگونیست از جمله باکتری‌های متعلق به جنس‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* برای کنترل بیماری خصوصاً در انگور مطالعه کمی صورت گرفته است. تا کنون تأثیر ریزوباکترهای آنتاگونیست به خصوص از گروه سودوموناس‌های فلورسنت و باسیلوس در کنترل بسیاری از بیماری‌های قارچی و باکتریایی به اثبات رسیده است و مشخص شده است که باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر خصوصاً از گروه سودوموناس‌های فلورسنت قادرند با تولید آنتی بیوتیک، سیدروفور، سیانید هیدروژن و آنزیم‌های سلولاز و پروتئاز مستقیماً عوامل بیماریزای گیاهی را مورد تأثیر قرار دهند و یا با تولید هورمون‌های گیاهی و تحریک رشد گیاه و یا القای مقاومت در گیاه به طور غیر مستقیم بر عوامل بیماریزا موثر باشند (Kloepper *et al*. 1986; Lemanceau, 1992; Nagarajkumar *et al*. 2004; Romaneko and Alimov, 2000).

مطالعه حاضر برای شناسایی باکتری‌های خاکزی باغ‌های انگور در استان زنجان و بررسی اثر آنتاگونیستی برخی از آن‌ها علیه باکتری عامل گال ریشه و طوقه انگور انجام شد.

روش بررسی

جداسازی و اثبات بیماری‌زایی باکتری *Rh. vitis*: در مورد نمونه‌های اندام‌های هوایی، نواحی دارای گال زیرجریان ملایم آب به مدت ۱۰ دقیقه شستشوی سطحی گردید، سپس گال‌های جوان با استفاده از قیچی باغبانی سترون خرد گردید. گال‌های جوان پس از جداسازی از بافت ریشه و یا ساقه در داخل هاون استریل کاملاً له شده و چندین قطره آب مقطر سترون به آن‌ها اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه نگهداری شده و سپس یک لوپ از آن روی محیط کشت PDA+$CaCO_3$، Nutrient agar (NA) و King's B به صورت مخطط کشت داده شد. ظروف پتری کشت شده در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تک کلنی‌های مرواریدی رشد یافته روی محیط‌های مختلف انتخاب و روی محیط کشت NA لکه گذاری شدند. در نهایت برای شناسایی اختصاصی باکتری کلنی‌ها رشد کرده روی محیط NA روی محیط اختصاصی Roy & Sasser لکه گذاری شدند (Schaad *et al*., 2001).

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌های اپیفیت و ساپروفیت: در تابستان ۱۳۸۸ از باغ‌های انگور در مناطق مختلف استان زنجان شامل خرمدره (۲۰ باغ واقع در روستاهای سوکهریزک و رحمت آباد)، ابهر (۸ باغ)، صائین قلعه (٦ باغ)، جاده بیجار (۸ باغ) و از شهرستان‌های ایجرود، حلب، در اطراف رود قزل اوزن و ماهنشان (۱۰ باغ) و باغ‌های مناطق شمالی استان شامل روستای تهم وهمایون (٦ باغ) بازدید و از خاک اطراف ریشه‌ی درختان سالم و آلوده و اندام‌های هوایی دارای علائم گال وتورم نمونه برداری گردید. نمونه‌های خاک در پلاستیک‌های مجزا قرار گرفته و ضمن درج کامل مشخصات به آزمایشگاه باکتری شناسی گروه گیاه پزشکی دانشگاه زنجان منتقل گردید. برای جداسازی باکتری‌ها حدود ۲۵ گرم از هر نمونه در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب

مقطر سترون روی شیکر به مدت ۱۵ دقیقه تکان داده شد. از سوسپانسیون حاصل سری رقت تا 10^{-5} تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت روی محیط‌های غذائی NA، NA دارای ۱٪ گلوکز، PDA و King's B کشت داده شد. ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت چهار روز نگهداری گردید. سپس از هر ظرف پتری باکتری‌های رشد کرده با خصوصیات مورفولوژیک متفاوت انتخاب و روی محیط NA خالص سازی شدند (Cooksey and Moore, 1979). باکتری *Rh. vitis* جدایه Beh1 جدا شده از مغان که قبلاً شناسایی و اثبات بیماری‌زائی آن انجام شده بود، از کلکسیون گروه گیاه پزشکی دانشگاه زنجان و *Rh. tumefaciens* از کلکسیون آزمایشگاه باکتری شناسی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور اخذ گردید.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها روی *Rh. vitis* در شرایط آزمایشگاه: باکتری‌های جدا شده بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک کلنی و آزمون‌های بیوشیمیائی (Schaad *et al*. 2001) گروه بندی و از بین آن‌ها ۲۰۰ جدایه برای بررسی اثرات آنتاگونیستی انتخاب شدند.

بررسی توانایی جدایه‌ها در تولید آنتی بیوتیک: این آزمون روی محیط کشت PDA انجام گردید. بدین صورت که ابتدا جدایه‌های اپیفیت و ساپروفیت بصورت لکه‌ای روی محیط PDA کشت داده شدند. سپس تشتک‌های پتری بر اساس نوع باکتری‌های مختلف به مدت ۲ تا ٦ روز در دمای ۲٤ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. پس از آن باکتری از روی محیط پاک شده و تشتک پتری به مدت ۲۰ دقیقه زیر UV قرار داده شد. سپس سوسپانسیونی از *Rh. vitis* در آب مقطر استریل تهیه شد و OD آن با دستگاه اسپکتوفتومتر روی OD_{600}:۰/۰۱ تنظیم گردید و به میزان ۱۰۰۰µl از سوسپانسیون روی محیط اضافه و با میله‌ای شیشه‌ای سرخم روی محیط کاملاً پخش گردید. یک پتری که فاقد هر گونه باکتری آنتاگونیست بود به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت نگهداری شدند. پس از دو روز که سطح پتری شاهد کاملاً توسط *Rh. vitis* پوشیده شده بود، اقدام به اندازه گیری قطر هاله ایجاد شده بین *Rh. vitis* و باکتری آنتاگونیست شد (Chen *et al*. 2007).

تولید پروتئاز: با توجه به نقش پروتئاز به عنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل زیستی، بررسی تولید این آنزیم با استفاده از محیط کشت skim milk agar (SMA) صورت گرفت. تشتک‌های حاوی محیط کشت به صورت نقطه‌ای کشت و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت نگهداری شدند. تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری به عنوان نشانه فعالیت پروتئاز ثبت گردید (Chantawannakul *et al*. 2002).

تولید سیانید هیدروژن: برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش Castric and Castric (1983) استفاده گردید. ابتدا سوسپانسیون از کشت ۲٤ ساعته هر یک از باکتری‌ها به طور جداگانه در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از هر یکروی محیط کشت NA پخش شد سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲٪ کربنات سدیم و ۵٪ اسید پیکریک) در قسمت درب پتری قرار داده شد و درب پتری با نوار پارافیلم مسدود گردید تا از خروج هر گونه متابولیت فرار از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری شود. پتری‌ها به صورت وارونه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور به مدت یک هفته نگهداری شدند. تولید HCN توسط باکتری با تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد به کرم، نارنجی، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره، و آجری مشخص و ثبت گردید.

تولید سیدروفور: این آزمون بر اساس روش Weller & Cook (1983) صورت گرفت. جدایه‌های سودوموناس روی محیط King's B حاوی غلظت‌های صفر، ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن (III) کشت و به مدت ٤ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌سلسیوسنگهداری گردیدند. سپس کلنی‌ها با استفاده از

پنبه سترون از سطح پتری پاک گردید و به مدت ۱۵ دقیقه در زیر نورUV قرار داده شد. سپس سوسپانسیونی از *Rh. vitis* در آب مقطر استریل تهیه شد و OD آن با دستگاه اسپکتروفتومتر روی OD_{600}:۰/۰۱ تنظیم گردید و به میزان ۱۰۰۰ µl از سوسپانسیون روی محیط اضافه گردید و با کمک میله‌ی شیشه‌ای سرخم بر روی محیط کاملاً پخش گردید. یک تشتک پتری که فاقد هر گونه باکتری آنتاگونیست بود به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت نگهداری شدند. تولید هاله‌ی بازدارندگی و کاهش اندازه آن با افزایش غلظت کلرید آهن (III) به عنوان تولید سیدروفور ثبت گردید.

شناسائی جدایه‌ها: پنجاه جدایه که در آزمون‌های آزمایشگاهی بیشترین اثر آنتاگونیستی را روی باکتری عامل بیماری داشتند مورد آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیائی لازم جهت شناسائی از جمله اکسیداز، واکنش گرم، احیای نیترات، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین، تولید اسید از کربوهیدرات‌ها، تولید سولفید هیدروژن، هیدرولیزتوئین ۸۰، آزمون فوق حساسیت روی شمعدانی، تولید رنگدانه فلورسنتی، آزمون تحمل نمک طعام ۲٪ ، ۵٪ و ۷٪، کاتالاز، لوان، رشد هوازی و بی‌هوازی و لهانیدن سیب زمینی و سایر آزمون‌های لازم قرار گرفتند (Schaad *et al*., 2001).

ردیابی ژن مؤثر در سنتز سیانید هیدروژن: از آغازگرهای اختصاصی:

PM2 (5'-TGC GGC ATG GGC GTG TGC CAT TGC TGC CTG G-3')

و PM7-26R (5'-CCG CTC TTG ATC TGC AAT TGC AGG CC-3') برای ردیابی ژن *hcnABC* در مسیر بیوسنتز سیانید هیدروژن استفاده گردید (Svercel *et al*. 2007).

آماده سازی نمونه‌ها برای PCR: مقدار کمی از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط NA برداشته شد و در ۱/۵ میلی‌لیتر از resuspension buffer (RB) (0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8) سوسپانسیون گردید. سوسپانسیون باکتری به مدت ۲ دقیقه در دور rpm ۹۰۰۰ سانتریفوژ (Eppendorf, Model Mini Spin 22331) شد و سپس فاز رویی حذف گردید. به منظور تخریب دیواره سلولی به هر تیوب، µl ۱۰۰ از NaOH (۰/۰۵ مولار) اضافه گردید و داخل ترمومیکسر (Corbett Research, Model GP001) به مدت ۱۵ دقیقه با دمای ۹۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت فاز روئی به تیوب‌های دیگر منتقل و کلیه نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Ramette *et al*. 2003).

شرایط انجام PCR: آغازگرها، ساخت شرکت MWG Biotech کشور آلمان، همراه با سایر مواد مصرفی توسط شرکت فن آوری زیست کوثر تهیه گردید. PCR در ۱۲ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل مواد زیر انجام شد: ۴ میکرولیتر از نمونه باکتریایی آماده شده، بافر ×۱ PCR، ۱۰۰ میلی مول مخلوط دی نوکلئوزید تری فسفات ($dNTP_S$)، ۱/۴ واحداز آنزیم Smart-*Taq*، ۰/۴پیکو مول از هر آغازگر ، دی متیل سولفوکسید (DMSO) ۵٪ و ۰/۰۵گرم در لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA). برنامه چرخه حرارتی عبارت بود از ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در ۶۷ درجه سلسیوس و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس؛ و بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس (Svercel *et al*. 2007). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه PCR مدل Eppendorf Mastercycler gradient انجام شد. به منظور اطمینان از صحت آزمایش از استرین *P. fluorescens* CHAO (تهیه شده از کلکسیون باکتری شناسی موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور) که دارای ژن سنتز *hcnABC* می‌باشد به عنوان شاهد مثبت و از بافر لایز به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. محصول PCR (۶µl) روی ژل آگاروز ۱٪ و در بافر ×۱ Tris-borate-EDTA (TBE) و در جریان ۱۶۰ ولت الکتروفورز شد. جهت تخمین اندازه فرآورده‌های تکثیر شده در PCR از نشانگر ژنومی یک کیلو جفت بازی (gene ruler 1kbp DNA ladder) ساخت شرکت MBI کشور آلمان استفاده شد. سپس ژل با محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی شده و با دستگاه

Gel-Documentation عکس‌برداری صورت گرفت.

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌ها در شرایط گلخانه‌ای: هفت جدایه P_{KSM}، B_{KA}، B_{M99}، B_{B55}، P_{KS9}، P_{KS5} و P_{KS4} که در آزمون‌های آزمایشگاهی بیشترین اثر بازدارندگی را روی *Rh. vitis* نشان دادند برای آزمایش گلخانه‌ای انتخاب شدند. این آزمون در شرایط گلخانه با دمای متوسط ۲۵ درجه سلسیوس و دوره روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعت انجام شد. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار شامل ۷ جدایه باکتریایی و یک شاهد (آب مقطر) در سه تکرار انجام شد. صفت مورد آزمایش تأثیر هر جدایه بر جمعیت *Rh. vitis* در خاک بود.

تهیه و آماده سازی سوسپانسیون باکتری‌های اپیفیت و ساپروفیت: هر جدایه موردآزمایش در محیط Nutrient broth کشت داده شد و به مدت ۲۸ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۸۰rpm در دمای اتاق قرار داده شد. سپس به مدت ۷ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰g سانتریفوژ گردید. فاز روئی لوله حذف گردید و باکتری‌های ته نشین شده در لوله توسط آب مقطر سترون سوسپانسیون شد. برای بدست آمدن سوسپانسیون یکنواخت لوله‌ها به مدت ۲ دقیقه شیکر شد. در نهایت OD سوسپانسیون حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست با جمعیت (10^8cfu/ml) OD سوسپانسیون در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۰۶ تنظیم گردید (Chen *et al*. 2007; Rhouma *et al*. 2006). در ادامه برای هر گلدان ۷۰ گرم خاک غیر استریل به نسبت (۲ خاک زراعی:۱ کود دامی) تهیه گردید و ۳۵ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده از باکتری‌ها به خاک تزریق شد.

تهیه و آماده سازی سوسپانسیون *Rh. Vitis*: سوسپانسیون باکتری *Rh. vitis* جدایه Beh1 مطابق روشی که برای جدایه‌های اپیفیت ذکر شد تهیه گردید با این تفاوت که برای تهیه سوسپانسیون *Rh. vitis* با جمعیت 10^6 cfu/ml، OD سوسپانسیون *Rh. vitis* در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۰۴ تنظیم گردید (Chen *et al*. 2007). پس از گذشت ۴۸ ساعت از مایه زنی باکتری آنتاگونیست ۳۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون *Rh. vitis* به گلدان‌ها اضافه شد. لازم به ذکر است که در تیمار شاهد تنها ۳۵ میلی‌لیتر از *Rh. vitis* تلقیح گردید.

تعیین جمعیت *Rh. Vitis*: گلدان‌ها به مدت یک ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند. سپس یک گرم از خاک هر گلدان در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حل گردید و به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. از سوسپانسیون‌های مذکور سری رقت تهیه گردید. سپس ۵۰µl از رقت‌های مختلف و در سه تکرار به محیط کشت‌های Roy & Sasser و $PDA+CaCO_3$ منتقل و به کمک میله‌ی شیشه‌ای سر کج در سطح محیط کاملاً پخش و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. سپس تعداد کلنی‌های *Rh. vitis* در تشتک‌های پتری‌شمارش گردید (Chen *et al*. 2007). به منظور تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SAS (version 9) استفاده گردید و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای LSD استفاده شد.

نتیجه و بحث

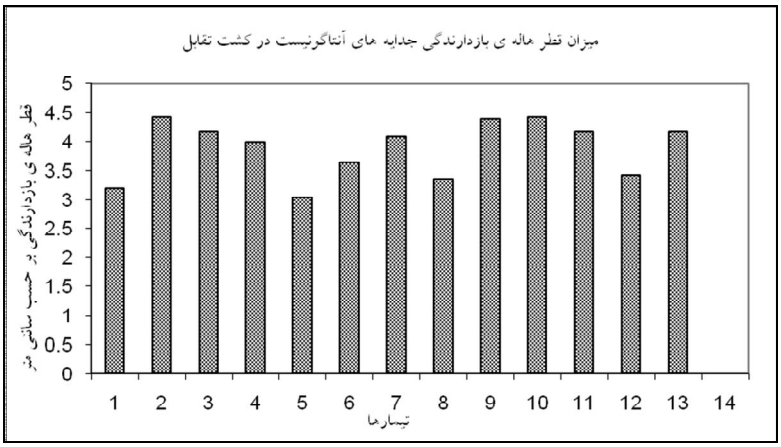
از نمونه‌های جمع آوری شده از انگور دارای علایم گال، کلنی‌هایی سفید تا خاکستری، کمی برجسته و براق روی محیط کشت‌های $PDA+CaCO_3$، Nutrient agar (NA) و King's B رشد نمودند. این کلنی‌ها روی محیط کشت اختصاصی Roy & Sasser گرد با مرکز قرمز تیره و حاشیه سفید بودند. ویژگی‌های کلنی این باکتری‌ها روی محیط کشت اختصاصی با ویژگی‌های ذکر شده برای *Rh. vitis* مطابقت داشت (Schaad *et al*. 2001). در آزمون بیماری‌زایی، استرین‌ها توانستند گال‌های ریز سفید رنگی روی دیسک‌های هویج و گال‌های ریز مایل به سبز روشن در ساقه گوجه فرنگی به ترتیب پس از ۱۵ و ۲۰ روز ایجاد نمایند.

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست: از نمونه‌های جمع

آوری شده از خاک اطراف ریشه انگور در باغ‌های مناطق مختلف استان، در مجموع ۹۵۰ جدایه باکتریایی روی محیط‌های کشت مختلف بدست آمد که پس از گروه بندی بر اساس منطقه جداسازی، ویژگی‌های مورفولوژیکی کلنی روی محیط کشت و نتایج چند آزمون کلیدی همچون گرم، اکسیداز و رشد هوازی یا بی هوازی، ۲۰۰ جدایه برای بررسی اثرات آنتاگونیستی انتخاب شدند. بر اساس نتایج آزمون‌های انجام شده برای شناسایی پنجاه جدایه که در آزمون‌های آزمایشگاهی بیشترین اثر آنتاگونیستی را روی باکتری عامل بیماری داشتند، گروه های باکتریایی زیر شناسایی شدند:

گروه اول شامل باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز مثبت، هوازی با توانایی تولید رنگدانه فلورسنت در محیط کینگ ب و تولید آنزیم‌های لیپاز، کاتالاز و آرجینین دهیدرولاز؛ و ناتوانی در لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، عدم ایجاد فوق حساسیت در توتون، تولید سولفید هیدروژن از سیستئین، هیدرولیز نشاسته و رشد در ۴۰ درجه سلسیوس که بر اساس این خصوصیات این جدایه‌ها به سودوموناس‌های فلورسانت تعلق داشتند. تعدادی از این جدایه‌ها که قادر به تولید لوان، لسیتیناز و هیدرولیز ژلاتین بودند اما نیترات را احیا نکردند *P. fluorescens* biov. I شناسایی شدند و آن‌هایی که لوان تولید نکردند اما قادر به احیای نیترات، تولید لسیتیناز و هیدرولیز ژلاتین بودند به عنوان *P. fluorescens* biov.III شناسایی شدند. همچنین نتیجه آزمون‌های تولید لوان، احیای نیترات و هیدرولیز ژلاتین برای تعدادی از این جدایه‌ها منفی بود در حالیکه قادر به تولید لسیتیناز بودند و بر این اساس به *P. fluorescens* biov.v تعلق گرفتند. همچنین خصوصیات تعداد کمی‌از این جدایه‌ها از جمله عدم توانایی آن‌ها در احیای نیترات، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان و لسیتیناز، با خصوصیات ذکر شده برای *P. putida* همخوانی داشت (Schaad *et al*. 2001).

گروه دوم شامل باکتری‌های گرم مثبت و قادر به مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته، رشد در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، رشد در محیط کشت حاوی هفت درصد نمک طعام، تولید اسید از زایلوز، آرابینوز و مانیتول و اکسیداز منفی که این خصوصیات با خصوصیات ذکر شده برای *B. subtilis* مطابقت داشت (Schaad *et al*. 2001). همه این پنجاه جدایه روی محیط کشت PDA از رشد باکتری عامل بیماری جلوگیری کردند و هاله بازدارندگی تولید شده توسط ۳۰ جدایه قطری بیشتر از ۳/۵ سانتی‌متر داشت.



شکل ۱- بازدارندگی از رشد *Rhizobium vitis* در محیط کشت PDA توسط باکتری‌های جدا شده از خاک باغ‌های انگور در استان زنجان (داده‌ها در نمودار میانگین سه تکرار می‌باشند).

Fig. 1. The inhibition of *Rhizobium vitis* growth in PDA culture medium by bacteria isolated from vineyard soil in Zanjan province (data are the mean of three replicates). **1**: *Pseudomonas* sp. (P_{K5}) **2**: *P. fluorescens* bv. III (P_{ks9}) **3**: *Bacillus* sp. (B_{M99}) **4**: *B. subtilis* (B_{A325}) **5**: *Pseudomonas* sp. (P_{G58}) **6**: *P. Putida* (P_{K7}) **7**: *Bacillus* Sp. (B_{KA}) **8**: *P. putida* (P_{K1}) **9**: *P. fluorescens* bv I (P_{KS5}) **10**: *P. fluorescens* bv V (P_{KS4}) **11**: *P. fluorescens* bv III (P_{KSM}) **12**: *Bacillus* sp. (B_{k18}) **13**: *B. subtilis* (B_{B55}) **14**: Control

پنج استرین از *B. subtilis* توانستند آنزیم پروتئاز تولید کنند و نتیجه آزمون تولید سیانید هیدروژن برای پنج استرین *P. fluorescens* مثبت بود (شکل ۱، جدول ۱).

تولید سیدروفور: در بررسی نقش سیدروفور در بازدارندگی از رشد *Rh. vitis* در محیط King's B، نتایج متفاوتی از جدایه‌ها به دست آمد. بطوریکه برخی از جدایه‌ها هیچگونه‌هاله بازدارندگی از رشد ایجاد ننمودند. اندازه هاله بوجود آمده توسط برخی دیگر از جدایه‌ها ارتباطی با غلظت کلرید آهن (III) موجود در محیط نداشت و قطر هاله برابر قطرهاله بوجود آمده در محیط King's B فاقد کلرید آهن (III) بود که بیانگر تولید ماده بازدارنده دیگری همچون آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد. اما اندازه هاله بازدارنگی ایجاد شده توسط برخی جدایه‌های متعلق به *P. fluorescens* با افزایش غلظت کلرید آهن (III) در محیط نسبت عکس نشان داد که بیانگر تولید سیدروفور توسط آن‌ها بود (جدول ۱).

تولید سیانید هیدروژن و ردیابی ژن *hcnABC*: چهار استرین متعلق به *P. fluorescens* و یک استرین متعلق به *P. putida* در آزمون مربوط به بررسی توانایی باکتری‌ها در تولید سیانید هیدروژن، توانستند از رشد باکتری عامل بیماری جلوگیری نمایند. نتیجه ردیابی ژن سنتز سیانید هیدروژن با استفاده از PCR و آغازگرهای PM2 و PM7، برای این پنج استرین مثبت بود بطوریکه این آغازگرها یک قطعه ۵۷۰ کیلوبازی را از ژنوم این پنج استرین و نیز استرین *P. fluorescens* CHAO (شاهد مثبت) تکثیر نمودند (جدول ۱، شکل ۲).

تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست بر جمعیت *Rh. vitis* در شرایط گلخانه: پتری‌های کشت شده از رقت 10^{-3} سوسپانسیون خاک برای شمارش کلنی‌های *Rh. vitis* مناسب بودند. بر اساس نتایج، همه باکتری‌های آنتاگونیست به کار رفته توانستند با تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد موجب کاهش جمعیت *Rh. vitis* در خاک شوند. استرین‌های *P. fluorescens* bv. III (P_{KSM})، *P. fluorescens* bv. V (P_{KS4}) و *B. subtilis* (B_{B55}) بیشترین تأثیر را در کاهش جمعیت باکتری عامل بیماری داشتند. جدایه P_{K7} متعلق به گونه‌ی *P. putida* با کمترین تأثیر بر کاهش جمعیت *Rh. vitis* در پایین‌ترین سطح تأثیر قرار گرفت. تجزیه واریانس داده‌ها در سطح ۱ درصد ($P<\%1$) معنی‌دار بود. در این تحقیق برای اولین بار در کشور امکان کنترل باکتری عامل گال ریشه و طوقه انگور توسط باکتری‌های خاکزی بررسی شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های مختلفی عمدتاً متعلق به بیووارهای یک و سه از باکتری *P. fluorescens*، *P. putida* و *B. subtilis* به طور پراکنده در باغ‌های انگور استان زنجان وجود دارند که قادرند به طور چشمگیر از رشد باکتری عامل بیماری جلوگیری نمایند. هر چند گزارش‌های 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 ذیل محدود می‌گردد. در تحقیقی انجام شده در کانادا، هشتصد و پنجاه جدایه باکتری از باغ‌های انگور فعالیت بازدارندگی علیه *A. vitis* نشان دادند که از بین آن‌ها تأثیر آنتاگونیستی جدایه‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Enterobacter agglomerans* چشمگیر بود (Chen *et al*. 2007; Rhouma *et al*. 2008). همچنین باکتری *B. subtilis* توسط Hassanein & Goorani (1991) به عنوان عامل کنترل کننده *Rh. tumefacines* معرفی شد. این دو محقق اثر تمامی ۱۹ استرین این باکتری از ۷ منبع مختلف را در کنترل گال اگروباکتریومی‌درخت سیب مثبت ارزیابی کردند. در مطالعات بعدی تولید ترکیبات ضد میکروبی به نام Bacteriocin 14B به عنوان مکانیزم اصلی در تأثیر آنتاگونیستی *B. subtilis* علیه *Rh. vitis* معرفی گردید (Hammami *et al*. 2009). همچنین ممانعت از رشد *A. vitis* توسط استرین‌های *P. fluorsecens* Q8r-96، *P. fluorsecens* B4118 و *Serratia plymuthica* در محیط کشت PDA توسط Dandurishivii *et al*. (2010) گزارش گردیده است. بر اساس نتایج مطالعه حاضر، باکتری‌های آنتاگونیست قوی متعلق به دو جنس سودوموناس و باسیلوس شناسایی شدند.

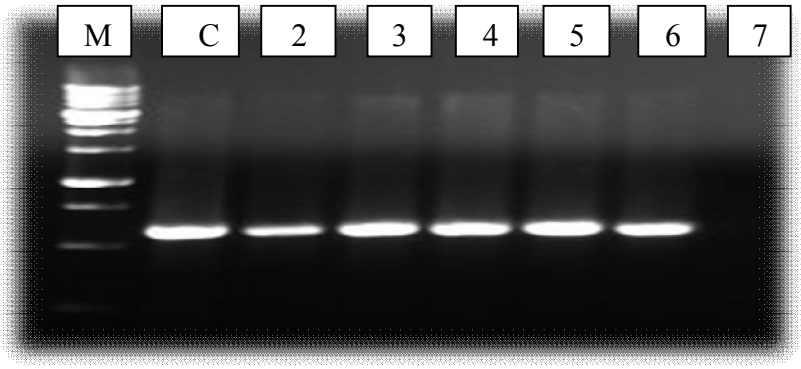
جدول ۱- مهم‌ترین باکتری‌های خاکزی جدا شده از باغ‌های انگور استان زنجان با توانایی بازدارندگی از رشد *Rhizobium vitis* و بعضی خواص آنتاگونیستی آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی

Table 1. The most important soil-inhabiting bacteria isolated from vineyards in Zanjan province with inhibitory effect on *Rhizobium vitis* and some of their *in vitro* antagonistic characteristics

کد استرین Strain code	استرین باکتری Bacterial strain	تولید سیانید هیدروژن Hydrogen cyanide production	تولیدپروتئاز Protease production	تولید سیدروفور Siderophore production	قطر هاله بازدارندگی از رشد *Rh. vitis* در محیط کشت PDA The diameter of the inhibition zone of *Rh. vitis* growth on PDA
B_{B55}	*Bacillus subtilis*	−	+	−	4.1*
B_{M99}	*Bacillus subtilis*	−	+	−	4.1
B_{KA}	*Bacillus subtilis*	−	+	−	4.1
B_{K18}	*Bacillus* sp.	−	+	−	3.4
P_{KS9}	*Pseudomonas fluorescens* bv. III	+	−	+	4.4
P_{KS5}	bv. I *Pseudomonas fluorescens*	+	−	+	4.3
B_{A325}	*Bacillus subtilis*	−	+	−	4
P_{K5}	*Pseudomonas* sp.	−	−	−	3.2
P_{K1}	*Pseudomonas putida*.	+	−	+	3.3
P_{K7}	*Pseudomonas putida*.	−	−	+	4.1
P_{KSM}	*Pseudomonas fluorescens* bv. III	+	−	+	4.1
P_{G58}	*Pseudomonas* sp.	−	−	−	3.3
P_{KS4}	*Pseudomonas fluorescens* bv. V	+	−	+	4.5

*Data (cm) are the mean of three replicates

* داده‌ها بر حسب سانتی‌متر و میانگین سه تکرار می‌باشند.



شکل ۲- ردیابی ژن *hcnABC* با استفاده از آغازگرهای PM2 و PM7- 26R در استرین‌های *Pseudomonas fluorescens* جداشده از خاک باغ‌های انگور در استان زنجان

Fig. 2. Detection of the *hcnABC* gene using PM2 and PM7-26R primers in *Pseudomonas fluorescens* strains, isolated from vineyard soil in Zanjan province. **M:** Marker، **C**: *Pseudomonas fluorescens* CHAO (the positive control), **2**: *P. fluorescens* P_{KS4}، **3**: *P. putida* P_{K1}, **4**: *P. fluorescens* P_{KS5}, **5**: *P. fluorescens* P_{KSM}, **6**: *P. fluorescens* P_{KS9} ،**7:** negative control

اما ممکن است باکتری‌های دیگری غیر از باکتری‌های متعلق به دو جنس مذکور یافت شوند که توانایی بازدارندگی از رشد باکتری عامل بیماری را داشته باشند. برای مثال در بررسی Chen *et al*. (2007) استرینی از *Enterobacter agglomerans* از موستان آلوده به *A. vitis* جداسازی شد که علاوه بر ممانعت از رشد *A. vitis* توانست از فعالیت گونه‌های دیگر این باکتری از جمله *A. tumefacines* و *A. rhizogenes* در شرایط آزمایشگاهی و شرایط مزرعه جلوگیری کند. به همین دلیل در ادامه تحقیق حاضر نمونه برداری از مناطق وسیع‌تری در سطح استان زنجان و حتی استان‌های همجوار در حال انجام است. Rhouma *et al*. (2008) گزارش کرد که *B. subtilis* و *P. fluorescens* علیه استرین‌های نوپالین *A. tumefacines* C58 و *A. tumefacines* AR125 و نیز استرین اکتوپاین *A. tumefacines* B6 موثر بوده‌اند. این در حالی است که استرین‌های K84 و K1026 باکتری *Rh. radiobacter* که به عنوان استرین‌های موفق و تجاری برای کنترل بیماری استفاده می‌شوند هیچگونه تأثیری در جلوگیری از رشد استرین‌های اکتوپاین، از جمله استرین‌های *Rh. vitis* ندارند. این مطلب ضمن تأکید بر متفاوت بودن ترکیبات ضد میکروبی باسیلوس و سودوموناس با ترکیب ضد میکروبی تولید شده توسط استرین‌های K84 و K1026، بیانگر امکان استفاده از باکتری‌های متعلق به جنس‌های سودوموناس و باسیلوس برای کنترل باکتری بیماریزا در مواقع عدم کارآیی *Rh. radiobacter* می‌باشد.

به دلیل محدودیت زمان در این مطالعه، در بررسی گلخانه‌ای تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست فقط بر جمعیت باکتری عامل بیماری در خاک مطالعه شد و بهتر است در ادامه این تحقیق تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست روی بیماری در گیاه میزبان و یا گیاه محک نیز بررسی شود. برای مثال بر اساس مطالعه Dandurishivili *et al*. (2010)، استرین‌های *P. fluorescens* B-4117 و *P. fluorescens* Q8RL بطور چشمگیر سبب کاهش حجم توده‌های گال ایجاد شده توسط *A. vitis* در گوجه فرنگی شدند. البته به دلیل خاکزی بودن عامل بیماری و بقا آن در خاک، کاهش جمعیت آن تحت تأثیر باکتری‌های آنتاگونیست می‌تواند نوید بخش کنترل موفق بیماری روی میزبان باشد. نتایج آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که در مورد استرین‌های *P. fluorescens* و *B. subtilis* هماهنگی کامل بین نتایج آزمون‌های بیوکنترل در شرایط آزمایشگاه و نتایج گلخانه‌ای وجود دارد به طوریکه در آزمون‌های آزمایشگاهی بیشتر از سایر باکتری‌ها از رشد *Rh. vitis* جلوگیری کردند و از طرف دیگر بیشترین تأثیر در کاهش جمعیت باکتری بیمارگر در خاک را داشتند. تنوع در مکانیزم آنتاگونیستی باکتری‌های شناسایی شده اعم از تولید آنتی‌بیوتیک ،سیدروفر، سیانید هیدروژن و آنزیم پروتئاز نقطه قوتی برای استفاده از آن‌ها به عنوان عوامل بیوکنترل محسوب می‌گردد.

References

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

CHANTAWANNAKUL, P., A. ONCHAROEN, K. KLANBUT, E. CHUKEATIROTE and S. LUMYONG, 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. Science 28: 241-245.

CHEN, F., Y. B. GUO and H. M. WANG, 2007. Biological control of grape crown gall by *Rahnella aquatitis* HX_2. Plant Disease. 91: 957-963.

COOKSEY, D. A. and L. W. MOORE, 1979. Biological control crown gall with fungal and bacterial antagonistis. Phytopathology. 70: 506-509.

DANDURISHIVILI, N., N. TOKLISHIVILI, M. OVADIS, P. ELIASHIVILI, N. GIORGOBIAN, I. KHEMEL, E. SZEGEDI and L. CHERNIN, 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.

HAMMAMI, I., A. RHOUMA, A. REBAI and X. NESME, 2009. Optimization and biochemical characterization of a bacteriocin from a newly isolated *Bacillus subtilis* strain 14B for biocontrol of *Agrobacterium* spp. Journal of Microbiology. 72: 765-776.

HASSANEIN, F. M. and M. A. EL-GOORANI, 1991. The effect of *Bacillus subtilis* on *in vitro* growth and pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens*. Phytopathology. 3: 239-246.

KLOEPPER, J. W., M. N. SCHROTH and T. D. MILLER, 1986. Effects of rhizospher colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato development and yield. Phytopathology. 70: 1078-1082.

LEMANCEAU, P. 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants: example of fluorescent *Pseudomonas* spp. Agronomie. 12: 413-437.

MAVRODI, O. V., B. B. MCSPADDEN, D. V. MAVRODI, R. F. BONSALL, D. M. WELLER, and L. S. THOMASHOW, 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2,4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology. 91: 35-43.

NAGARAJKUMAR, M., R. BHASKARAN and R. VELAZHAHAN, 2004. Involvement of secondary metabolites and lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. Journal of Microbiology. 159: 73-81.

RAMETTE, A., M. FRAPOLI and G. DEFAGO, 2003. Phylogeny HCN synthase-encoding *hcnBC genes* in biocontrol fluorescent pseudomonads and its relationship with host plant species and HCN synthesis ability. Journal of Plant Disease. 16: 525-535.

RHOUMA, A., M. BOURI, A. BOUBAKER, and X. NESME, 2008. Potential effect of rhizobacterial in the management of crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefacines* biovar 1. *J. Plant pathol.* 3: 517-526.

ROMANEKO, V. M. and D. M. ALIMOV, 2000. Ability of representatives of *Pantoea agglomerans* as well as *Bacillus subtilis* and some species of *Pseudomonas* genus to inhibit growth of phytophathogenic bacteria and *Mycromycetes* and regulated plant growth. Journal of Microbiology. 62: 29-37.

SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUM, 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Amer. Phytopathol. Soc., St., Paul, Minnesota, USA. 373.

SVERCEL, M. B. DUFFY and G. DEFAGO, 2007. PCR amplification of hydrogen cyanide biosynthetic locus *hcnABC* in *Pseudomonas* spp. Journal of Microbiology. 70: 209-213.

TZVI, T. and V. CITOVSKY, 2003. The *Agrobacterium*_ plant cell Interaction. Journal of Plant Physiology. 133:943-947.

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