نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ص. ۸۶-۷۹

Journal of Plant Protection
Vol. 28, No. 1, Spring 2014, P. 79-86

بررسی جدایه های باسیلوس افزایش دهنده رشد گیاه در کلونیزاسیون ریشه گوجه فرنگی و کاهش جمعیت *Meloidogyne javanica*

مریم رمضانی مقدم[۱]- وحید جهانبخش[۲]- عصمت مهدیخانی مقدم[۳]- ساره بقائی راوری[۴*]- حمید روحانی[۵]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۸/۶
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۹/۱۲

چکیده

در تحقیق حاضر، اثر جدایه های باسیلوس دارای قدرت بیو کنترلی بالا علیه نماتد ریشه گرهی، از نقطه نظر توانایی تشکیل بیوفیلم و میزان کلونیزاسیون ریشه در شرایط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت. از میان ۱۳۹ جدایه باسیلوس بدست آمده از ریزوسفر گوجه فرنگی از نواحی مختلف استان خراسان رضوی، ۱۵ جدایه که در آزمون سنجش زیستی بیشترین درصد مرگ و میر لارو و عدم تفریخ تخم را نشان دادند، از نظر تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاه مورد آزمون قرار گرفتند. بر اساس میزان تولید بیوفیلم، شش جدایه MD6.5، MD1.8، Bag2.13، N2.2، FT1.7 و *B.subtilis* برای آزمایشات گلخانه ای و سنجش کلونیزاسیون ریشه انتخاب شدند. بر اساس یافته های بررسی حاضر، دو جدایه MD1.8 وMD6.5 به ترتیب با ۷۵ و ۹۹ درصد مرگ و میر لارو در آزمون سنجش زیستی، تشکیل بالاترین میزان بیوفیلم در شرایط آزمایشگاه، استقرار بر روی ریشه های گوجه فرنگی رقم ارلی اوربانا وی اف به میزان ۱×۱۰^{۶} و ۲×۱۰^{۶} سلول باکتری در میلی لیتر، کاهش علائم بیماری در مقایسه با شاهد آلوده به نماتد و توسعه پارامترهای رشدی گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه، به عنوان جدایه های باسیلوس توانمند، جهت بررسی های مزرعه ای پیشنهاد می شوند. به نظر می رسد توانایی کلونیزاسیون قوی ریشه گیاه گوجه فرنگی توسط جدایه های باسیلوس بتواند نقش مهمی در حفاظت گیاه علیه بیمارگر عامل ریشه گرهی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، بیوفیلم، کلونیزاسیون، کنترل، نماتد

مقدمه

گرایش روزافزون به کاهش یا عدم استفاده از سموم شیمیایی جهت کنترل بیماری های گیاهی منجر به توسعه روش های جایگزین یا همراه کنترل شیمیایی شده است. یکی از این روش ها استفاده از میکروارگانیسم های مفید خاک می باشد. روش های مورد استفاده در کنترل بیولوژیک موجب کاهش استفاده از ترکیبات شیمیایی نامطلوب و مضر برای سلامت انسان می شود. بررسی اهمیت میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و اطراف ریشه گیاه و چگونگی کارایی روش های مولکولی جدید جهت مطالعه آنها، دیدگاه های جدیدی را پیش روی محققان مباحث کنترل بیولوژیک قرار داده است (۱۵). در بیشتر اکوسیستم های خشکی تنوع بسیار زیادی از میکروارگانیسم ها مشاهده می شود، به همین ترتیب در محیط محدود فراریشه گیاهان، فعالیت های میکروبی مختلفی رخ می دهد که از محتوای ترشحات ریشه گیاه تاثیر می پذیرد. مواد ترشحه از ریشه حاوی انواع مواد غذایی مورد نیاز میکروارگانیسم هاست و انرژی لازم جهت رشد، تکثیر و فعالیت های فیزیولوژیکی آنها را فراهم می آورد. این زیستگاه کوچک، محلی برای تعامل بین گیاه، میکروارگانیسم‌های مفید و بیمارگرها می باشد (۱۶). در منطقه ریزوسفر، میکروارگانیسم‌ها برای کسب مواد غذایی که از طریق ترشحات ریشه ایجاد شده است، رقابت می کنند که این عامل، فاکتور موثری در اکثر برهم کنش های بین باکتری های فضای فراریشه و بیمارگرها می باشد (۱۷). پیشرفت های موجود در زمینه تکنولوژی مولکولی و میکروسکوپ ها، تحقیقات روی اجتماعات میکروبی را برای درک جزئیات بیشتر ممکن ساخته است. بیوفیلم توده ای از میکروارگانیسم ها می باشد که در آن توده، سلول ها به یکدیگر و به سطحی که بر روی آن قرار گرفته اند، چسبیده اند. این سلول های چسبیده و محکم، به وسیله ماتریکس تولید شده حاصل از مواد پلیمری خارج سلولی به سختی به یکدیگر متصل شده اند (۳۱ و ۳۳). بسیاری از میکروارگانیسم ها مثل باکتری

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، مربی، دانشیار، استادیار و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول : Email: s.baghaee@ferdowsi.um.ac.ir)

ها، پروتوزوئرها، قارچ ها و جلبک ها قادر به تشکیل بیوفیلم می‌باشند. در تشکیل بیوفیلم موادی تولید می گردد که باکتری های منفرد توانایی تولید آن را ندارند (۶ و ۱۳). تحقیقات انجام شده وجود چندین مکانیسم با منشاء ژنتیکی را در تشکیل بیوفیلم مطرح می‌سازد. پدیده حد نصاب حس گری[1] و تولید پیام آور جدید ثانویه تحت نام سیکلیک دی گوانوزین منو فسفات[2] در این امر نقش دارند. کلونیزاسیون با تشکیل بیوفیلم ارتباط تنگاتنگ داشته و ر اهکاری جهت بقاء باکتری در برابر تنش های محیطی می باشد. همچنین به عنوان یک مکانیسم دفاعی در باکتری های مفید علیه سایر میکروارگانیسم ها مطرح است (۲۵). در یک گرم خاک فراریشه ممکنست چندین هزار ژنوتیپ میکروبی یافت شود، برخی از باکتری های همراه ریشه می‌توانند اثرات مفیدی روی گیاه داشته باشند که آنها را ریزوباکتری‌های افزایش دهنده ی رشد گیاه (PGPR)[3] می‌نامند. باکتریهای افزایش دهنده رشد گیاه، تاثیرات مثبتی بر پارامترهای سرعت جوانه زنی بذر، تحمل گیاه به خشکی و تنش شوری، افزایش وزن اندام های هوایی، ریشه و مهمتر از همه کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی دارند (۱۴). مطالعات مختلف حاکی از اهمیت تشکیل بیوفیلم، توسط باکتریهای افزایش دهنده رشد در حفاظت گیاهان دارند. باکتری های *Paenibacillus polymyxa* و *B. subtilis* استرین ATCC 6051 با تشکیل ساختارهای شبه بیوفیلم، به ترتیب ریشه های گیاهان بادام زمینی و آرابیدوپسیس را کلونیزه نموده و گیاهان را در مقابل آلودگی به بیمارگرها محافظت می نمایند (۱و۱۱). گزارشاتی اندکی در ارتباط با رفتار گونه های مختلف باسیلوس در تولید بیوفیلم و بالاخص نقش آن در کلونیزاسیون ریشه و متعاقب آن کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی وجود دارد. گونه های *B. subtilis* (۲۶ و ۲۷) و *B. amyloliquefaciens* (۲۹ و ۳۹) به عنوان تشکیل دهنده قوی بیوفیلم بر سطح ریشه گیاهان مطرح هستند. در کلونیزاسیون بذر سویا توسط گونه *B. amyloliquefaciens* ، پارامترهایی چون کموتاکسیس، رشد و تشکیل بیوفیلم دخیل می باشند، که تغییرات کمی ترکیبات مترشحه از ریشه در این امر دخالت دارد (۳۹). با وجود تأثیرپذیری بالای جدایه های جنس باسیلوس در کنترل نماتدهای بیمارگرگیاهی (۲۵، ۳۷ و ۳۸) و افزایش شاخص های رشدی گیاه (۲۰ و ۲۴)، در ارتباط با مکانیسم القاء سرکوب نمودن نماتد های بیمارگر گیاهی توسط باکتریهای افزایش دهنده رشد گیاهی، مطالعات اندکی انجام شده است (۳). جدایه های *B. subtilis* تولید کننده سرفکتین و تشکیل دهنده بیوفیلم، توانایی کنترل بیمارگرهای باکتریایی آرابیدوپسیس را در مقایسه با جدایه جهش یافته ناکارا در تولید ترکیبات فوق، را دارد (۱). فعالیت بیماریزایی برخی پروتئازهای مترشحه از گونه های باسیلوس، تاثیر مثبتی در مرگ ومیر نماتدها داشته اشت (۳۰). گزارشات متعددی مبنی بر نقش بیوفیلم در کارایی بیوکنترل وجود ندارد. بررسی خضری و همکاران (۱۸) در مورد تاثیر نوع محیط کشت و میزان تولید بیوفیلم در گونه *B. subtilis* حاکی از عدم همبستگی بین دو فاکتور فرض شده بود. همچنین نتایج آزمایشات این گروه، عدم وجود ارتباط بین قندها و اسیدآمینه های مترشحه از ریشه گندم بر روی تشکیل بیوفیلم در باکتری مذکور را نشان داد. در بررسی های اخیر (۴) سیستم مدل برای تعاملات گوجه فرنگی و باکتری *B. subtilis* علیه بیمارگرهای گیاهی ارائه شده است. بر اساس یافته های این گروه، تشکیل بیوفیلم باعث تسهیل کلونیزاسیون ریشه های گیاه توسط *B. subtilis* می شود و این پدیده، گام ابتدایی برای القاء فعالیت بیوکنترل گیاه علیه بیمارگرهای گیاهی می باشد. در بررسی حاضر، تاثیر باسیلوس های افزایش دهنده رشد گیاه، از نقطه نظر قدرت کلونیزاسیون ریشه گیاه گوجه فرنگی و کاهش جمعیت نماتد ریشه گرهی ارزیابی می شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی جدایه های جنس باسیلوس

تعداد ۱۲۸ نمونه خاک (شامل ریشه های گندم همراه با خاک فراریشه اطراف آن) از مزارع مختلف گوجه فرنگی استان خراسان رضوی جمع آوری گردید. پس از تهیه سری رقت، رقت های 10^{-3} و 10^{-4} روی محیط کشت آگار غذایی کشت داده شدند و مراحل خالص سازی تک کلنی های باکتریایی انجام شد. شناسایی جنس باسیلوس از بین جدایه های باکتریایی به روش شاد و همکاران (۳۴) انجام شد.

انتخاب جدایه های برتر جنس باسیلوس در آزمون زیست سنجی در شرایط آزمایشگاه

آزمون سنجش زیستی جدایه های باسیلوس بر اساس روش تغییر یافته لیان و همکاران (۲۱) در شرایط آزمایشگاه انجام شد. تعداد ۱۵ جدایه که بیشترین درصد مرگ و میر لارو و عدم تفریخ تخم را نشان دادند، برای انجام بررسی های بعدی انتخاب شدند.

توانایی تشکیل بیوفیلم توسط جدایه های برتر باسیلوس

این آزمون به روش ناگورسکا و همکاران انجام شد (۲۸). ابتدا جدایه های باسیلوس به مدت یک شبانه روز در محیط کشت LB در دمای $37^{o}C$ در حالت تکان خوردن ۱۲۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. سوسپانسیون باکتری بدست آمده توسط محیط کشت تازه LB

1 - Quorum sensing
2 - Cyclic DGMP
3 - Plant Growth Promoting Rhizobacteria

رقیق و بعد از تنظیم غلظت OD_{600}=۱، تا ۳۵۰ بار رقیق تر گردیدند. میزان ۲۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده درون چاهکهای پلیت الیزا ریخته شد و پلیت به مدت ۷۰ ساعت در دمای $37^{o}C$ بدون شیک شدن درون انکوباتور قرار گرفت، این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. از محیط کشت LB بدون باکتری به عنوان شاهد منفی و از جدایه *B.subtilis* (مربوط به کلکسیون دانشگاه فردوسی مشهد) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. پس از حذف محیط کشت و شست و شوی پلیت با آب مقطر، پلیت ا به مدت ۱۵ دقیقه در $37^{o}C$ انکوبه گردید. متعاقب آن، برای تثبیت بیوفیلم بر روی دیواره های پلیت، متانول اضافه شد. بعد از حذف متانول و شستن چاهکهای پلیت طبق مراحل قبل، محلول کریستال ویوله یک درصد برای رنگ آمیزی سلول های باکتریایی چسبیده به دیواره های پلیت اضافه گردید. بعد از گذشت پنج دقیقه محلول کریستال ویوله حذف و پلیت شسته شد. میزان چسبندگی باکتری ها به چاهکهای پلیت، بر اساس کدورت در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader ارزیابی گردید.

آزمایشات گلخانه ای

در این آزمون همبستگی بین شش جدایه باکتریایی که بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم را در شرایط آزمایشگاه نشان دادند بر کنترل بیماری ریشه گرهی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه مایه تلقیح جدایه های باسیلوس از روش صدیقی و شوکت (۳۵) با اندکی تغییر استفاده شد. نشاءهای سه هفته ای گوجه فرنگی رقم Early urbana VF به گلدان های پلاستیکی به قطر ۱۵ سانتی متر منتقل شدند. خاک گلدان مخلوطی از خاک زراعی، خاک برگ، ماسه (۱:۲:۲) انتخاب شد. کشت مایع سه روزه جدایه های باکتریایی با غلظت 10^{7}-10^{8} واحد تشکیل دهنده ی کلنی در میلی لیتر (CFU/ml) تهیه شد. سپس میزان ۱۵ میلی لیتر از هر یک از سوسپانسیون های باکتریایی به خاک اطراف گیاهچه ها اضافه شد. دو روز بعد از تیمار گیاهان با باکتری، تعداد ۲۰۰۰ لارو سن دو *Meloidogyne javanica* به داخل سه حفره تعبیه شده اطراف هر گیاهچه افزوده شد. قابلیت کنترل کنندگی جدایه ها پس از ۴۵ روز از زمان تلقیح نماتدها، بر اساس شاخص های تعداد گال، تعداد توده تخم مشخص گردید. علاوه بر آن ، وزن تر ریشه، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی، طول ریشه و طول ساقه نیز محاسبه شد. در این آزمایشات از تیمار گیاه با نماتد به عنوان شاهد مثبت و از تیمار گیاه سالم به عنوان شاهد منفی و نیز از نماتد کش راگبی به میزان یک گرم گرانول ۱۰ درصد در هر گلدان استفاده شد.

آزمون کلونیزاسیون ریشه

در آزمون کلونیزاسیون ریشه نیز شش جدایه برتر مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمون طبق روش کیم و همکاران (۱۹) با کمی تغییر انجام گرفت. لوله های شیشه ای استریل ۲۰ سانتی متری تا ارتفاع ۵ و ۷ سانتی متری به ترتیب از ماسه درشت و مخلوط خاک و ماسه استریل پر شدند. برای مرطوب نمودن خاک از آب مقطر استریل استفاده شد. بذر گوجه فرنگی رقم Early urbana VF پس از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ،آبکشی با آب مقطر استریل و هوادهی، به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون $2x10^{5}$cfu /ml باکتری رقیق شده در محلول ۰/۱ مولار فسفات منیزیم قرار داده شد. در هر لوله استریل، یک بذر گذاشته و توسط مخلوط خاک و ماسه استریل پوشانده شد. تیوبها در محفظه رشدی در 25^{o} c به مدت ۳ هفته قرار گرفتند. بذور شاهد با محلول ۰/۱ مولار فسفات منیزیم مایه زنی شده و در طول آزمایش، از محلول هوگلند رقیق شده برای تغذیه تیوب ها استفاده شد. در انتهای آزمایش، قطعات ریشه در نه میلی لیتر محلول ۰/۱ مولار فسفات منیزیم به مدت ۳ دقیقه ورتکس و پس از تهیه سری رقت، کشت در محسط آگار غذایی انجام شد. شمارش کلنی ها بعد از ۴۸ ساعت در 30^{o} بر اساس cfu در هر گرم ریشه محاسبه شد. این آزمایش در چهار تکرار انجام گرفت.

نتایج

شناسایی جدایه های باکتریایی

بر اساس آزمون های انجام شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی، ۱۶ جدایه باکتریایی که در آزمون سنجش زیستی در آزمایشگاه انتخاب گردیدند، به عنوان *Bacillus* spp. شناسایی شدند. همه این باکتری ها گرم مثبت، کاتالاز مثبت، دارای اندوسپور بیضوی، دارای سلول های میله ای شکل و فاقد اسپورانژیوم متورم بودند. تست تحرک، ژلاتین، VP و رشد در کلرید سدیم ۵٪ و رشد در محیط دارای pH: ۵/۵ در این جدایه ها مثبت ارزیابی شد. تست هیدرولیز نشاسته، رشد در سدیم کلرید ۷٪، استفاده از سیترات، رشد در دمای $40^{o}C$ در اکثر جدایه ها مثبت بود. با وجود تغیر در برخی آزمون ها چون اکسیداز، تولید اسید از زایلوز و مانیتول، لستیناز، رشد در دمای $50^{o}C$، تمامی جدایه ها به گونه های جنس باسیلوس تعلق داشتند.

تعیین مناسب ترین جدایه ها بر اساس تست سنجش زیستی

از میان ۱۳۹ جدایه، در نهایت ۱۵ جدایه در آزمون سنجش زیستی همراه با جدایه *B. subtilis* برای آزمایش های بعدی

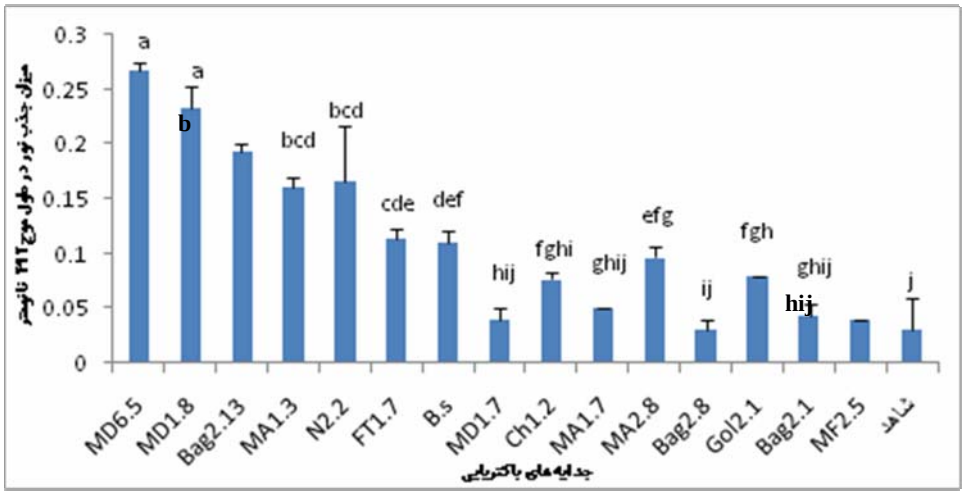
انتخاب شدند. درصد مرگ و میر لارو در این جدایه ها بین ۹۹/۳ - ۶۵ درصد و درصد عدم تفریخ تخم بین ۴۴ تا ۹۸/۳ درصد متغیر بود.

تشکیل بیوفیلم در جدایه های باکتریایی

تجزیه و تحلیل داده های مربوط به تشکیل بیوفیلم در ۱۵جدایه منتخب با استفاده از نرم افزار SPSS (version17) نشان داد که اختلاف معنی داری بین تشکیل بیوفیلم در جدایه های باکتری و شاهد وجود دارد. بر اساس یافته های حاصل و گروه بندی تیمارها، جدایه های باکتریایی MD6.5، MD1.8، Bag2.13، N2.2 بیشترین اختلاف معنی دار را با شاهد نشان دادند و دارای توانایی بالایی از نظر تشکیل بیوفیلم بودند. جدایه های FT1.7 و Bs نیز بعد از چهار جدایه ذکر شده جذب بالایی در طول موج ۴۹۲ نشان دادند که نشان دهنده تشکیل بیوفیلم بیشتر در مقایسه با شاهد می باشد. داده های نهایی میانگین ۳ تکرار برای هر جدایه می باشند (شکل ۱).

آزمایشات گلخانه ای

گیاهان تیمار شده با شش جدایه باکتریایی جنس باسیلوس انتخاب شده در مرحله قبل، نسبت به تیمارهای شاهد سالم و آلوده درجات متفاوتی از آلودگی را نشان دادند. نتایج حاصل از تاثیر شش جدایه باکتریایی در شرایط گلخانه در حضور نماتد ریشه گرهی گوجه فرنگی *M. javanica* نشان داد که تیمار گیاهان با جدایه های باکتریایی MD6.5، MD1.8، Bag2.13، N2.2، FT1.7 و *B. subtilis* موجب کاهش تشکیل گال و توده تخم در گیاهان می‌گردد. نتایج اندازه گیری وزن تر و خشک ریشه و اندام های هوایی و طول ریشه و اندام هوایی نیز نشان دهنده افزایش قابل توجه فاکتورهای رشدی در گیاهان آلوده تیمار شده با جدایه های باکتریایی نسبت به شاهد آلوده بود (جدول ۱ و شکل ۲). نتایج بررسی همبستگی نشان داد که، بین تشکیل بیوفیلم و شاخص تولید گال در گیاهان گوجه فرنگی ارتباط معنی داری در سطح ۰/۰۱ با ضریب همبستگی ۰/۳۳-، وجود دارد. به این معنا که جدایه هایی که چسبندگی بیشتری را در آزمون تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاه داشتند، در گلخانه نیز شدت علائم بیماری ریشه گرهی گوجه فرنگی (تعداد توده تخم و تعداد گال) را تا حد زیادی پایین آوردند و کارایی بالایی در کنترل نماتد *M. javanica* نشان دادند. علاوه بر تاثیر بیوکنترلی جدایه های باکتریایی، کارایی آنها در افزایش فاکتورهای رشدی گیاه مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). جدایه های باکتریایی MD6.5، MD1.8، Bag2.13، که در آزمون سنجش زیستی موفق بودند، به عنوان بهترین جدایه ها به ترتیب با ۱۰۷، ۹۸ و ۷۶ درصد افزایش در وزن خشک ساقه نسبت به شاهد سالم مشخص شدند. استفاده از نماتد کش راگبی به میزان ۱۸ عدد، تعداد توده تخم را نسبت به شاهد آلوده کاهش داد، با این وجود تیمارهای باکتریایی، تفاوت قابل ملاحظه ای در پارامترهای بیوکنترلی و شاخص های رشدی نسبت به شاهد آلوده و سالم و نماتد کش راگبی نشان دادند (P=%۵). جدایه Bs متعلق به کلکسیون، در افزایش رشد طولی ساقه و ریشه به ترتیب به میزان ۴۸ و ۳۲ درصد نسبت به شاهد سالم موثر واقع شد (شکل ۲) و بالاترین میزان افزایش رشد طولی را نسبت به شاهد و جدایه های این تحقیق نشان داد. اما بر اساس جدول یک، افزایش رشد طولی در جدایه Bs، دلیلی بر افزایش وزن بخش های زیر زمینی و هوایی ندارد. همچنین جدایه های باکتریایی که در آزمایشگاه میزان چسبندگی بیشتری در آزمون تشکیل بیوفیلم داشتند، فاکتورهای رشدی گیاه را نیز برطبق جدول یک، تحت تاثیر قرار دادند.



شکل ۱- میزان تشکیل بیوفیلم در جدایه های برتر بر اساس جذب نور در طول موج ۴۹۲ نانومتر. ستون هایی که با حروف مختلف نمایش داده شده اند بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

آزمون کلونیزاسیون ریشه

برای بررسی میزان کلونیزاسیون باکتری ها بر روی ریشه، جمعیت باکتری های مستقر بر روی ریشه گیاهان سالم تیمار شده با جدایه های باکتریایی در آزمایشگاه در آزمون لوله های استریل، برآورد شد. هر شش جدایه منتخب بکار گرفته شده در آزمون گلخانه، نیز از نظر کلونیزاسیون ریشه گیاه گوجه فرنگی بررسی شدند. بر پایه روش سری رقت و با در نظرگرفتن میانگین تعداد کلنی ها در تکرارهای مربوطه و ضریب رقت، جمعیت باکتری های مستقر در ناحیه‌ی فراریشه گوجه فرنگی برای جدایه های MD6.5 و MD1.8 به ترتیب ۲×۱۰^{۶} و ۱×۱۰^{۶} سلول باکتری در میلی لیتر می باشد که نسبت به جمعیت اولیه باکتری تلقیح شده افزایش یافته است. افزایش قابل توجهی در جمعیت سایر جدایه های مورد بررسی در این آزمون دیده نشد.

بحث

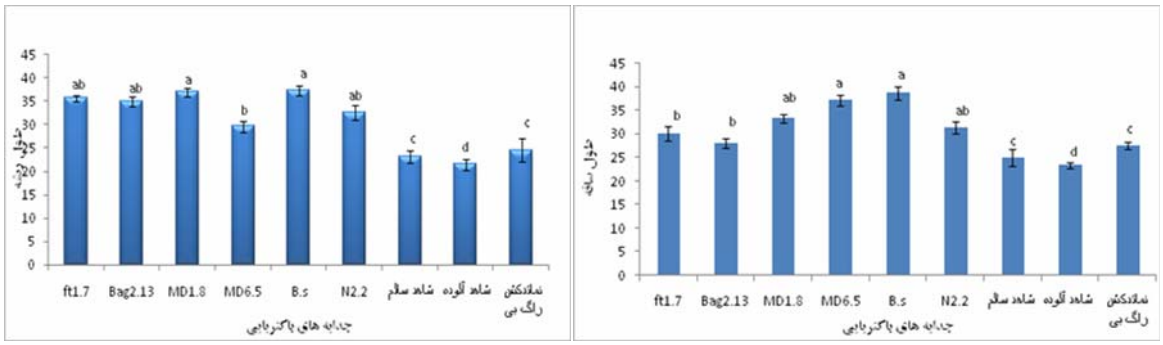
یکی از مشکلات استفاده از میکروارگانیسم های مفید به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک عدم استقرار یا کاهش پایداری آن ها در محیط ریزوسفر می باشد. قابلیت کلونیزه نمودن گیاهان توسط عوامل میکروبی مفید یک پروسه چند پارامتری است که مقاومت به سیستم دفاعی گیاه و توانایی شروع رشد روی سطوح گیاهی و گسترش در گیاه را می طلبد (۸).

کلونیزاسیون ریشه، فاکتوری با اهمیت برای باکتری عامل بیوکنترل می باشد چرا که به عامل آنتاگونیست برای بقای پایدار در خاک کمک نموده (۱۲) و حفاظت موفق گیاهان میزبان را به دنبال دارد (۳۲). ترشحات ریشه در طی رشد گیاه، مقدار زیادی مواد غذایی از جمله انواع قندها، آمینواسیدها و اسیدهای آلی تولید می کنند که می تواند به عنوان انرژی، کربن و یا منبع نیتروژن مورد استفاده میکروارگانیسم های مفید خاک قرار گیرد (۲۵).

جدول ۱- تاثیر جدایه های برتر از نظر تشکیل بیوفیلم در کنترل نماتد *M. javanica* و شاخص های رشدی گیاه گوجه فرنگی رقم Early urbana VF

جدایه باکتریایی	وزن تر ریشه	وزن تر ساقه	وزن خشک ریشه	وزن خشک ساقه	تعداد توده تخم	شاخص گال
MD6.5	۳۵/۸^{a}	۳۵/۵۷^{a}	۵/۶۷^{a}	۵/۵۴^{a}	^{c}۰	۰^{c}
MD1.8	۲۵/۹^{b}	۲۸/۴^{b}	۵/۰۲^{b}	۵/۳۱^{ab}	^{c}۰	^{c}۰
Bag2.13	۲۴/۶^{b}	۲۶/۸۳^{b}	۴/۵^{b}	۴/۷۱^{cd}	^{c}۰	^{b}۲
N2.2	۱۱/۷^{efg}	۲۳/۴^{c}	۱/۹۵^{cd}	۴/۳۱^{d}	^{bc}۱	^{b}۲
FT1.7	۱۰/۷۷^{fg}	۱۹/۹^{d}	۱/۷۶^{d}	۴/۵۹^{cd}	^{bc}۱/۶۷	^{b}۲
B.s	۹/۲^{g}	۱۱/۶^{g}	۱/۷۷^{d}	۲/۲۵^{e}	^{c}۰	^{c}۰
شاهد سالم	۱۱/۴^{efg}	۱۷/۴^{de}	۲/۱^{cd}	۲/۶۷^{e}	^{c}۰	^{c}۰
شاهد آلوده	۳/۸^{h}	۴/۶۷^{h}	۱/۱۷^{e}	۱/۴^{f}	^{a}۲۴/۳۳	۴^{a}
نماتدکش راگبی	۱۴/۵^{de}	۱۵/۳^{ef}	۲/۴۱^{c}	۲/۷۲^{e}	^{b}۲/۳۳	^{b}۲

میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P<۰/۰۵$)



شکل ۲- تاثیر جدایه های باسیلوس در افزایش طول ریشه و ساقه گوجه فرنگی آلوده به *M. javanica* نسبت به شاهد آلوده و سالم

جدایه های باکتریایی باسیلوس به علت دارا بودن اسپور، برای پوشش دهی بذر کاربرد داشته و از لحاظ حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی و ارتقاء رشد گیاه، حائز اهمیت هستند. استرین‌های *B. amyloliquefaciens* و *B. subtilis* برخی مواد افزایش دهنده رشد گیاهی چون جیبرلین، اندول استیک اسید را در محیط فراریشه ترشح می نمایند (۳۲). به نظر می رسد ترکیبات هورمونی مترشحه از باکتری اثر چشمگیری در فعالیت های رشدی گیاه دارد. چرا که ترکیبات رشدی نقش مهمی در متحمل کردن گیاه به بیماری‌های ریشه داشته و باعث می شوند ریشه های آسیب دیده به سرعت توسط ریشه های جدید جایگزین شده و به این ترتیب انشعابات فرعی ریشه افزایش یابد.

در این بررسی، از میان ۱۳۹ جدایه های بدست آمده از منطقه فراریشه گوجه فرنگی، پانزده جدایه بیشترین درصد مرگ و میر لارو و عدم تفریخ تخم نماتد *M.javanica* را در آزمون سنجش زیستی از خود نشان دادند. آنزیم ها، متابولیت ها و مواد سمی تولید شده توسط گونه‌های جنس باسیلوس در کنترل نماتدها موثر شناخته شده اند که مهمترین عامل، آنزیم های خارج سلولی نظیر پروتئازها می باشند (۳۸). تحقیقات زیادی بر روی اثر بازدارندگی گونه های مختلف جنس باسیلوس علیه گونه های بیمارگر *Meloidogyne* بر روی گیاهان مختلف انجام پذیرفته است (۹، ۱۰ و ۳۶). فعالیت باکتری های جنس باسیلوس و میزان کنترل عوامل بیماریزا توسط آنها به کلنیزاسیون موثر ریشه توسط این باکتری ها بستگی دارد، لذا بررسی فاکتور میزان تشکیل بیوفیلم ضروری می باشد (۱۷).

در تحقیق حاضر، اثر جدایه های باسیلوس دارای قدرت بیوکنترلی بالا علیه نماتد ریشه گرهی، از نقطه نظر توانایی تشکیل بیوفیلم و میزان کلونیزاسیون ریشه در شرایط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه های باکتریایی MD6.5، MD1.8 قادر به تولید بیوفیلم در شرایط آزمایشگاه بوده و نسبت به سایر جدایه ها، ریشه‌های گوجه فرنگی را بهتر کلونیزه نموده و متعاقب آن کنترل موثر بیماری را در شرایط گلخانه در برداشتند. اثرات ترکیبی درجه حرارت و مواد غذایی، در میزان تکثیر و تجمع سلولهای باکتریایی موجود در بیوفیلم موثر است و به نظر می رسد، گونه های مختلف باکتری از نظر فیزیولوژی، عملکردی متفاوت در تشکیل بیوفیلم دارند. فعالیت آنتاگونیستی جدایه های تشکیل دهنده بیوفیلم ممکن است به دلیل تغییرات کلی درالگوی بیان ژنی آنها در حالت دسته جمعی در مقایسه با حالت انفرادی باشد (۷).

در بررسی موسیوند و همکاران (۲۶) سه جدایه *B. subtilis* از نظر تشکیل بیوفیلم و کلونیزاسیون ریشه در مقابل بیمارگرهای قارچی موفق عمل نمودند. چن و همکاران (۴) در سال ۲۰۱۲ ، جدایه ای از *B. subtilis* را به عنوان تشکیل دهنده قوی بیوفیلم، بر سطح ریشه‌های گوجه فرنگی معرفی نمودند. بر اساس یافته های این گروه، تشکیل بیوفیلم باعث تسهیل کلونیزاسیون ریشه، افزایش غلظت آنتی بیوتیک در اطراف ریشه و القاء فعالیت بیوکنترل گیاه علیه بیمارگرهای مرتبط می شود. تشکیل بیوفیلم توسط ژنهای تولید کننده ماتریکس خارج سلولی، که نگهدارنده سلولها در کنار هم می باشد، کنترل می شود. مولکولهای ال- مالیک اسید موجود در ترشحات ریشه گوجه فرنگی به طور مستقیم یا غیر مستقیم از طریق هیستیدین کیناز KinD شناسایی شده و تشکیل بیوفیلم را بر روی ریشه های گوجه فرنگی تحریک می نماید (۵). مطالعه کلونیزاسیون ریشه آرابیدوبسیس توسط *B. subtilis* نیزحاکی از تاثیر پلی ساکاریدهای گیاهی به عنوان محرک تولید بیوفیلم توسط باسیلوس می باشد. همچنین این پلی ساکاریدها به عنوان منبع قندی، جهت تولید ماتریکس پلی ساکارید خارج سلولی عمل می کنند (۲).

نتایج آنالیز آماری حاکی از تفاوت معنی دار بین فاکتورهای رشدی گیاهان سالم تیمار شده با جدایه های منتخب و شاهد سالم (شاهد منفی) می باشد. جدایه های MD1.8 و MD6.5 به ترتیب با افزایش وزن خشک ریشه به میزان ۱۷۰ و ۱۰۷ درصد و وزن خشک ساقه به میزان ۱۳۹ و ۹۸ درصد در مقایسه با شاهد سالم، روی فاکتورهای رشدی گیاه نیز بسیار موثر، ارزیابی شدند. دو جدایه MD1.8 وMD6.5 به ترتیب با ۷۵ و ۹۹ درصد مرگ و میر لارو در آزمون سنجش زیستی، تشکیل بالاترین میزان بیوفیلم در شرایط آزمایشگاه، استقرار بر روی ریشه های گوجه فرنگی به میزان ۱×۱۰^{۶} و ۲×۱۰^{۶} سلول باکتری در میلی لیتر، کاهش علائم بیماری در مقایسه با شاهد آلوده به نماتد و توسعه پارامترهای رشدی گیاه گوجه فرنگی در شرایط گلخانه، به عنوان جدایه های باسیلوس توانمند، جهت بررسی های مزرعه ای پیشنهاد می شوند. دو فاکتور مواد ضد میکروبی مترشحه از میکروارگانیسم های مفید و توانایی استقرار و بقای آنها بر روی ریشه های گیاه، تاثیر قابل ملاحظه ای در توان آنتاگونتستی عامل بیوکنترل خواهد داشت (۲۲). با این وجود این احتمال وجود دارد که تشکیل بیوفیلم و کلونیزاسیون موفق به تنهایی برای فعالیت کنترل زیستی کارا، کافی باشد (۴ و ۵). در بررسی حاضر شش جدایه منتخب در آزمون گلخانه، به لحاظ آنتاگونیستی بر روی تخم و لارو نماتد تفاوت قابل ملاحظه ای با هم نداشتند. اما در دو آزمون کلونیزاسیون ریشه و بررسی های رشدی، دو جدایه MD1.8 وMD6.5 تفاوت معنی داری با سایر جدایه نشان دادند. مطابق با یافته‌های قبلی (۴) به نظر می رسد توانایی کلونیزاسیون قوی ریشه گیاه توسط جدایه های باسیلوس بتواند نقش مهمی در حفاظت گیاه علیه بیمارگرهای گیاهی داشته باشد. با این وجود یافتن مکانیسم عوامل درگیر در این امر، نیاز به بررسی های بیشتر دارد.

منابع

1- Bais H.P., Fall R., and Vivanco J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. Plant Physiol. 134: 307–319.
2- Beauregard P.B., Chai Y., Vlamakis H., Losick R., and Kolter R. 2013. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. Proc Natl Acad Sci , 110: 1621-30.
3- Burkett-Cadenaa M., Kokalis-Burelle N., Lawrence K.S., Van Santen E. and Kloepper J.W. 2008. Suppressiveness of root-knot nematodes mediated by rhizobacteria. Biological Control 47 :55–59.
4- ChenY., Yan F., Chai Y., Liu H., Kolter R., Losick R. and Guo J.H. 2012. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation. Environ. Microbiol. 15:848-864.
5- Chen Y., Cao S., Chai Y., Clardy J., Kolter R., Guo J., and Losick R. 2012. A *Bacillus subtilis* sensor kinase involved in triggering biofilm formation on the roots of tomato plant. Mol. Microbiol.85:418–430.
6- Davies D.G., and Marques Claudia N.H. 2009. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in biofilms. J. Bacteriol. 191: 1393- 1403.
7- Davey M.E., and O'Toole G.A., 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biol. Rev. 64: 847-867.
8- Emmert E.A.B. and Handelsman J. 1999. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective. FEMS Microbiol. Lett.171: 1–9.
9- Hashema M. and Abo-Elyousr K.M. 2011. Management of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms, Crop Protection, 30, 285-292.
10- Huang Y., Xu C.K., Ma L., Zhang K.Q., Duan C.Q., and Mo M.H. 2010. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium*YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognit.* European Journal of Plant Pathology, 126:417–422.
11- Haggag W.M., and Timmusk S. 2008. Colonization of peanut roots by biofilm-forming *Paenibacillus polymyxa* ini-tiates biocontrol against crown rot disease.J Appl Microbiol. 104:961–969.
12- Idris H.A., Labuschagne N., and Korsten L., 2007. Screening rhizobacteria for biological control of Fusarium root and crown rot of sorghum in Ethiopia. Biological Control.40: 97-106.
13- Izano E.A., Amarante M.A, Kher W.B., and Kaplan J.B. 2008. Different roles of polyacylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 74: 470- 476.
14- Ji P., Campbell H., Kloepper J., Jones J., Suslow T., and Wilson M., 2006. Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. Biological Control 36: 358–367.
15- Johansson P.M., Johnsson L., and Gerhardson B. 2003. Suppression of wheat-seedling diseases caused by *Fusarium culmorum* and *Microdochium nivale* using bacterial seed treatment. Plant Pathol. 52: 219-227.
16- Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., and Lugtenberg B.J.J. 2005. Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. Environ Microbiol 7:1809–1817.
17- Khezri M., Ahmadzade M., Salehi Jouzani Gh., Behboudi K., Ahangaran A., Mousivand M. and Rahimian H. 2011. Characterization of some biofilm-forming *Bacillus subtilis* strains and evaluation of their biocontrol potential against *Fusarium culmorum.* J. plant Pathol. 93:373-382.
18- Khezri S., Ahmadzade M., Salehi Jouzani Gh., Behboudi K., and Rahimian H. 2010. An investigation on the effect of environmental factors on *Bacillus subtilis* biofilm formation in vitro. 19th Iranian Plant Protec. Cong. p. 496.
19- Kim D.S., Weller D.M. and Cook R.J. 1997. Population Dynamics of *Bacillus* sp. L324-92R12 and *Pseudomonas fluorescens*2-79RN10 in the Rhizosphere of Wheat. Phytopathology 87:559-564.
20- Kloepper J.W., Ryu C.M., and Zhang S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by Bacillus spp. Phytopathology, 94: 1259–1266.
21- Lian L.H., Tian B.Y., Xiong R., Zhu M.Z., Xu J. and Zhang K.Q. 2007. Proteases from Bacillus: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations. Lett. Appl. Microbiol. 45: 262–269.
22- Leon M., Yaryura P.M., Montecchia M.S., Hernandez A.I., Correa O.S., Pucheu N.L., Kerber N.L. and Garcia A. F. 2009. Antifungal Activity of Selected Indigenous *Pseudomonas* and *Bacillus* from the Soybean Rhizosphere. Int. J. Microbiol. doi:10.1155/2009/572049.
23- Lucy M., Reed E. and Glick B.R. 2004. Applications of free living plant growth promoting rhizobacteria.Antonie van Leeuwenhoek, 86:1–25.
24- Majzoob S., Kargar A., Taghavi M. and Hamzehzarghani H. 2012. Evaluation of rhizobacteria for antagonistic

activity against root knot nematode, *Meloidogyne javanica* on cucumber, on greenhouse condition. Iran. J. Plant Path., 48: 27-29.

25- Molina M.A., Ramos J.L., Espinosa-Urgel M. 2003. Plant-associated biofilms. Rev Environ Sci Biotechnol 2:99–108.

26- Mousivand M., Jouzani G.S., Monazah M. and Kowsari M. 2012. Characterization and antagonistic potential of some native biofilm-forming and surfactant-producing *Bacillus subtilis* strains against six pathotypes of *Rhizoctonia solani*. J. Plant Pathol. 94: 171-180.

27- Nagorska K., Bikowski M., and Obuchowskji M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochim Po. l54:495–508.

28- Nagorska K., Hinc K., Strauch M.A., and Obuchowski M. 2008. Influence of the sigma B stress factor and *yxa*B, the gene for a putative exopolysaccharide synthase under sigma B control, on biofilm formation. J. Bacteriology. 190: 3546-3556.

29- Nihorimbere V., Cawoy H., Seyer A., Brunelle A., Thonart P., and Ongena M. 2012. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus amyloliquefaciens* S499.FEMS Microbiol Ecol.79:176–191.

30- Niu Q., Huang X., Zhang L., Lian L., Li Y., Li J., Yang J., and Zhang K. 2007. Functional identification of the gene bace16 from nematophagous bacterium *Bacillus nematocida*. Appl. Microbiol. Biotech.75:141–148.

31- Parsek M.R., and Greenberg E.P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between Quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol. 13: 27-33.

32- Reva O.N., Dixelius C., Meijer J., and Priest F.J. 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria elated to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*, FEMS Microbiol. Ecol., 48: 249–259.

33- Rice S.A., Koh K.S., Queck S.Y., Labbate M., Lam K.W., and Kjelleberg S. 2005. Biofilm formation and sloughing in *serratia marcescens* are controlled by Quorum sensing and nutrient cues. J. Bactriol. 187: 3477-3485.

34- Schaad N.W. (ed). 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 3rd ed., The American Phytopathology Society Press, St. Paul, MN, USA.

35- Siddiqui A., and Shaukat S. 2004. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. Phytopathology, 152: 48-54.

36- Siddiqui Z.A., Qureshi A. and Akhtar M.S. 2009. Biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates on *Pisum sativum*, Arch. Phytopathol. Plant Protec., 42: 1154 -1164.

37- Terefe M., Tefera T. and Sakhuja P.K. 2009. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery, J.Invertebrate Pathol., 100:94–99.

38- Tian B., Li N., Lian L., Liu J., Yang J. and Zhang K. Q. 2006. Cloning, expression and deletion of the cuticle-degrading protease BLG4 from nematophagous bacterium *Brevibacillus laterosporus* G4. Arch. Microbiol., 186:297–305.

39- Yaryura P.M., Leon M., Correa O.S., Kerber N.L., Pucheu N.L. and Garcia A.F. 2008. Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. Curr. Microbiol., 56:625–632.