نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ص. ۱۴۴-۱۳۶

Journal of Plant Protection
Vol. 25, No. 2, Summer 2011, P. 136-144

تشکیل بایو فیلم توسط سودوموناس‌های فلورسنت و نقش آن درکنترل بیولوژیک بیماری پاخوره گندم در اثر قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

سمیه الوانی [۱*]- حمید روحانی [۲] - ماهرخ فلاحتی رستگار [۳] - مسعود احمدزاده [۴]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۸
تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۲

چکیده

نقش سودوموناس‌های فلورسنت در کنترل بیولوژیک بیماری پاخوره گندم با عامل قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) ، در سال‌های اخیر توسط بسیاری از محققین مورد توجه قرار گرفته است. تشکیل بایو فیلم توسط سودوموناس‌های فلورسنت درکنترل بیماری‌های گیاهی از اهمیت فراوانی برخوردار است. برای مطالعه این پدیده، ۱۳۰ جدایه سودوموناس فلورسنت از ریزوسفر گندم در نواحی مختلف استان خراسان جداسازی شد و از این میان ۲۱ جدایه بر اساس توانایی بازدارندگی از رشد قارچ Ggt در روش کشت متقابل انتخاب شدند. جدایه‌های انتخاب شده از نظرتشکیل بایو فیلم مورد ارزیابی قرار گرفتند و چسبندگی جدایه‌ها به پلیتهای شیشه ای در طول موج ۴۹۲ نانومتر بررسی شد. نتایج نشان داد که شش جدایه F1، F3، F4، F141، P4 و 2-79 دارای توانایی تولید بایو فیلم بودند. نتایج آزمایشهای گلخانه ای نیز نشان داد که این جدایه‌ها نسبت به سایرین دارای توانایی بیشتری در بیوکنترل بیماری پاخوره گندم بودند. جدایه‌های F1، F3، F4، F141، P4 و 2-79 شدت بیماری را به ترتیب به میزان۷۹، ۸۰، ۷۷، ۷۹، ۷۷ و۸۰درصد کاهش دادند؛ در حالی که در سایر تیمارها که تشکیل بایو فیلم مشاهده نشده بود میزان کاهش بیماری بسیار اندک بود، بطوریکه در جدایه F140 تنها ۱۰٪ کاهش در میزان بیماری ناشی از قارچ Ggt در بوته های گندم به ثبت رسید. از سوی دیگر بررسی های انجام شده روی میزان همبستگی بین قابلیت بیوکنترل جدایه‌های برتر و تشکیل بایو فیلم در آنها نشان داد که همبستگی معنی دار بالائی (۰/۸۴) بین این دو خصوصیت وجود دارد. نتایج این تحقیق بیانگر نقش مهم تولید بایو فیلم توسط سودوموناسهای فلورسنت و ارتباط آن با قابلیت بیوکنترلی آنها در میباشد. این پدیده را شاید بتوان به کلنیزاسیون بهتر و با دوام تر جدایه های تشکیل دهنده بایو فیلم در سطح ریشه و در منطقه ریزوسفر نسبت داد.

واژه‌های کلیدی: بایو فیلم، بیوکنترل، پاخوره گندم، سودوموناس فلورسنت، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

مقدمه

بایو فیلم[۵] توده ای از میکروارگانیسم‌ها می باشد که در آن توده، سلول‌ها به سختی به یکدیگر و سطحی که بر روی آن قرار گرفته‌اند چسبیده اند. این سلول‌های چسبیده و محکم، به وسیله ماتریکس تولید شده حاصل از مواد پلیمری خارج سلولی [۶] سخت در هم قرار گرفته اند. بایو فیلم ممکن است در سطوح زنده و یا غیر زنده تشکیل گردد (۱۱، ۳۲ و۳۳). با تشکیل بایو فیلم سلول‌ها از نظر فنوتیپیکی تغییر پیدا می کنند که در این عمل ژن‌های بسیاری دخیل هستند (۱ ، ۱۰ و۱۳). تشکیل بایو فیلم با چسبندگی میکروارگانیسم به سطح مربوطه شروع می شود. اولین کلنی‌ها اتصال ضعیفی را با سطح برقرار می کنند. به نحوی که تحت یک نیرو به سطح چسبیده و چنانچه کلنی از سطح جدا نگردد، با استفاده از ساختارهای چسبنده مانند پیلوسها عمل تثبیت بر روی سطح را انجام می دهند. تشکیل بایو فیلم طی پنج مرحله شامل: اتصال برگشت پذیر، اتصال برگشت ناپذیر، تشکیل ساختارهای قارچ مانند دارای کانال، تثبیت و پراکنش صورت می پذیرد. پراکنش سلول‌ها از کلنی بایو فیلم مرحله ضروری سیکل تشکیل بایو فیلم است. این عمل سبب کلونیزه شدن سطوح بیشتری توسط بایو فیلم می گردد. آنزیم هایی مثل dispersin B و deoxyribonuclease سبب تحلیل ماتریکس خارج سلولی شده و مهم ترین نقش را در پراکندگی بایو فیلم ایفا می کنند (۱۸ و۲۲). بر این اساس می توان نتیجه گرفت آنزیم‌های منهدم کننده ماتریکس بایو فیلم به عنوان عوامل ضدبایو فیلم مفید می باشند (۲۳ و۳۹). در تحقیقات اخیر یک پیام آور اسید چرب به نام cis-2-decenoic acid کشف گردیده است که مسئولیت پراکنش و جلوگیری از رشد بایو فیلم را انجام می دهد (۶). بایو فیلم اغلب بر روی سطوح جامد

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: somaye5778@gmail.com)
۴- دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه تهران

5-Biofilm
6- Extracellular Polymeric Substance (EPS)

یافت می گردد. ولی بر روی سایر سطوح و همچنین روی اندام‌های گیاهی نیز یافت می گردد. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها مثل باکتری ها، پروتوزوآ، قارچ ها، جلبک‌ها قادر به تشکیل بایو فیلم می باشند. در تشکیل بایو فیلم موادی تولید می گردد که باکتری‌های منفرد توانایی تولید آن را ندارند (۶ ، ۱۸ و۳۴). نتایج مختلف نشان داده است که مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها در بایو فیلم به ۱۰۰۰ برابر افزایش پیدا می کند. به این ترتیب نقش مهم آن در کلنیزه کردن، مشخص می گردد (۳۶). در میان باکتری ها، به باکتری‌های گرم منفی در این رابطه توجه بسیاری شده است (۲۷ و۳۱). باکتری *Pseudomonas aeruginosa* به عنوان مدل برای بررسی‌های تشکیل بایو فیلم مورد استفاده قرار می گیرد (۱۴ و۱۵). بررسی‌ها نشان داده است در تشکیل بایو فیلم در این باکتری تاژک، پیلوسهای نوع چهارم و اگزوپلی ساکاریدها نقش مهمی دارند (۲۰ و۳۷). تحقیقات انجام شده وجود چندین مکانیسم را که منشا ژنتیکی دارند در تشکیل بایو فیلم نشان می دهد.که از آن جمله می توان به پدیده احساس حد نصاب (QS[1]) و یک پیام آور جدید ثانویه تحت نام سیکلیک دی جی ام پی[2] را نام برد. طی بررسی‌های انجام شده، نحوه تشکیل بایو فیلم در *P.aeruginosa* بسته به نوع منبع کربنی دارد که در دسترس باکتری می باشد (۵ ، ۱۴ ، ۱۵ ، ۱۶ ، ۲۴ و۳۵).

سیستم کروم سنسینگ در مراحل مختلف تشکیل بایو فیلم تاثیر می گذارد (۲ ، ۲۱ و۴۰). یکی از محاسن تشکیل بایو فیلم، حضور باکتری در سطوح گیاهی می باشد. در نتیجه متابولیت‌های تولید شده توسط باکتری از جمله آنتی بیوتیک‌ها که در تجمع بالای باکتری در مرحله تشکیل بایو فیلم تولید می شوند، در کنترل بیمارگرهای گیاهی تاثیر زیادی دارند. بررسی‌های انجام شده بر روی *P.putida* نشان داده که این باکتری سطوح ریشه را به خوبی کلنیزه کرده و سبب ایجاد سدی حفاظتی در برابر عوامل خسارت زا می گردد(۷ و۳۰). به طور کلی اغلب میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها قادر به تشکیل بایو فیلم در سطح اندام‌های گیاهی می باشند. این ارتباط تاثیر تبیین کننده ای در کنترل بیماری‌های مختلف دارد (۱۲ و۲۹).کاربرد سودوموناس‌ها همراه بذور سبب محافظت آنها در برابر عوامل بیماری زای خاکزی شده و افزایش محصول را به دنبال دارد (۳ ، ۸ ، ۱۷ ، ۱۹ و۲۶). مبحث بایو فیلم و کنترل بیمارگرها، از مباحث جدیدی است که در سال‌های اخیر به آن توجه شده است. باکتری *P.chlororaphis* ، از باکتری هایی می باشد که سبب کنترل بیماری پاخوره در گندم می گردد، در پژوهشی تاثیر تشکیل بایو فیلم در این باکتری و کنترل بیماری پاخوره صورت گرفت. نتایج نشان دهنده کنترل موثر قارچ Ggt در جدایه هایی که بیشترین چسبندگی را در پلیت نشان دادند می باشد (۲۹). با توجه به این مطالب در این تحقیق سعی بر آن شد که تشکیل بایو فیلم در سودوموناس‌های فلورسنت مورد بررسی قرار گیرد و به ارتباط بین تشکیل بایو فیلم وکاهش بیماری پاخوره گندم پرداخته شود.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت

تعداد ۶۰ نمونه خاک (شامل ریشه‌های گندم همراه با خاک ریزوسفری اطراف آن) از مناطق مختلف استان‌های خراسان جمع‌آوری گردید. سپس یک گرم از خاک ریزوسفری از نمونه‌ها جدا و آنگاه با استفاده از آب پپتون (پپتون ۲ گرم؛ آب ۱۰۰ mL) سریهای رقت تهیه شد. رقت‌های مختلف روی محیط کشت کینگ ب آگار (KB[3]) پخش شدند و تشتکهای پتری در انکوباتور در دمای ۲۸°C قرار گرفتند. پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت، باکتریها خالص سازی شده و پرگنه‌های واجد نور فلورسنت توسط نور ماوراء بنفش (طول موج ۳۶۵ نانومتر) شناسایی شدند.

شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

برای تشخیص جدایه‌های سودوموناس فلورسنت، جدایه‌ها از نظر واکنش‌های کاتالاز ، اکسیداز، رشد بی هوازی، گرم، تولید آرژینین دهیدرولاز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان از سوکروز روی محیط آگار مغذی حاوی سوکروز پنج درصد، احیای نیترات، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ ب، رشد در ۴ و ۴۱ درجه سانتی گراد و آزمون‌های استفاده از منابع قندی مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (۲۵ و ۳۵).

بررسی اثر بازدارندگی سودوموناس‌های فلورسنت نسبت به قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

بدین منظور از محیط‌های کشت PDA و KB استفاده شد. پس از رشد ۲۴ ساعته جدایه‌های باکتری بر روی محیط کشت کینگ ب آگار در دمای ۲۸ °C این جدایه‌ها در فاصله ۰/۵ سانتی متری لبه تشتک پتری به صورت نقطه ای کشت داده شدند و قطعه ای از قارچ Ggt که تحت نام جدایه T1 از نواحی آلوده به بیماری پاخوره در استان مرکزی جداسازی شده بود در وسط پتری قرار داده شد. پس از قرار دادن پتری‌ها به مدت چهار روز در ۲۵ °C ، قطر هاله بازدارندگی در مورد جدایه‌های مختلف اندازه گیری و مورد مقایسه با شاهد قرار گرفتند. این بررسی در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار برای

1 - Quorum sensing
2 - Cyclic-di-GMP

3 - King,s medium B

هر جدایه باکتری در نظر گرفته شد.

توانایی تشکیل بایو فیلم توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

در ابتدا جدایه‌های باکتریایی در محیط تریپتیکاز سوی براث (TSB[1]) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸-۲۴ ساعت رشد داده شدند؛ سپس یک میلی لیتر از این محیط کشت به ۱۰ میلی لیتر محیط TSB استریل اضافه شد و کدورت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر(Apel ژاپن) در طول موج ۶۲۵ نانومتر معادل ۰/۰۸ تا ۰/۱ تنظیم گردید. ۲۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به هر چاهک در تشتکهای پلاستیکی حاوی ۹۶ چاهک انتقال داده شد. به چاهک‌های شاهد به همان میزان محیط کشت استریل بدون باکتری افزوده شد. بعد از قرار دادن تشتکها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ^{o}C ۳۰ ، محیط حاوی باکتری رشد یافته از چاهک‌ها خارج و هر چاهک سه مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. باکتری‌های متصل به دیواره و کف چاهک، با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و پلیت‌ها تا خشک شدن کامل در شرایط آزمایشگاه قرار داده شدند. سپس پلیت‌ها به مدت پنج دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله (کریستال ویوله ۲ گرم در ۲۰ میلی لیتر اتیل الکل و ۸ گرم اگزالات آمونیوم در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر) رنگ آمیزی شدند. حال بر اساس میزان چسبندگی باکتری‌ها به چاهک‌های پلیت میزان تشکیل بایو فیلم در آنها سنجیده شد. بدین منظور تشکیل بایو فیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت. سپس کدورت در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader خوانده شد (۲۸).

آزمایش‌های گلخانه ای

در آزمایش‌های گلخانه ای تاثیر ۲۱ جدایه باکتری بر کنترل بیولوژیکی بیماری پاخوره گندم مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه ماده تلقیح قارچ از محیط کشت ارزن و ماسه به نسبت۱:۱ استفاده شد. سپس ارلن‌های حاوی ماسه و ارزن طی دو نوبت به فاصله ۲۴ ساعت از هم در دمای ^{o}C ۱۲۱ به مدت ۳۰ دقیقه استریل گردیدند. قارچ Ggt رشد یافته بر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار ضعیف شده به مدت ۴ روز کشت داده شد و ۱۰ قطعه ۸ میلی متری از این قارچ درون هر ارلن قرار داده شد. ارلن‌ها در دمای اتاق (^{o}C ۲۵-۲۲) نگهداری شد، بعد از دو هفته برای رشد بهتر، ارلن‌ها را تکان داده و دو هفته دیگر نیز نگهداری شد. سپس ماده تلقیح را از ارلن خارج و در شرایط استریل کاملا خشک داخل پاکت‌های کاغذی استریل در دمای ^{o}C ۴ تا زمان استفاده نگهداری شدند.به منظور تهیه مایه تلقیح جدایه‌های باکتری، جدایه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت Nutrient broth yeast extract agar در دمای ^{o}C ۲۷ رشد داده شدند؛ سپس با پنج میلی لیتر آب مقطر استریل از این باکتری‌ها سوسپانسیون تهیه و دو میلی لیتر از آن در محیط کشت KB کشت داده شد. از محیط جدید سوسپانسیون دیگری تهیه شد که حاوی ۰/۵ درصد کربوکسی متیل سلولز بود. در نهایت سوسپانسیونی به غلظت 10^{7}-10^{8} واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر[2] (CFU/ml) تهیه شد. این سوسپانسیون بر اساس میزان جذب در طول موج ۵۴۶ نانومترکه تقریبا برابر ۰/۱ می باشد تعیین می گردد. بذور ضدعفونی شده گندم رقم فلات به مدت ۴۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار گرفت. سپس ماده تلقیح قارچ به نسبت ۵ ٪ با خاک اتوکلاو شده (خاک طبیعی همراه ماسه به نسبت دو به یک) گلدان‌ها مخلوط گردید. بذور گندم به تعداد هفت عدد در هر گلدان بین دولایه ماسه قرار داده شدند. تیمار شاهد سالم بدون قارچ و شاهد آلوده با قارچ در نظر گرفته شدند. گلدان‌ها در شرایط گلخانه به مدت چهار هفته در دمای ^{o}C ۲۸-۲۰ قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۲۳ تیمار و سه تکرار اجرا شد و داده‌های حاصل با نرم افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. در نهایت میانگینها با استفاده از تست دانکن در سطح ۵ درصد از یکدیگر جدا شدند. شدت بیماری پاخوره درگیاهچه‌ها بر حسب میزان آلودگی بر اساس درجه بندی شد. بر این اساس درجه صفر نشان دهنده ریشه‌ها و طوقه‌ها بدون لکه‌های نکروزه، درجه یک ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه‌ها فاقد هرگونه علائم، درجه دو ریشه‌ها دارای لکه‌های ممتد نکروزه (نکروز بیشتر از ۲۵٪ و کمتر از ۵۰٪)، درجه سه نکروز بیشتر از ۵۰٪ ریشه‌ها و کمتر از ۷۵٪ و ظهور سیاه شدگی طوقه، درجه چهار ریشه‌ها تقریبا سیاه رنگ با توسعه ۷۵٪ سیاه شدگی طوقه و درجه پنج ریشه‌ها و طوقه کاملا سیاه رنگ و سبز خشک شدن گیاه می باشد. سپس گیاهان به دقت بر اساس وزن ریشه و اندام‌های هوایی و وزن کل نیز توزین گردیدند.

نتایج

شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت

بر اساس آزمون‌های انجام شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی، ۱۳۰ جدایه باکتری به عنوان سودوموناس فلورسنت شناسایی شدند. همه باکتری‌های سودوموناس فلورسنت گرم منفی و اکسیداز مثبت می باشند. تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ ب می کنند. آزمون آرژنین دهیدرولاز آنها مثبت می باشد و بر روی

1 - Trypticase Soy Broth

2 - Colony forming unit

برگ‌های توتون در آزمون فوق حساسیت در گونه‌های مفید که به عنوان عوامل بیوکنترل مطرح می باشند، علائمی را ایجاد نمی کنند. سودوموناس‌ها عموما قادر به احیای نیترات نیستند ولی جدایه‌های *P. fluorescens* می توانند از نیترات به عنوان گیرنده نهایی الکترون در مسیر تنفسی استفاده نموده و آنرا احیا کنند. هیچ یک از گونه‌ها در دمای ۴۱ درجه سانتی گراد رشد نکرد ولی همگی در دمای ۴ درجه سانتی گراد رشد کردند. بر اساس آزمون‌های شناسایی برای تشخیص گونه، جدایه‌های باکتری در گونه‌های *P.fluorescens* و *P. chlororaphis* قرار گرفتند.

تعیین مناسب ترین جدایه‌ها بر اساس میزان هاله بازدارندگی

در نهایت۱۹ جدایه همراه با جدایه *Pseudomonas fluorescens* 2-79 (به عنوان جدایه برتر در کنترل بیماری پاخوره) و جدایه *Pseudomonas fluorescens* P4 که از کلکسیون دانشگاه تهران تهیه شده بود بر اساس تست هاله بازدارنگی در محیط کشت برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند . قطر هاله بازدارندگی در آن‌ها بین ۱۴/۶۶-۳ میلی متر متغیر بود(نمودار۱).

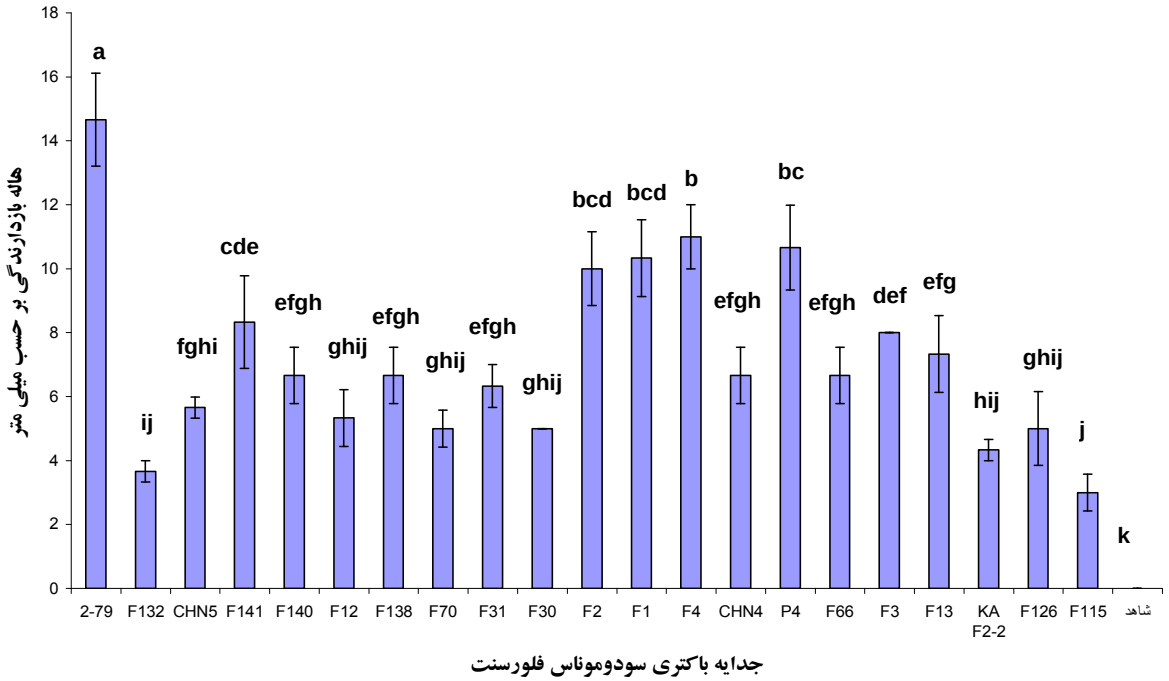
اعداد متن جدول میانگین سه عدد حاصل از هاله بازدارندگی در سه تکرار می باشد. ستونهایی که با حروف مختلف نمایش داده شده اند براساس بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

تشکیل بایو فیلم در جدایه‌های باکتریایی

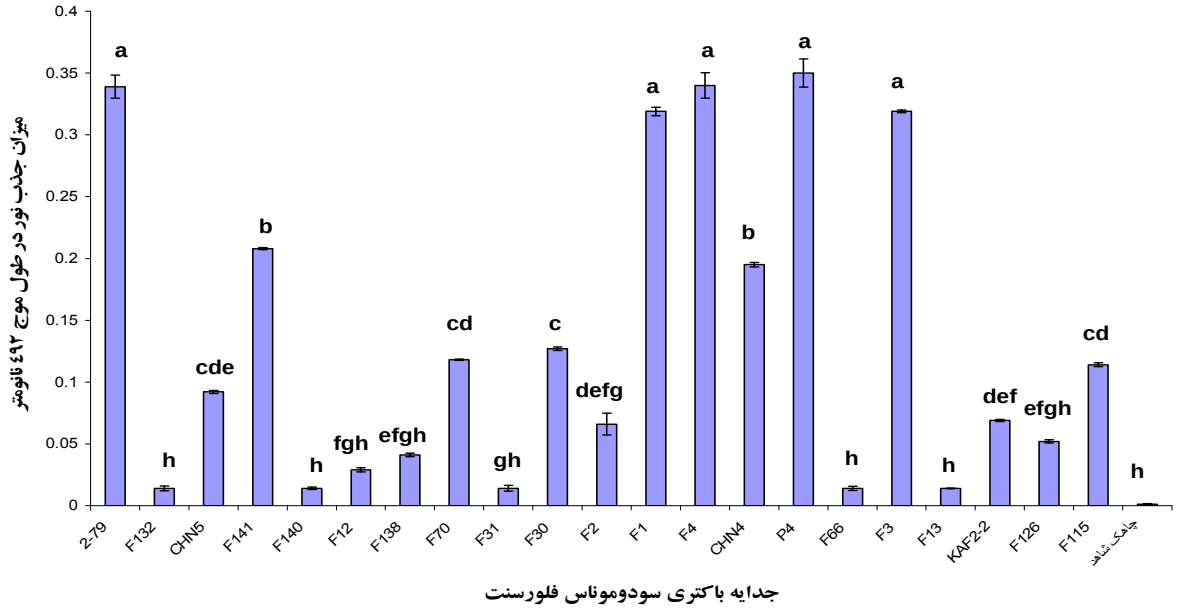
تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به تشکیل بایو فیلم در ۲۱ جدایه انتخاب شده با استفاده از نرم افزار MSTATC نشان داد که اختلاف معنی داری بین تشکیل بایو فیلم در جدایه‌های باکتری و شاهد وجود دارد.

بر اساس یافته‌های حاصل و گروه بندی تیمارها، جدایه‌های باکتریایی F1،F3، P4، F4،F141 و 2-79 بیشترین اختلاف معنی‌دار را با شاهد نشان دادند و دارای توانایی بالایی از نظر تشکیل بایو فیلم بودند. جدایه‌های F115،F30، CHN5،CHN4،F70 نیز بعد از ۶ جدایه ذکر شده جذب بالایی در طول موج۴۹۲ نشان دادند که نشان دهنده تشکیل بایو فیلم بیشتر می باشد (نمودار۲).

داده‌ها میانگین سه تکرار برای هر جدایه می باشند. ستونهایی که با حروف مختلف نمایش داده شده اند براساس بر اساس آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.



نمودار۱- مقایسه هاله باز دارندگی ایجاد شده بین کلنی جدایه های سودوموناس انتخاب شده و کلنی قارچ .Ggt



نمودار۲- قابلیت تولید بایو فیلم توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر اساس میزان جذب نور در طول موج ۴۹۲ نانومتر

نتایج آزمایش‌های گلخانه ای

گیاهان حاصل از بذور تیمار شده با باکتری‌های سودوموناس فلورسنت نسبت به تیمارهای شاهد سالم و آلوده درجات متفاوتی از آلودگی را نشان دادند (شکل ۱). نتایج حاصل از تاثیر۲۱ جدایه باکتریایی (۱۹ جدایه باکتری جداسازی شده از استان‌های خراسان+ 2-79 *Pseudomonas fluorescens* و جدایه P4) در شرایط گلخانه در حضور قارچ Ggt نشان داد که تیمار بذور با جدایه‌های F1 ، F3 ، F4 ، F141، P4 و 2-79 موجب کاهش شدت بیماری پاخوره گندم در گیاهان حاصل گردید. نتایج اندازه گیری وزن تر ریشه ، اندام‌های هوایی و وزن کل گیاه نیز نشان دهنده افزایش قابل توجه وزن در گیاهان حاصل از بذور تیمار شده با جدایه‌های باکتری به خصوص جدایه‌های برتر می باشد (جدول۱).

شکل۱- ریشه گیاه آلوده به قارچ Ggt و ریشه گیاه سالم (شکل سمت چپ) . شاهد سالم، تیمار بذور با جدایه F4 در حضور قارچ Ggt و شاهد آلوده (سمت راست)

جدول۱- تاثیر جدایه‌های سودوموناس فلورسنت بر شدت بیماری پاخوره گندم با عامل *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* و وزن تر ریشه، قسمت‌های هوایی و کل گیاهچه‌های گندم پس از چهار هفته رشد در شرایط گلخانه

جدایه باکتری	میانگین وزن تر (گرم/بوته)*			شدت بیماری پاخوره گندم**
	وزن تر ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن تر کل گیاهچه	
2-79	۰/۳۹۱b	۰/۳۹۱b	۰/۶۷ab	۱j
F132	۰/۲۳def	۰/۰۷h	۰/۳۰ghi	۴/۵bcd
CHN5	۰/۲۶cde	۰/۱۳efg	۰/۳۸ef	۱/۸۳g
F141	۰/۲۸cd	۰/۱۹cd	۰/۴۷cd	۱/۰۸ij
F140	۰/۲۶cde	۰/۱۴efg	۰/۳۹ef	۴/۸۳ab
F12	۰/۱۴gh	۰/۱۴def	۰/۲۸hij	۴/۵ abc
F138	۰/۱۵g	۰/۱۶de	۰/۳۰ghi	۳/۸۳ f
F70	۰/۲۳def	۰/۰۶h	۰/۲۹hij	۱/۵ ghi
F31	۰/۲۱f	۰/۱۷cde	۰/۳۸efg	۳/۹۱ ef
F30	۰/۲۵cdef	۰/۱۳efg	۰/۳۸ef	۱/۳۳ hij
F2	۰/۱۲gh	۰/۱fgh	۰/۲۲j	۴/۴۱ bcd
F1	۰/۲۶cde	۰/۱۷cde	۰/۴۳de	۱/۰۸ ij
F4	۰/۳۷b	۰/۲۵ab	۰/۶۲b	۱/۱۶ ij
CHN4	۰/۲۳def	۰/۱۴def	۰/۳۷efg	۱/۷۵ gh
P4	۰/۳۵b	۰/۱۸cde	۰/۵۲c	۱/۱۶ ij
F66	۰/۰۹hi	۰/۱۴efg	۰/۲۳ij	۴ def
F3	۰/۲۵cdef	۰/۱۶de	۰/۴۱de	۱ j
F13	۰/۲۳def	۰/۰۹gh	۰/۳۲fgh	۴/۱۶cdef
KAF2-2	۰/۲۴def	۰/۱۵de	۰/۳۹ef	۴/۳۳ cde
F126	۰/۲۹c	۰/۰۷h	۰/۳۶efg	۴/۴۱ bcd
F115	۰/۲۲ef	۰/۱۶de	۰/۳۸ef	۱/۹۱g
شاهد آلوده	۰/۰۶i	۰/۰۷h	۰/۱۴k	۴/۹۱ a
شاهد سالم	۰/۵۱a	۰/۲۱bc	۰/۷۲a	۰ k

* گروه بندی بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ . ستون های دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی در سطح ۵٪ میباشند

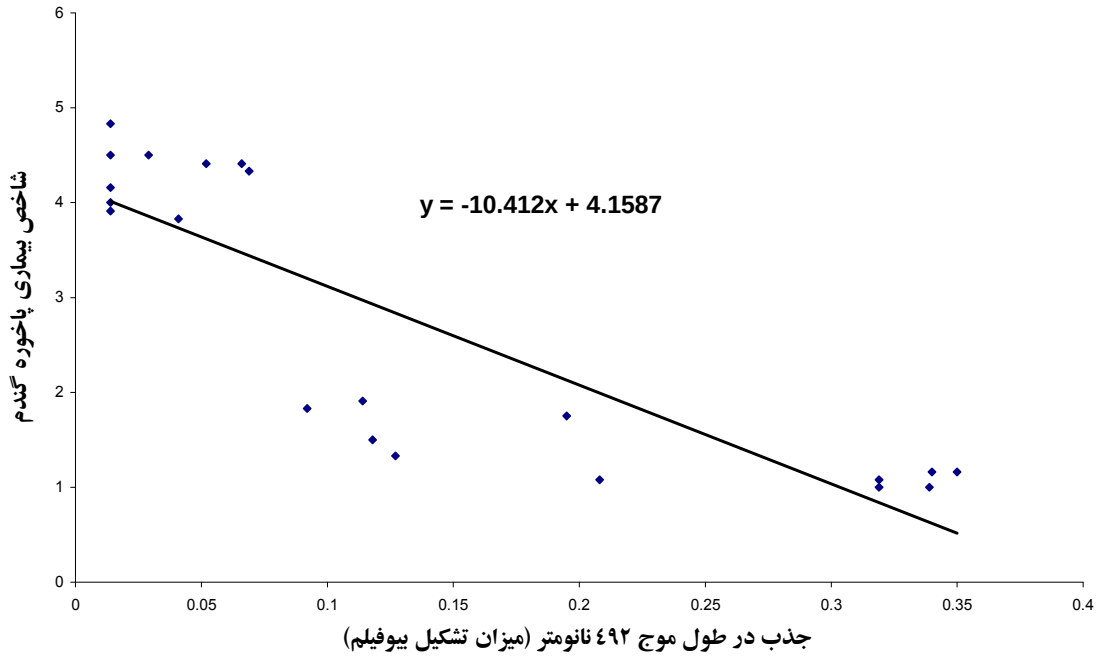
**۰= ریشه‌ها و طوقه‌ها بدون لکه‌های نکروزه، ۱= ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه‌ها فاقد هرگونه علائم، ۲= ریشه‌ها دارای لکه‌های ممتد نکروزه ۳= نکروز بیشتر از ۵۰٪ ریشه‌ها و کمتر از ۷۵٪ و ظهور سیاه شدگی طوقه، ۴= ریشه‌ها تقریبا سیاه رنگ با توسعه ۷۵٪ سیاه شدگی طوقه و ۵= ریشه‌ها و طوقه کاملا سیاه رنگ و سبز خشک شدن گیاه

نتایج بررسی همبستگی نشان داد که بین تشکیل بایو فیلم و شاخص بیماری پاخوره در گیاهچه‌های گندم ارتباط معناداری در سطح ۰/۰۰۱ با ضریب همبستگی ۰/۸۴ وجود دارد؛ به این معنا که جدایه‌هایی که چسبندگی بیشتری را در آزمون تشکیل بایو فیلم داشتند، در گلخانه نیز شدت علائم بیماری پاخوره گندم را تا حد قابل توجهی پایین آوردند و نسبت به سایر جدایه‌های باکتری عملکرد بالاتری را در کنترل قارچ Ggt نشان دادند (نمودار۳).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داده است که جدایه هایی که بایو فیلم قوی تری را تشکیل داده اند توانایی بسیار بالایی را در کاهش بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه ای نشان دادند.نتایج تست هاله بازدارندگی نشان دهنده بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ Ggt توسط جدایه‌های برتر بوده است. این جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی نیز بیشترین میزان بازدارندگی از رشد میسلیوم‌های قارچ Ggt را نشان دادند.

استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت برای کنترل بیماری پاخوره گندم توسط بسیاری از محققین مورد توجه قرار گرفته است. فعالیت باکتری‌های سودوموناس فلورسنت و میزان کنترل عوامل بیماریزا توسط آن‌ها به کلنیزاسیون موثر ریشه توسط این باکتریها بستگی دارد (۷). باکتری های آنتاگونیست روی ریشه اساسا به صورت میکروکلونی هستند. تحقیقات جدید نشان می دهد در اغلب موارد تشکیل بایو فیلم می دهند و به این ترتیب باکتری‌ها به صورت بهترین حالت سطوح ریشه را کلنیزه می کنند.



نمودار۳- همبستگی بین تشکیل بایو فیلم (جذب در طول موج٤٩٢ نانومتر) توسط جدایه‌های سودوموناس فلورسنت و شاخص بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه

در اینجا می توان به نقش سایر عوامل بیوکنترل مثل تولید متابولیت‌ها، مواد فرار و آنتی بیوتیک‌ها اشاره نمود. این متابولیت‌ها در همان حالت زندگی اجتماعی و تشکیل بایو فیلم در باکتری‌ها تولید می گردند. لذا این مبحث از مباحث مهم کنترل بیولوژیک محسوب می گردد.کوک و رویرا (۴)، به نقش باکتری‌های سودوموناس فلورسنت در سطح ریشه گندم پی بردند و نشان دادند که این باکتری‌ها با کلونیزه کردن موثر ریشه گندم توانایی بالایی را در کاهش شدت خسارت بیماری پاخوره گندم دارا می باشند. ولر (۳۸) طی تحقیقی دریافت که میزان کلنیزاسیون ریشه آلوده به Ggt توسط *Pseudomonas fluorescens* 2-79 بیشتر از ریشه سالم می باشد. نتیجه تحقیقات او نشان داد که باکتری‌ها در ریشه آلوده تشکیل بایو فیلم می دهند و با تولید متابولیت‌های ثانویه مثل آنتی بیوتیک‌ها بیماری پاخوره گندم را کنترل می کنند. بر اساس پژوهش‌های هاس و همکاران (۱۱)، قدرت بیوکنترل باکتری‌ها به کلونیزاسیون ریشه و تشکیل بایو فیلم در آن بستگی دارد که با تولید متابولیت‌های مختلف از جمله آنتی بیوتیک‌ها روی عامل بیماریزا اثر می گذارد و یا در برخی موارد اثرات القایی در افزایش مقاومت در گیاه دارند(۱۱)

هیلی و همکاران، بر اساس بررسی‌های خود بر روی باکتری *P.fluorescens* 2P24 مشاهده کردند که این باکتری با تشکیل بایو فیلم و کلنیزاسیون ریشه توانایی بیوکنترل علیه قارچ Ggt را دارا است (۹). مدولا و همکاران(۲۹)، تشکیل بایو فیلم در جدایه *P.chlororaphis* را مورد بررسی قرار دادند . نتایج پژوهش آنها بیانگر نقش موثر تشکیل بایو فیلم در این باکتری در کنترل قارچ Ggt می باشد. نتایج حاصل از پژوهش ما نشان داد جدایه‌های موثر در کنترل قارچ در شرایط گلخانه ای یعنی جدایه‌های F1، F3 ، F4 ، F141، P4 و 2-79 از تشکیل بایو فیلم نیز قوی عمل کردند و اختلاف معنی داری بین تشکیل بایو فیلم در این جدایه‌ها و چاهک شاهد وجود دارد. این جدایه‌ها از نظر کاهش میزان شاخص بیماری پاخوره گندم در گلخانه نیز عملکرد بالایی را داشتند. جدایه‌های F70 ، F30 ، F115، CHN5 و CHN4 نیز شدت بیماری پاخوره گندم را پایین آورده بودند و در مرتبه بعد از شش جدایه اول قرار گرفتند. تشکیل بایو فیلم در این پنج جدایه نیز پس از شش جدایه برتر خوب بوده است. در سایر گیاهان تیمار شده با جدایه‌های باکتری کنترل بیماری پاخوره گندم به خوبی دیده نشد. این جدایه‌ها در تست تشکیل بایو فیلم نیز عملکرد مناسبی نداشتند. نتایج این پژوهش با یافته‌های محققین هم خوانی داشته است. بر این اساس توجه خاصی بر روی نقش باکتری‌های مفید شده است چون در محدود کردن بسیاری از بیمارگرها و فاکتورهای بیماریزا در طول آلودگی گیاه بسیار مهم می باشد. بر اساس تولید آنتی بیوتیک‌ها در جمعیت‌های بالا در حالت بایو فیلم و سیستم‌های پیچیده بیان ژن‌های مسئول تولید متابولیت‌های

مختلف در باکتری‌ها طی مراحل ایجاد بایو فیلم، می توان نقش بیوکنترل این آنتاگونیست‌ها را بر روی عوامل بیماریزای گیاهی درک کرد. امید است با تحقیقات تکمیلی، روزی شاهد استفاده از این میکروارگانیسم‌های مفید در مقیاس بالا باشیم.

سپاسگزاری

لازم می دانم از همکاری‌های مسئولین آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران قدردانی نمایم. از جناب آقای دکتر صابری و سرکار خانم مهندس لیلا صادقی برای ارسال جدایه‌های مورد نیاز و راهنمایی‌های ارزنده شان کمال تشکر را دارم.

منابع

1-An, D., Parsek, M. R. (2007). The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. Curr. Opin. Microbiol. 10(3): 292-296.
2-Arevalo-Ferro, C., Reil, G., Gorg, A., Eberl, L., and Riedel, K. (2005). Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of Quorum sensing as assessed by proteomics. Syst Appl. Microbiol. 28(2): 87-114.
3-Bull, C. T. (1987). Wheat root colonization by disease-suppressive or non-suppressive bacteria and the effect of population size on severity of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var.*tritici*. Ms Thesis, Washington State university, Pullman.(Abstract)
4- Cook, R. J., Rovira, A. D. (1976). The role of bacteria in the biological control of *Gaeumannomyces graminis* by suppressive soils. Soil Boil. Biochem. 8(2): 269-273.
5-Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W., and Greenberg, E. P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280(23):295-298.
6-Davies, D. G., Marques Claudia, N. H. (2009). A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in biofilms. J. Bacteriol.191(5): 1393-1403.
7-Gantner, S., Schmid, M., Dürr, C., Schuhegger, R., Steidle, A., Hutzler, P., Langebartels, C., Eberl, L., Hartmann, A., and Dazzo, F. B.(2006). In situ quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant root, FEMS Microbiol. Ecol. 56(2): 188-194.
8-Genavaux, P., Muller, S., and Bauda, P. (1996). A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. FEMS Microbiol Lett 142(3): 27-30.
9-Wei, H. L., Zhang, H. Q., Hailei, W., and Liqun, Z. (2006). Quorum sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. antonie van Leeuwenhoek. 89(2): 267-280.
10-Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural word to infectious disease. Nat. Rev. Microbiol. 2(2): 95-108.
11-Hass, D., Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Ann. rev. Phytopathol. 41(8): 117-153.
12-Hass, D., Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne-pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat. Rev. Microbiol. 3(2): 307-319.
13-Hense, B. A., Kuttler, C., Müller, J., Rothballer, M., Hartmann, A., and Kreft, J-U. (2007). Does efficiency sensing unify diffusion and Quorum sensing? Nat. Rev. Microbiol. 5(4): 230-239.
14-Heydorn, A., Nielsen, A. T., Hentzer, M., Sternberg, C., Givskov, M., Ersboll, B. K., and Molin, S. (2000). Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. Microbiology 146(13):2395-2407.
15-Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M., and Tolker-Nielsen, T (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: Impact of mutation in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. Appl. Environ. Microbiol. 68(4): 2008-2017.
16-Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., and Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature 436 (7054): 1171-1175.
17- Howell, C. R., Stipanovic, R. D.(1979). Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69(12): 480-482.
18-Izano, E. A., Amarante, M. A, Kher, W. B., and Kaplan, J. B. (2008). Differential Roles of Poly-*N*-

Acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 74(2): 470-476.
19- Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. E., James, C. E., and Shirtliff, M.(2006). Effect of farnesol on *staphylococcus aureus* biofilm formation an antimicrobial susceptiptibility. Antimicrob Agents chemother. 50:1463-9.
20-Jarrell, K (editor) (2009). Pili and Flagella: Current Research and Future Trends. Caister Academic Press. ISBN 976-1-904455-48-6.
21-Juhas, M., Eberl, L., and Tümmler, B. (2005) Quorum sensing: the power of cooperation in the world of pseudomonas. Environ. microbial. 7(4): 450-471.
22-Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., and Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β-hexosaminidase activity. J. Bacteriol. 185(16): 4693-4698.
23-Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., and Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. Antimicrob. Agents Chemother. 48(7): 2633-2636.
24-Karatan, E., Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks and materials that build and break bacterial biofilm. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 73 (2):310-347.
25-King, E. O., Ward, M. K., and Rainey, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Chin. Med. 44: 301-307.
26- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintz, M., and Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting rhizobacteria. Nature 286(9): 885-886.
27-Lazdunski, A. M., Ventre, I., and Sturgis, J. N. (2004). Regulatory circuits and communication in gram-negative bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 2(8): 581-592.
28-Maddula, V. S. R. K., Zhang, Z., Pierson, E. A., and Pierson III, L. S. (2006). Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30-84. Plant Pathology and Microbiology. 52: 289-301.
29-Maddula, V. S. R. K., Pierson, E. A., and Pierson III, L. S. (2008). Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) 30-84: effects on biofilm formation and pathogen inhibition. J. Bacteriol. 190(8): 2759-2766.
30-Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimmann, C., Duffy, B., and Défago, G. (2003). Degradation of pathogen Quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. FEMS Microbiol. Ecol. 45(1): 71-81.
31-O'Toole, G. A., Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WC365 produceed via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Mol. Microbiol. 28(15): 449-461.
32-Parsek, M. R, Green berg, E. p. (2005). Sociomicrobiology: the connections between Quorum sensing and biofilms. Trends Microbiol. 13(1): 27-33.
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(26): 3477-3485.
34- Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. St. Paul, USA, APS press. 373pp.
35-Stewart, P. S., Peyton, B. M., Drury, W. J., and Murga, R. (1993). Quantitative observations of heterogeneities in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 59: 327-329.
36-Stewart, P., Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Lancet 385 (9276):135-138.
37-Ullrich, M. (editor) (2009). Bacteriol Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Caister Academic Press. 358pp.
38- Weller, D. M. (1983). Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. Phytopathology 73(18): 1548-1553.
39-Xavier, J. B., Picioreanu, C., Rani, S. A., Loosdrecht, M. C. M. V., and Stewart. P. S. (2005) Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix- a modeling study. Microbiology. 151(151): 3817-3832.
40-Yoshida, A., Ansai, T., Takehara, T., and Kuramitsu, H. K. (2005). LuxS-based signaling affects *Streptococcus* mutans biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 71(28): 2372-2380.