

ارتباط بین دو پدیده تنوع فازی و تشکیل بیوفیلم در سودوموناس‌های فلورسنت و قابلیت آنها در کنترل بیولوژیکی بیماری پاخوره گندم در اثر قارچ *Gaeumannomyces graminis var. tritici*

فائزه باقری^{۱*} - حمید روحانی^۲ - ماهرخ فلاحتی رستگار^۳ - روح اله صابری ریشه^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۰/۲۵

چکیده

تنوع فازی و قابلیت تولید بیوفیلم از جمله مشخصات مهم سودوموناس‌های فلورسنت است که نقش مهمی در قابلیت بیوکنترلی آنها به عهده دارد. این دو پدیده قابلیت سازش و قدرت توسعه بیشتر سودوموناس‌ها را روی ریشه در طول رشد گیاه افزایش می‌دهند. به طور کلی با تشکیل بیوفیلم سلول‌ها از نظر فنوتیپی تغییر می‌کنند که می‌تواند نقش تعیین‌کننده‌ای در کنترل بیماری‌های مختلف داشته باشد. در این تحقیق در هفت جدایه باکتریایی سودوموناس فلورسنت Um11، Um141، Um138، Um70، Um115، UmCHN5 و Pseudomonas fluorescens F113 کلونی‌هایی با مورفولوژی متفاوت که نشان‌دهنده بروز پدیده تنوع فازی بودند مشاهده گردید. نتایج بررسی الگوی توزیع کلونی‌ها در شرایط سترون و همچنین در حضور قارچ بیمارگر *Gaeumannomyces graminis var. tritici* نیز نشان داد که این باکتری‌ها قادرند خود را با شرایط متفاوت رشدی ریشه سازگار نموده و قسمت‌های مختلف ریشه را کلونیزه نمایند و اثرات بیماری‌زایی مربوط به قارچ *Ggt* را تا حد زیادی کاهش دهند. سنجش توانایی تشکیل بیوفیلم در این هفت جدایه باکتریایی از توانایی بالای آنها در زمینه تشکیل بیوفیلم حکایت داشت. حال آنکه بررسی میزان تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن (HCN) در این هفت جدایه نشان داد که میان تولید این متابولیت‌های ضد قارچی و کاهش بیماری رابطه معنی‌داری وجود ندارد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس‌های فلورسنت، بیوفیلم، کلونیزاسیون ریشه، تنوع فازی، قارچ *Gaeumannomyces graminis var. tritici*

مقدمه

ساکاریدهای خارج سلولی (EPS)^۱، پروتئین، نوکلئیک اسید و سایر مواد می‌باشد. تنوع وسیعی در ترکیبات این ماده زمینه‌ای و زمان تشکیل آن وجود دارد. در میان این مواد ترکیبات EPS از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (۱۴ و ۱۶). تشکیل بیوفیلم با چسبندگی آزاد میکروارگانیسم‌ها به سطح مربوطه شروع می‌شود. اولین کلونی‌ها تحت یک نیروی واندروالسی اتصال ضعیفی را با سطح برقرار می‌کنند و چنانچه کلونی از سطح جدا نشود، با استفاده از ساختارهای چسبیده مانند پلی‌ها عمل تثبیت بر روی سطح را انجام می‌دهند. این عمل با استفاده از ماده زمینه‌ای بوجود آمده موجب گسترش بیوفیلم می‌شود. تشکیل بیوفیلم طی پنج مرحله: (۱) تماس اولیه (۲) تماس ثانویه برای تثبیت بیشتر (۳) بلوغ اولیه (۴) بلوغ ثانویه (۵) پراکنش بیوفیلم صورت می‌گیرد. پراکنش سلول‌ها از کلونی‌های بیوفیلم مرحله ضروری سیکل تشکیل بیوفیلم است (۱۵ و ۱۷). تشکیل بیوفیلم از نظر حفاظت در مقابل شرایط محیطی و

جمعیت‌هایی متشکل از یک گونه یا گونه‌های متنوع باکتری به صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطوح زنده و غیرزنده در زمینه‌هایی از پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی را بیوفیلم می‌نامند. بیوفیلم فرایند پیچیده‌ای است که نیازمند رفتارهای جمعی باکتری می‌باشد (۶). یکی از اجزای کلیدی بیوفیلم ماده زمینه‌ای^۵ محاط بر آن است که لعاب^۶ نامیده می‌شود و دارای ترکیباتی چون پلی

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادان گروه گیاهپزشکی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(*)- نویسنده مسئول: Email: Faezeh1504@Gmail.com

۴- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

تحقیق اهمیت ارتباط بین پدیده تنوع فازی و تشکیل بیوفیلم با بیوکنترل بیماری پاخوره گندم بود.

مواد و روش‌ها

تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه

هشت جدایه باکتریایی سودوموناس فلورسنت Um141، Um11، Um138، Um70، Um115، UmCHN5 (جدایه دانشگاه فردوسی مشهد) و *Pseudomonas fluorescens* F113 (دانشگاه لوزان سوئیس) (هفت جدایه که تنوع فازی مشاهده شد و در جدایه *Pseudomonas fluorescens* CHA89 (موتان *gacA*) (دانشگاه لوزان سوئیس) پدیده تنوع فازی بودند مشاهده نشد و همچنین ضعیفترین عملکرد را در مقابل قارچ *Ggt* داشت به منظور مقایسه با سایر جدایه‌ها) برای انجام تحقیق انتخاب شدند.

برای بررسی تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه ابتدا باکتری‌ها توسط آنتی بیوتیک استرپتومایسین در غلظت ۱۰۰ پی پی ام در محیط کشت جامد KB مقاوم سازی شدند (۱۰) و بذره‌های گندم مورد استفاده (رقم زمستانه الوند، تهیه شده از مؤسسه تحقیقات طرق مشهد) نیز توسط الکل اتانول ۷۰٪ و محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ ضد عفونی شدند. در مرحله بعد یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته هر جدایه آنتاگونیست باکتریایی روی محیط KB به فلاسک‌های حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون منتقل و سوسپانسیونی تهیه گردید ($OD_{546} = 0.1$) ($10^9 \text{ cfu/cc} \times 4/5$). جهت آغشته سازی بذره‌های گندم به باکتری‌های آنتاگونیست، کربوکسی متیل سلولز به نسبت ۰/۵٪ به سوسپانسیون‌ها افزوده شد (۲۶). سپس بذره‌های گندم به مدت ۱۰ دقیقه در مایه تلقیح مذکور قرار داده و زیر هود خشک گردیدند.

برای بررسی پدیده تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه در شرایط سترون از لوله‌های مخصوصی به نام کرابو استفاده شد. ماده جامد پرلیت و محلول غذایی هوگلند به عنوان ماده معدنی درون لوله‌ها ریخته و درب لوله‌ها با استفاده از پنبه بسته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس بذره‌های تیمار شده با جمعیت $10^9 \text{ cfu/cc} \times 4/5$ سلول باکتری درون لوله‌ها کاشته شدند. پس از سه هفته، ریشه‌ها از درون لوله‌ها خارج و پس از شستشوی سطحی به سه قسمت تقسیم شدند: ناحیه بالایی تا جایی که ریشه‌های ثانویه شروع می‌شود، قسمت مرکزی شامل ریشه‌های ثانویه و قسمت انتهایی. سپس جمعیت هر کدام از قسمت‌های ریشه به طور جداگانه تعیین گردید (۲۶). این آزمایش بر روی هشت تیمار (شامل هفت جدایه باکتریایی سودوموناس فلورسنت که در آزمایشگاه تنوع فازی از خود بروز دادند و جدایه CHA89 که

مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها (۳ و ۲۳)، قابلیت استفاده از مواد غذایی و همکاری متابولیکی (۶)، تشکیل بیوفیلم روی سطوح زنده (۲۳) و تأثیر بر روی کلونیزاسیون ریشه (۲۳) مفید تشخیص داده شده است. مطالعات بر روی باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، به عنوان مدلی برای بررسی ارتباط بین تنوع فازی و بیوفیلم، نشان داده است که در تشکیل بیوفیلم در این باکتری تاژک، پیلی نوع چهارم و آگزو پیلی ساکارید‌ها نقش مهمی دارند. باکتری‌ها برای زنده ماندن در شرایط متغیر محیطی از استراتژی تنوع فازی، که طی آن باکتری مرتباً جمعیت‌های به لحاظ فنوتیپی متفاوتی را ایجاد می‌کند، سود می‌برند.

با تشکیل بیوفیلم سلول‌ها از نظر فنوتیپی تغییر می‌کنند. در این عمل ژن‌های بسیاری دخالت دارند (۲ و ۱۳). به طور کلی اغلب میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم در سطح اندام‌های گیاهی می‌باشند و این ارتباط تأثیر تعیین‌کننده‌ای در کنترل بیماری‌های مختلف دارد (۲۰). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که رفتار بیوکنترل سودوموناس‌های فلورسنت با توانایی تنوع فازی آنها طی کلونیزاسیون ریشه ارتباط مستقیم دارد (۱۸). ارتباط بیوفیلم با کلونیزاسیون ریشه برای کنترل بیمارگرها، از مباحث جدیدی است که در سال‌های اخیر به آن توجه شده است. به طور مثال باکتری *Pseudomonas chlororaphis* از باکتری‌هایی است که سبب کنترل بیماری پاخوره در گندم می‌گردد، نتایج پژوهشی که بر روی تأثیر تشکیل بیوفیلم در این باکتری و کلونیزاسیون ریشه برای کنترل بیماری پاخوره گندم صورت گرفته است، بیان‌گر تأثیر بالای تشکیل بیوفیلم بر کنترل قارچ *Ggt* و همچنین ارتباط معنادار بین بیوفیلم و کلونیزاسیون است (۲۰). طی تحقیقی که بر روی باکتری *P. aeruginosa* 57RP که یکی از پاتوژن‌های فرصت طلب انسانی صورت گرفت مشخص شد که طی تنوع فازی در این باکتری کلونی‌های کوچکی به نام واریانت‌های S بوجود می‌آیند. این واریانت‌ها مقدار زیادی پیلی نوع چهارم تولید می‌کنند و علاوه بر آن در محیط کشت مایع ثابت نیز تجمع یافته و به طور مرتب تشکیل بیوفیلم با قدرت چسبندگی بالا می‌دهند. در حالیکه کلونی‌های بزرگ به نام واریانت L، مقدار کمی پیلی نوع چهارم تولید می‌کنند که به طور یکسان در محیط کشت مایع ثابت پخش می‌شوند و بیوفیلمی با چسبندگی ضعیف تشکیل می‌دهد. بررسی‌های بیشتر نشان داد که واریانت S نسبت به واریانت L تفاوت‌هایی از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی، مانند افزایش تولید سیدروفور پایوردین و کاهش فعالیت آنزیم الاستاز تحت شرایط رشد مناسب، دارد. با وجود اینکه تحقیق‌ها تأیید می‌کنند که واریانت S در نتیجه تنوع فازی بوجود می‌آید، هنوز سیستم تنظیم‌کننده‌ای که فرایند تبدیل به فنوتیپ بیوفیلم را کنترل می‌کند شناخته نشده است (۹). هدف از این

فاقد توانایی تنوع فازی بود و در بین جدایه های مورد آزمایش ضعیف ترین عملکرد را داشت) در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به منظور بررسی تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه در حضور قارچ بیمارگر *Ggt* بذره های تیمار شده به جدایه های باکتریایی درون گلدان کشت داده شدند (۲۸). پس از چهار هفته ریشه ها از گلدان ها خارج گشته و درصد سیاه شدگی طوقه بررسی گردید. بر اساس درصد نکروزه شدن ریشه ها و طوقه ها شدت بیماری بین ۵-۰ به شرح ذیل تعیین شد (۰= ریشه ها و طوقه ها بدون لکه نکروزه، ۱= ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه فاقد علائم، ۲= ریشه دارای لکه های ممتد نکروزه (نکروزه شدن بیشتر از ۲۵ درصد و کمتر از ۵۰ درصد ریشه ها) و طوقه بدون علائم، ۳= نکروزه شدن بیشتر از ۵۰ درصد ریشه ها و سیاه شدگی طوقه، ۴= ریشه ها تقریباً سیاه رنگ با توسعه ۷۵ درصد سیاه شدگی طوقه، ۵= ریشه و طوقه سیاه و سبز خشکیدگی گیاه) (۲۵).

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

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

(مخرج کسر در فرمول فوق حداکثر مقیاس آلودگی \times تعداد گیاهچه های کشت شده می باشد که نتیجه آن حداکثر شدت بیماری ممکن می باشد) سپس طبق روش سانچز و همکاران (۲۶) جمعیت باکتری ها در هر کدام از قسمت های ریشه به طور جداگانه تعیین گردید.

سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم

برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری ها از روش مادولا و همکاران (۲۱) با کمی تغییر استفاده شد. یک کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر جدایه در *TSB*^۱ (شرکت Merck) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تهیه شد. سپس یک میلی لیتر از این کشت هر جدایه به ۱۰ میلی لیتر از محیط *TSB* سترون اضافه شد و بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Strat fax-2100) کدورت آن از طریق قرائت جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر تنظیم گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به هشت چاهک در میکروپلیت انتقال داده شد. چاهک های شاهد تنها حاوی محیط کشت سترون بدون باکتری بودند. ظرفیت هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر بود. سپس سطح پلیت ها با درب پوشیده شد و آنکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول مواد غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهک ها خارج شد و هر چاهک سه مرتبه توسط ۳۰۰

میکرولیتر سرم فیزیولوژی سترون شسته شد. همچنین پلیت ها به منظور حذف سلول های غیر متصل در حین شستشو به شدت تکان داده شدند. سپس باکتری های متصل به دیواره و کف چاهک، با ۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ تثبیت شدند. بعد از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک ها تخلیه شد و پلیت ها در یک محل در آزمایشگاه به منظور خشک شدن قرار گرفتند. بعد از خشک شدن، پلیت ها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲٪ که برای رنگ آمیزی گرم مورد استفاده قرار می گیرد، رنگ آمیزی شدند. سپس رنگ های اضافی از طریق قرار دادن پلیت ها در مسیر جریان آب لوله کشی شهری شسته شدند. این رنگ (کریستال ویوله) برای سنجش میزان بیوفیلم بسیار مناسب است. به طوری که چاهک هایی که بیشترین میزان جذب رنگ را داشته اند بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم را داشتند. بعد از شستن رنگ های اضافی، پلیت ها در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا خشک شوند. بعد از خشک شدن پلیت ها، بیوفیلم به صورت حلقه های ارغوانی رنگی بر روی چاهک ها قابل مشاهده بود. سنجش کمی تولید بیوفیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت. سپس جذب نوری (OD) رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ بر (اسید استیک) در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه ELISA Reader (مدل Apel) خوانده شد. این آزمایش با هشت تیمار، در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. در نهایت جدایه ها بر اساس روش مقایسه میانگین جذب نوری، بیوفیلم باکتری ها به این شکل رتبه بندی شدند:

فاقد چسبندگی:

Non-adherent: OD < ODC

چسبندگی ضعیف:

Weakly-adherent: ODC < OD < 2ODC

چسبندگی متوسط:

Moderately-adherent: 2ODC < OD < 4ODC

چسبندگی قوی:

Strongly-adherent: 4ODC < OD

میانگین جذب نوری یک باکتری = OD

میانگین جذب نوری چاهک های شاهد = ODC

رتبه بندی نتایج آزمایش از طریق مقایسه OD به دست آمده از چاهک ها برای هر جدایه باکتریایی با میانگین OD به دست آمده از چاهک های شاهد می باشد.

بررسی میزان تولید سیدروفور در جدایه های آنناکونیست

سودوموناس فلورسنت

برای اندازه گیری میزان سیدروفور از روش کمی اسپکتروفتومتری کاستاندا و همکاران (۴) استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت

1-Tryptic Soy Broth

نتایج

تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه

در هفت جدایه باکتریایی Um138, Um11, Um141, Um70, Um115, UmCHN5 و *Peudomonas fluorescens* F113 که دارای قابلیت بیوکنترل بالا علیه قارچ *Ggt* و همچنین دارای توانایی تولید کلونی‌هایی متفاوتی از نظر تفاوت در مرفولوژی و رنگ که نشان دهنده بروز پدیده تنوع فازی بودند مشاهده گردید ولی این خصوصیات در جدایه CHA89 دیده نشدند.

میانگین لگاریتم جمعیت کلونی‌ها بر روی قسمت‌های مختلف ریشه در شرایط سترون (لوله‌های کرایو) حاکی از آن بود که بیشترین جمعیت باکتری‌ها به ترتیب در قسمت انتهایی، میانی و ناحیه بالایی ریشه وجود داشت (شکل ۱).

این نتایج در حضور قارچ بیمارگر *Ggt* (کشت گلخانه‌ای) نیز به دست آمد به نحوی که بیشترین میزان جمعیت باکتری‌ها به ترتیب در قسمت انتهایی، میانی و ناحیه بالایی ریشه دیده شد (جدول ۱). این نتایج دلالت بر این داشت که این باکتری‌ها قادر به سازگاری با شرایط متفاوت رشدی ریشه و کلونیزه کردن تمامی قسمت‌های ریشه و کنترل شدت بیماری پاخوره گندم بوده است. مقایسه نمودارهای کلونیزاسیون ریشه و شدت بیماری به خوبی نشان می‌دهد که جدایه‌هایی که کلونیزاسیون بیشتری صورت داده‌اند توانسته‌اند کنترل بهتری نسبت به بیماری پاخوره گندم داشته باشند (شکل‌های ۲ و ۳).

قدرت تشکیل بیوفیلم در جدایه‌های منتخب آنتاگونیست

سودوموناس فلورسنت

نتایج تست بیوفیلم نشان داد که جدایه Um141 دارای بیشترین میزان چسبندگی و جدایه CHA89 از کمترین چسبندگی برخوردار بود (شکل ۴). رتبه بندی جدایه‌ها بر اساس مقایسه میانگین جذب نوری جدایه‌ها بیان‌گر این بود که هیچ کدام از جدایه‌ها فاقد چسبندگی یا دارای چسبندگی ضعیف نبودند و تنها جدایه CHA89 دارای چسبندگی متوسط بود و دیگر جدایه‌ها چسبندگی قوی داشتند.

تولید سیدروفور در جدایه‌های آنتاگونیست سودوموناس

فلورسنت

در این روش به صورت اختصاصی، مقدار تولید سیدروفور نوع پایووردین قابل ارزیابی است. نتایج به دست آمده از میزان جذب مولی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با استفاده از ضریب مولی پایووردین خالص به میکرومول پایووردین تبدیل شد.

۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات (KH_2PO_4 ; 3.0g/l, K_2HPO_4 ; 6.0g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/l, NH_4SO_4 ; 1.0g/l, succinic acid 4.0g/l) به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد. این محیط‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفومتر قرائت شد. داده‌های حاصله با استفاده از فرمول $A = \varepsilon BC$ (میزان جذب = A، ضریب جذب مولی = ε ، قطر کوت = B، غلظت ماده = C) به مول در لیتر تبدیل شد. این آزمایش برای هشت تیمار و در سه تکرار صورت گرفت.

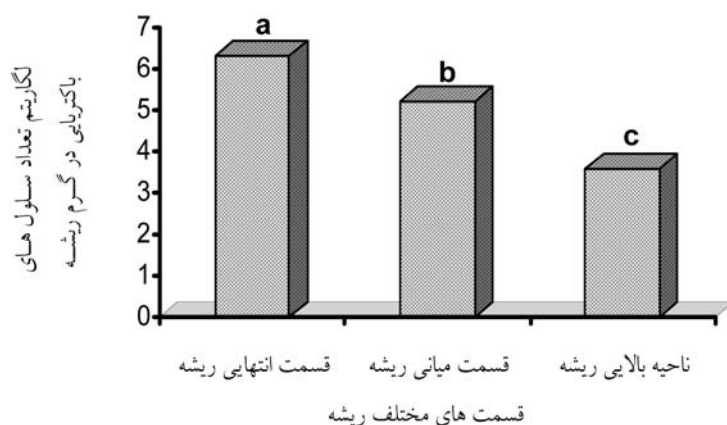
تولید سیانید هیدروژن در جدایه‌های آنتاگونیست

سودوموناس فلورسنت

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن از روش آلستروم و همکاران (۱) با کمی تغییرات استفاده گردید. ابتدا محیط KB فاقد گلیسین تهیه گردیده و اتوکلاو شد. سپس در هر پتری ۱۰۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتری تلقیح شد. بعد یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد در قسمت درب پتری قرار داده شد. یک پتری نیز به عنوان شاهد بدون تلقیح باکتری در نظر گرفته شد. پتری‌ها توسط نوار پارافیلیم مسدود شدند، تا از خروج هرگونه متابولیت‌های فرار و گازی شکل از جمله سیانید هیدروژن جلوگیری به عمل آید، آنگاه این ظروف به صورت واژگون به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت درون انکوباتور قرار داده شدند. در صورت تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌ها، کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ زرد اولیه به کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و نهایتاً آجری تغییر رنگ می‌یابد که به این ترتیب از صفر تا چهار مقیاس دهی می‌شوند. این آزمایش برای هشت تیمار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت.

محاسبات آماری

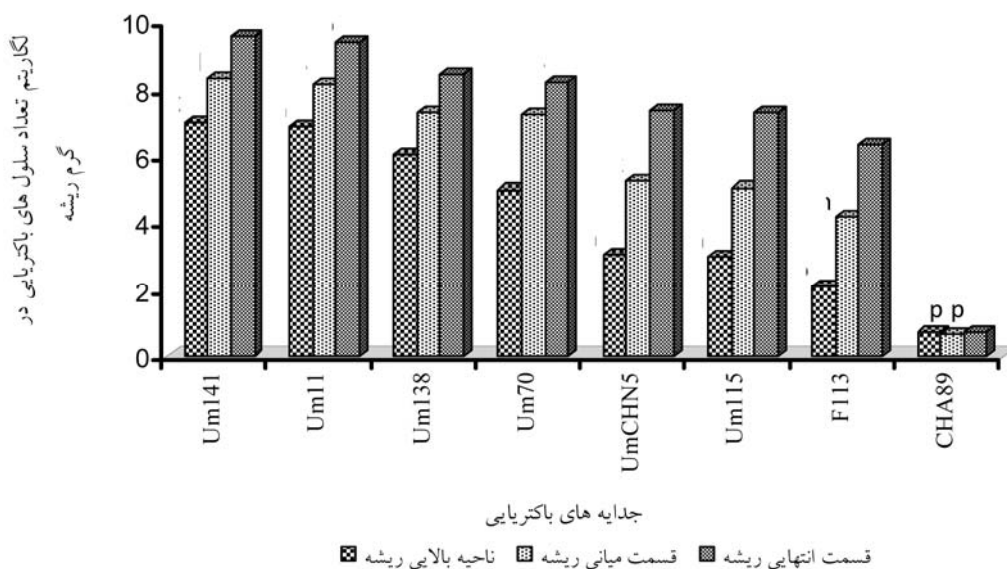
تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن ($P \leq 0.05$) و با استفاده از نرم افزارهای آماری MSTATC و SAS.9.0 انجام گرفت. در مواردی که از برنامه SAS.9.0 استفاده شده در مورد صفاتی که عدد صفر در بین آنها وجود داشت از تبدیل جذری $\sqrt{X + 0.5}$ استفاده گردید.



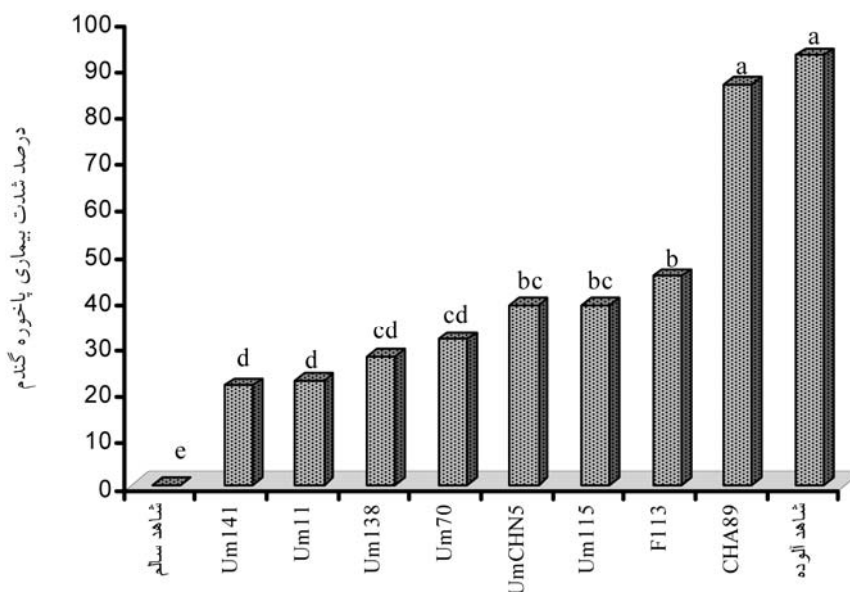
شکل ۱ - الگوی توزیع باکتری ها در قسمت های مختلف ریشه

جدول ۱ - مقایسه میانگین جمعیت باکتریایی در قسمت های مختلف ریشه گندم در حضور قارچ بیمارگر Ggt

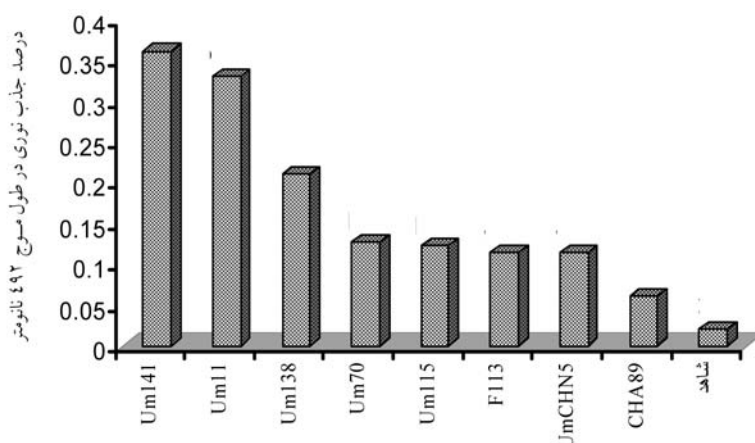
جدایه های باکتریایی	میانگین جمعیت باکتری در قسمت انتهایی ریشه	میانگین جمعیت باکتری در قسمت میانی ریشه	میانگین جمعیت باکتری در ناحیه بالایی ریشه
Um141	$3/6 \times 10^9$	2×10^8	$1/0.25 \times 10^7$
Um11	$2/625 \times 10^9$	$1/325 \times 10^8$	$7/75 \times 10^6$
Um138	$2/7 \times 10^8$	$2/0.5 \times 10^7$	$1/1 \times 10^6$
Um70	$1/5 \times 10^8$	$1/8 \times 10^7$	1×10^5
UmCHN5	$2/375 \times 10^7$	$1/95 \times 10^5$	$1/2 \times 10^3$
Um115	$2/1 \times 10^7$	$1/15 \times 10^5$	$1/0.25 \times 10^3$
F113	$2/15 \times 10^6$	$1/525 \times 10^4$	$1/35 \times 10^2$
CHA89	$1/5 \times 10^1$	$1/25 \times 10^1$	$1/5 \times 10^1$



شکل ۲ - الگوی توزیع کلونی ها بر روی قسمت های مختلف ریشه در حضور قارچ بیمارگر Ggt



شکل ۳- درصد شدت بیماری پاختوره گندم در جدایه های باکتریایی سودوموناس فلورسنت



شکل ۴- تشکیل بیوفیلم در جدایه های سودوموناس فلورسنت بر اساس میزان جذب نوری در چاهک ها

UmCHN5 و Um115، Um70 به رنگ قهوه ای تیره (رتبه ۳)، جدایه Um11 به رنگ قهوه ای روشن (رتبه ۲)، جدایه Um138 به رنگ کرم (رتبه ۱) و جدایه های F113 و CHA89 نیز به رنگ زرد اولیه (رتبه صفر) بودند.

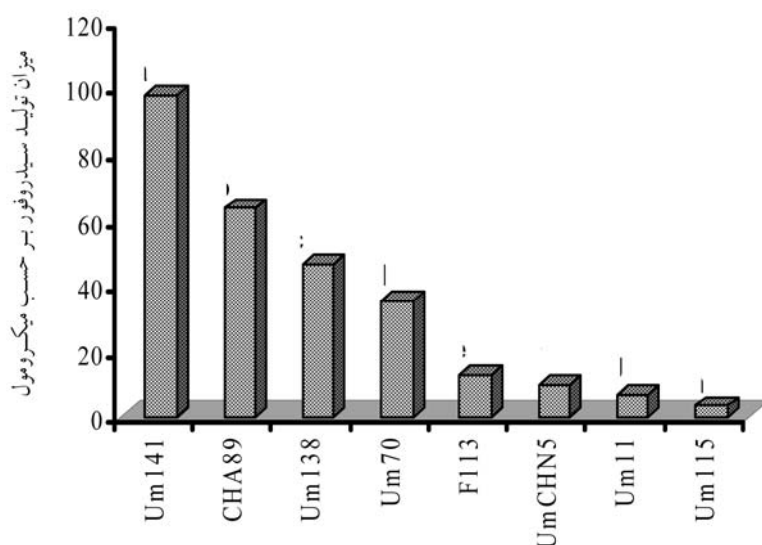
بحث

پدیده تنوع فازی در سودوموناس های فلورسنت طی کلونیزاسیون ریشه رخ می دهد (۲۶). بر اثر این پدیده زیرجمعیت هایی ایجاد می شوند که به باکتری اجازه می دهند در شرایط محیطی متفاوت مقداری از جمعیت خود را حفظ نموده و ریشه را کلونیزه کنند (۲۶).

از بین هشت جدایه مورد آزمایش جدایه Um141 با تولید ۹۷/۷۶۸ میکرومول پایوریدین بیشترین مقدار تولید را داشت و از لحاظ آماری با سایر جدایه ها اختلاف معنی داری نشان داد. همچنین جدایه Um115 با تولید ۳/۳ میکرومول پایوریدین کمترین مقدار تولید را داشت (شکل ۵).

تولید سیانید هیدروژن در جدایه های آنتاگونیست سودوموناس فلورسنت

توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی گردید و بر اساس رتبه بندی رنگ ها از صفر تا چهار مشخص گردید که از بین جدایه های بررسی شده، جدایه های Um141،



جدایه های باکتری های سودوموناس فلورسنت

شکل ۵- میزان تولید سیدروفور در جدایه های آنتاگونیست باکتری های سودوموناس فلورسنت

کلونیزاسیون مربوط به قسمت انتهایی ریشه بود. از طرفی مقایسه میانگین جمعیت باکتری در سه قسمت ریشه در هر هفت جدایه با جدایه CHA89 تأیید کرد که این جدایه های باکتریایی قادر به سازگاری با شرایط متفاوت رشدی ریشه و حرکت به سمت قسمت انتهایی ریشه و کلونیزه نمودن آن می باشند (۸ و ۲۶).

قدرت بیوکنترل باکتری ها علاوه بر توانایی آنها در کلونیزاسیون می تواند با تشکیل بیوفیلم نیز در ارتباط باشد. بر اساس یافته های هاس و همکاران (۱۱) قدرت بیوکنترل باکتری ها بستگی به کلونیزاسیون ریشه و تشکیل بیوفیلم در آنها دارد که با تولید متابولیت های مختلف از جمله آنتی بیوتیک ها روی عامل بیماریزا اثر می گذارند و یا در برخی موارد اثرات القایی در افزایش مقاومت در گیاه دارند. هیلی و همکاران (۱۲) در بررسی های خود بر روی باکتری *P. fluorescens* 2P24 مشاهده کردند که این باکتری با تشکیل بیوفیلم و کلونیزاسیون ریشه توانایی بیوکنترل علیه قارچ *Ggt* را دارد. بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم در جدایه های Um11, Um141, Um138, Um70, Um115, UmCHN5, F113, CHA89 و Um138 نشان داد که میان قدرت تشکیل بیوفیلم و کلونیزاسیون همبستگی معناداری وجود دارد. به عبارت دیگر، هفت جدایه باکتریایی منتخب که در کلونیزاسیون ریشه موفق بودند از قدرت بالایی در تشکیل بیوفیلم نیز برخوردار بودند اما جدایه CHA89 نه در کلونیزاسیون ریشه موفق بود و نه قدرت تشکیل بیوفیلم بالایی داشت. بنابراین می توان همانند هیلی و همکاران (۱۲) استدلال نمود که تشکیل بیوفیلم و کلونیزاسیون ریشه در این جدایه های باکتریایی با توانایی بیوکنترلی آنها در ارتباط است.

در این تحقیق بررسی الگوی توزیع کلونی ها در قسمت های مختلف ریشه در هفت جدایه باکتریایی در شرایط آزمایشگاه نشان داد که باکتری در تمام قسمت های ریشه وجود داشت و بیشترین میزان جمعیت در هر هفت جدایه در قسمت انتهایی ریشه بود درحالیکه کمترین میزان جمعیت در ناحیه بالایی ریشه دیده شد. کلونی های به دست آمده از قسمت های مختلف ریشه با کلونی های حاصل از کشت آزمایشگاهی کاملاً شباهت داشتند بنابراین می توان گفت که تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه رخ داده و باکتری توانسته خود را با شرایط متفاوت رشدی ریشه سازگار نماید. ارزیابی تنوع فازی طی کلونیزاسیون و ارتباط آن با کاهش بیماری در این تحقیق مشخص کرد که در جدایه های Um141, Um11, Um138, Um70, UmCHN5, Um115 و F113 قدرت بازدارندگی در برابر قارچ بیماریگر *Ggt* به ترتیب عبارت بود از ۷۸/۷۵، ۷۷/۵، ۷۲/۵، ۶۸/۷۵، ۶۱/۲۵، ۶۱/۲۵ درصد درحالیکه در جدایه CHA89 میزان بازدارندگی ۱۳/۷۵ درصد بود. این نتایج بیان گر وجود همبستگی معنادار بین افزایش میزان کلونیزاسیون ریشه توسط این هفت جدایه و توسعه کنترل بیولوژیک بر علیه قارچ *Ggt* بود.

مطالعه جمعیت باکتری ها بر روی گیاهان نشان دهنده این مطلب است که سودوموناس های فلورسنت می توانند به طور وسیعی در طول ریشه گیاهان توزیع گردند. کلونیزاسیون موفق زمانی است که باکتری پس از قرار گرفتن روی بذر بتواند خود را به انتهایی ریشه برساند و این ناحیه را کلونیزه نماید (۸ و ۱۹). در این تحقیق الگوی توزیع کلونی ها در هفت جدایه و در سه قسمت ریشه گیاه گندم پس از آزمایش های گلخانه ای نشان از آن داشت که بیشترین میزان

فلورسنت توانایی تولید چندین سیدروفور از قبیل پایووردین، پایوچلین و سالیسیک اسید را دارند که در کنترل بیمارگرها نقش بسزایی ایفا می‌کنند (۵ و ۷). بر این اساس و بر طبق یافته‌های آزمایشگاهی این تحقیق جدایه Um141 با تولید ۹۷/۷۶۸ میکرومول بیشترین و جدایه Um115 با ۳/۳ میکرومول کمترین میزان تولید سیدروفور را داشتند. نکته قابل توجه در این آزمایش تولید ۶۳/۳۳ میکرومول سیدروفور توسط جدایه CHA89 بود که خود نشان دهنده عدم وجود همبستگی میان میزان تولید سیدروفور و کاهش بیماری پاخوره گندم می‌باشد. زیرا جدایه CHA89 علیرغم تولید زیاد سیدروفور در کنترل بیماری پاخوره گندم موفق نبود.

تارپرو و همکاران (۲۷) طی یک کار تحقیقاتی، به این نتیجه رسیدند که حداقل ۴۰ درصد سودوموناس‌های جداسازی شده از ریشه گیاه سیب زمینی در شرایط آزمایشگاهی تولید سیانید هیدروژن کرده بودند. در این تحقیق بررسی رابطه میان تولید سیانید هیدروژن در هشت جدایه باکتریایی و کاهش بیماری پاخوره گندم در این جدایه‌ها نشان داد که بین آنها همبستگی معنا داری وجود ندارد. او سولیوان و اوگارا (۲۴) گزارش کردند که بسیاری از جدایه‌های سودوموناس فلورسنت توانایی تولید سیدروفور را دارند. سودوموناس‌های فلورسنت بواسطه تولید سیدروفور بالا، با القای مقاومت سیستمیک (ISR)^۱ سبب کنترل عوامل بیماریزای گیاهی خاکزاد می‌شوند. تحقیقات نشان داده اند که سودوموناس‌های

منابع

- Alstrom S., and Burns R.G. 1989. Cyanid production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, 7:232-238.
- An D., and Parsek M.R. 2007. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Journal of Microbiology*, 10: 292-296.
- Branda S.S., Vik A., Friedman L., and Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *TRENDS in Microbiology*, Vol.13 No.1: 20-26.
- Castaneda G.C., Munoz T.J.J., and Videa J.R.P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Microchemical Journal*, 81:35-40.
- Dave B.P., and Dube H.C. 2000. Detection and chemical characterization of siderophore of rhizobacterial *fluorescent Pseudomonas*. *Indian Phytopathology*, 53: 97-98.
- Davey M.E., and O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology, Review*, 64: 847-867.
- De Meyer G., and Hofte M. 1997. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NKS2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Journal of Phytopathology*, 87:588-593.
- De Weert S., and Blomberg G.V. 2006. Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontrol. *Plant-Associated Bacteria*, Pp 317-333.
- Déziel E., Comeau Y., and Villemur R. 2001. Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpilated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *Journal of Bacteriology*, 183: 1195-1204.
- Glandorf D.C.M., Brand I., Bakker P.A.H.M., and Schipper B. 1992. Stability of rifampicin resistance as marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. *Plant and soil*, 147:135-142.
- Haas D., and Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biology for control of plant disease. *Phytopathology*, 41: 117-153.
- Hailei W., and Liqun Z. 2006. Quorum sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Journal of Plant Pathology*, 89:267-280.
- Hall- Stoodley L., Costerton J.W., and Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural world to infectious disease. *Nauret Review Journal of Microbiology*, 2 : 95-108.
- 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.
- 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. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 470-476.
- Jabra-Rizk M.A., Meiller T.E., James C.E., and Shirtliff M.E. 2006. Effect of farnesol on *staphylococcus aureus* biofilm formation an antimicrobial susceptiptibility. *Antimicrob Agents chemotherapy*, 50:1463-9.
- Kaplan J.B., Raganath C., Ramasubbu N., and Fine D.H. 2003. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous B- Hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology*,

- 185: 4693-4698.
- 18- Lugtenberg B.J.J., Chin-A-Woeng T.F.C., and Bloemberg G.V. 2002. Microbe plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhok*, 81:373-383.
- 19- Lugtenberg B.J.J., Dekkers L.C., and Bloemberg G.V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39:461-490.
- 20- 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. *Journal of Bacteriology*, 187: 1351-1359.
- 21- 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.
- 22- Molina L., Constantinescu F., Michel L., Reimmann C., Duffy B., and Defago G. 2003. Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiol. Ecoogyl*, 45: 71-81.
- 23- Morris C.E., and Monier J.M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 41:429-453.
- 24- O'Sullivan D.J., and Gara F.O. 1992. Traits of *Pseudomonas fluorescens* involved in suppression of plant root pathogens. *Journal of Microbiology*, 56: 662-676.
- 25- Ownley B.H., Duffy B.K., and Weller D.M. 2003. Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 150: 3333-3343.
- 26- Sánchez-Contreras M., Martín M., Villaceros M., and O'Gara F. 2001. Phenotypic selection and phase variation occur during Alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, 184: 1587-1596.
- 27- Tarpero-Casas A., Kaiser W.J., and Ingram D.M. 1990. Control of *Pythium* seed rot pre emergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. *Plant Disease*, 74:563-569.
- 28- Thomashow L.S., and Weller D.M. 1988. Role of phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170: 3499-3508.
- 29- Van den Broek D., Bloemberg G.V., and Lugtenberg B.J.J. 2005. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environmental Microbiology*, 7:1686-1697.