مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۲۰۸-۱۹۹)

بررسی پدیده تنوع فازی در سودوموناس‌های فلورسنت و نقش آن در کنترل قارچ بیمارگر *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل بیماری پاخوره گندم

فائزه باقری[۱]*، حمید روحانی[۲]، ماهرخ فلاحتی رستگار[۳] و روح اله صابری ریسه[۴]
۱، ۲، ۳، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۴، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ولیعصر(عج) رفسنجان، رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۶ - تاریخ تصویب: ۹۰/۷/۱۲)

چکیده

یکی از ویژگی‌های مهم سودوموناس‌های فلورسنت، که با توانایی بیوکنترل آنها در ارتباط است، قدرت و توانایی آنها در ایجاد تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریزوسفر می‌باشد. برای بررسی این پدیده ابتدا ۲۴ جدایه باکتریایی سودوموناس فلورسنت که در مقابل قارچ *Ggt* هاله بازدارندگی بین ۱۴/۶۷-۳ میلی‌متر ایجاد کردند برای انجام آزمایش گلخانه‌ای انتخاب شدند. در آزمون گلخانه‌ای ۱۲ جدایه باکتریایی که توانستند باعث کاهش بیماری پاخوره گندم به میزان ۷۷/۵٪-۴۷/۵٪ شوند برای بررسی پدیده تنوع فازی در شرایط آزمایشگاه انتخاب شدند. این ۱۲ جدایه باکتریایی بر روی محیط‌های SA و KB کشت داده شدند و در هفت جدایه باکتریایی Um141، Um11، Um138، Um70، Um115، UmCHN5 و *Pseudomonas fluorescens* F113 کلونی‌هایی با مورفولوژی متفاوت مشاهده گردید. نتایج بررسی پدیده تنوع فازی در این جدایه‌های باکتریایی طی کلونیزاسیون ریزوسفر هم در شرایط سترون و هم در حضور قارچ بیمارگر *Ggt* نشان داد که تنوع فازی در این هفت جدایه باکتریایی طی کلونیزاسیون ریزوسفر رخ داده و باکتری‌ها توانستند خود را با شرایط متفاوت رشدی ریشه سازگار نموده و به انتهای ریشه برسانند. مقایسه جمعیت باکتریایی در قسمت‌های مختلف ریشه در این آزمایش حاکی از آن بود که بیشترین جمعیت در قسمت انتهایی ریشه وجود داشت. نتایج بررسی پدیده تنوع فازی در حضور قارچ بیمارگر *Ggt* نیز گویای این مطلب بود که این پدیده توانایی کاهش بیماری پاخوره گندم را دارا می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس‌های فلورسنت، تنوع فازی، کلونیزاسیون، گندم، *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

مقدمه

Dybvig (1993) زیرجمعیت‌های ایجاد شده در سودوموناس‌های فلورسنت را ناشی از نوترکیبی پدیده‌ای به نام تنوع فازی دانست. تنوع فازی باکتریایی تفکیک یک جمعیت به زیرجمعیت‌هایی با تفاوت‌های ژنوتیپی و فنوتیپی است (Henderson *et al*., 1999). تنوع فازی، که اغلب در باکتری‌های گرم منفی به اثبات رسیده است، فرایندی برگشت‌پذیر[1] است که باعث ایجاد

1. Reversible

* نویسنده مسئول: فائزه باقری تلفن: ۰۹۳۷-۵۹۵۲۵۸۰ E-mail: faezeh1504@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

تغییرات فنوتیپی با فراوانی بالا توسط جهش‌هایی[1] در DNA، بازآرایی[2] DNA و تغییر[3] در DNA می‌شود (Saunders *et al*., 2003). تنوع فازی باکتری‌ها در نیچ‌های اکولوژیکی ناهمگنی[4] رخ می‌دهد که با سازگاری باکتری در محیط‌های مختلف مرتبط است (Rainey & Travisano, 1998). مزیت اصلی تنوع فازی این است که به واسطه تغییر در بیان صفات یا به وسیله تفاوت در ویژگی‌هایی از این صفات باعث بقای میکروارگانیسم‌ها شده و آنها را قادر به سازگاری با شرایط مختلف محیطی و تغییرات ناگهانی اکوسیستم می‌سازد (Saunders, 1994; Craig & Scherf, 2003). تنوع فازی به عنوان یک سیستم تنظیمی می‌تواند در تغییر برخی از خصوصیات باکتری مؤثر باشد. به طور مثال این پدیده باعث تغییر طول تاژک[5] در *Salmonella* spp. (Nicholson & Low, 2000) تنوع فیمبریا[6] در *Escherichia colia* (Abraham *et al*., 1985) و تنوع آنتی ژن‌های سطحی در *Neisseria* sp. می‌گردد (Banerjee *et al*., 1998). در جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens* F113 نیز تنوع فازی موجب افزایش طول تاژک و تغییر در متابولیت‌های ثانویه شده و در نتیجه باعث افزایش قدرت کلونیزه‌کنندگی این جدایه می‌شود (Maria Sanchez *et al*., 2001; van den Broek *et al*., 2005). مکانیسم تنوع فازی در باکتری‌های سودوموناس هنوز به درستی شناخته نشده است (Weiser *et al*., 1998). آنچه که تا کنون در این رابطه می دانیم این است که آنزیم‌های Site-specific recombinases که بوسیله ژن‌های *sss* و *xerD* کد می‌شوند نقش مهمی در تنوع فازی در سودوموناس‌های فلورسنت دارند (Maria Sanchez *et al*., 2001; Martinez-Granero *et al*., 2005). این آنزیم‌ها که موجب نوترکیبی و در نتیجه تنوع فازی می‌گردند، باکتری را قادر به ایجاد زیرجمعیت‌های مختلف و در نتیجه کلونیزاسیون بهتر قسمت‌های مختلف ریشه می‌نمایند (Martinez-Granero *et al*., 2005).

تنوع فازی در سودوموناس‌های فلورسنت طی فرایند کلونیزاسیون ریشه پدید می‌آید که موجب پیدایش کلونی‌هایی با مورفولوژی متفاوت می‌شود. این کلونی‌ها زیرجمعیت‌هایی هستند که به باکتری اجازه می‌دهند در شرایط محیطی متفاوت مقداری از جمعیت خود را حفظ نموده و ریشه را کلونیزه کنند (Saunders *et al*., 2003). در تحقیقی پیرامون تنوع فازی که با استفاده از جدایه باکتریایی *Pseudomonas fluorescens* F113 و بر روی گیاه یونجه انجام شد، شاهد تنوع مورفولوژیکی در کلونی‌های به دست آمده بودند. به طوری که در کلونی‌های به دست آمده طی کلونیزاسیون ریشه واریانت‌هایی با کلونی‌های متفاوت، به نام‌های C، F و S، به دست آمدند (Maria Sanchez *et al*., 2001). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که رفتار بیوکنترل سودوموناس‌های فلورسنت با توانایی تنوع فازی آنها طی کلونیزاسیون ریزوسفر ارتباط مستقیم دارد. وجود مواد غنی در ریزوسفر این محیط را به یک محیط ناهمگن و رقابتی تبدیل می‌سازد. میکروارگانیسم‌ها برای اینکه بتوانند در این محیط استقرار یابند به دنبال ایجاد ویژگی‌هایی هستند که قدرت رقابت و میزان رشد و بقایشان را افزایش دهد (Lynch, 1990; Lugtenberg *et al*., 2002). بیماری پاخوره گندم یکی از مهمترین بیماری‌های پوسیدگی ریشه در تیره گندمیان در اکثر نقاط گندم کاری جهان به شمار می‌رود (Rovira & Wildermuth, 1981). عامل این بیماری قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* می‌باشد. بنا به اهمیت این بیماری در تحقیق حاضر قارچ *Ggt* به عنوان عامل بیمارگر انتخاب گردید و مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این تحقیق دستیابی به اهمیت پدیده تنوع فازی در کلونیزاسیون و قدرت بیوکنترل در جدایه‌های بومی از سودوموناس‌های فلورسنت می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و انتخاب جدایه‌های باکتریایی

از میان ۳۰۰ جدایه باکتریایی جداسازی شده از مزارع گندم استان خراسان (رضوی، شمالی و جنوبی)،

1. Mutation
2. Reorganisation
3. Modification
4. Heterogeneous
5. Flagalla
6. Fimbriae

Archive of SID

www.SID.ir

۱۳۰ جدایه متعلق به گونه سودوموناس‌های فلورسنت براساس کلیدهای شناسایی جکس (۱۹۹۴) و بوسیس (۱۹۹۵) و نیز روش بویسیس و همکاران به ترتیب تست رنگدانه فلورسنت، تست گرم، تست آرژنین، تست اکسیداز، تست فوق حساسیت به توتون و تست متابولیسم اکسیداتیو (O/F) شناخته شدند (Bossis *et al.*, 2000). این جدایه‌های باکتریایی مورد آزمون هاله بازدارندگی قرار گرفتند (Hagedorn *et al.*, 1989). نتایج این آزمون برای انجام آزمایش گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت (گلدان‌های ۸۰۰ گرمی، خاک شنی- لومی، دامنه دمایی ۲۸-۲۰ درجه سلسیوس، ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی). این آزمایش برای ۲۵ تیمار، در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از برداشت گیاهچه‌های گندم درصد سیاه شدگی طوقه بررسی گردید. بر اساس درصد نکروزه شدن ریشه‌ها و طوقه‌ها شدت بیماری بین ۵-۰ به شرح ذیل تعیین شد (Ownley *et al.*, 2003).

ریشه‌ها و طوقه‌ها بدون لکه نکروزه= ۰، ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه فاقد علائم= ۱، ریشه دارای لکه‌های ممتد نکروزه (نکروزه شدن بیشتر از ۲۵٪ و کمتر از ۵۰٪ ریشه‌ها) و طوقه بدون علائم= ۲، نکروزه شدن بیشتر از ۵۰٪ ریشه‌ها و سیاه شدگی طوقه= ۳، ریشه‌ها تقریباً سیاه رنگ با توسعه ۷۵٪ سیاه‌شدگی طوقه= ۴، ریشه و طوقه سیاه و سبز خشکیدگی گیاه= ۵.

درصد شدت بیماری پس از چهار هفته طبق فرمول زیر برآورد گردید:

$$\%\ DI = \frac{\sum_{i=1}^{n=1} (\text{مقیاس آلودگی} \times \text{تعداد گیاهچه‌های بیمار})}{\text{۵} \times \text{تعداد کل گیاهچه‌ها}} \times ۱۰۰$$

(مخرج کسر در فرمول فوق حداکثر مقیاس آلودگی × تعدادگیاهچه‌های کشت شده می‌باشد) (Ownley *et al.*, 2003)

بررسی تنوع فازی در شرایط آزمایشگاه

برای بررسی تنوع فازی در شرایط آزمایشگاه به طور همزمان از دو روش ون در بروک و همکاران (۲۰۰۵) و سانچز و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. مطابق روش ون در بروک و همکاران جدایه‌ها بر روی محیط KB[1] و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند (van den Broek *et al.*, 2005). طبق روش سانچز و همکاران برای بررسی تنوع فازی از محیط SA (Sucrose; 20.0g/L, L-Asparagine; 2.0g/L, K_2HPO_4; 1.0g/L, $MgSO_4.7H_2O$; 0.5g/L, pH 7) استفاده شد. در این روش ابتدا جدایه‌ها در محیط مایع SA به مدت یک هفته داخل شیکرانکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در ۱۲۰ دور در دقیقه کشت داده شدند، سپس به محیط جامد SA انتقال یافته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شدند (Maria Sanchez *et al.*, 2001) و در نهایت براساس تفاوت در مرفولوژی و رنگ کلونی‌ها وجود تنوع فازی تشخیص داده شد و برای اطمینان از صحت آزمایش، کلونی‌های متفاوت مشاهده شده (تفاوت‌های مرفولوژی و رنگ کلونی‌ها) را به طور جداگانه مجدداً در همان دو محیط KB و SA به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شدند.

تهیه موتان‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین

به منظور ردیابی جدایه‌های مورد نظر، با استفاده از آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (محیط KB) اقدام به تهیه موتان‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شد. ابتدا تک پرگنه‌های حاصل از محیط کشت‌های تازه باکتری‌ها مرحله به مرحله وارد غلظت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۵، ۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین شد، سپس جدایه‌هایی که در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام از این آنتی‌بیوتیک قادر به رشد بودند، انتخاب شدند. برای تثبیت موتان‌های مورد نظر، ابتدا تک پرگنه‌های حاصل از محیط کشت‌های تازه (با غلظت ۱۰۰پی‌پی‌ام) از آنتی‌بیوتیک فوق را روی محیط‌های KB مایع رشد داده و سپس به مدت دو هفته، هر روز یک میلی‌لیتر از محیط‌های کینگ‌بی مایع حاوی باکتری‌ها را به محیط‌های کینگ‌بی مایع جدید انتقال و بر روی شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. طی این مدت هر بار باکتری‌های رشد یافته روی محیط‌های KB را در

[1] . IQJ ¶%

Archive of SID

www.SID.ir

محیط‌های حاوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام کشت داده تا از قدرت رشد آنها اطمینان حاصل شود. بعد از دو هفته مجدداً روی محیط‌های آنتی‌بیوتیک‌دار کشت و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک انتخاب شدند. این عمل دو بار تکرار شد. این موتان‌ها برای بررسی کلونیزاسیون مورد آزمایش قرار گرفتند (Glandorf, 1992).

روش آغشته‌سازی بذر با باکتری‌های آنتاگونیست

بذرهای گندم رقم زمستانه الوند (تهیه شده از مؤسسه تحقیقات طرق مشهد) به مدت ۲ دقیقه در الکل اتانول ۷۰٪ و سپس به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱٪ ضدعفونی سطحی شده سپس چهار بار با آب مقطر سترون شستشو شدند تا هیپوکلریت سدیم از آنها زدوده شود. در این مرحله به منظور آغشته‌سازی بذرها به جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته هر جدایه آنتاگونیست باکتریایی روی محیط KB به ارلن های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل و سوسپانسیونی تهیه گردید (OD ۰/۱=۵۴۶ (۴/۵×۱۰^{۹} cfu/cc)). جهت آغشته‌سازی بذرهای گندم به باکتری‌های آنتاگونیست، کربوکسی‌متیل‌سلولز به نسبت ۰/۵٪ به سوسپانسیون‌ها افزوده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در مایه تلقیح قرار داده و زیر هود خشک گردید (Ownley *et al.*, 2003). بذرهای مورد استفاده به عنوان شاهد منفی بدون قارچ و بدون باکتری و به عنوان شاهد مثبت با قارچ و بدون باکتری در نظر گرفته شدند.

آزمایش‌های کلونیزاسیون ریزوسفر

این آزمایش هم در شرایط سترون (غیاب قارچ) و هم در حضور قارچ بیمارگر *Ggt* انجام شد. برای بررسی الگوی توزیع کلونی‌ها در نواحی مختلف ریشه در شرایط سترون مطابق روش Maria Sanchez *et al.* (2001) عمل شد. در این روش از لوله‌های مخصوصی (کرایو) که در قسمت انتهایی دارای مخزن آب بودند استفاده شد. در مرحله اول پرلیت به عنوان ماده جامد و محلول غذایی هوگلند به عنوان ماده معدنی درون لوله‌ها ریخته شدند و درب لوله‌ها با استفاده از پنبه بسته شد. آنگاه به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس بذور مایه‌زنی شده با جمعیت ۴/۵× ۱۰^{۹} cfu/cc سلول باکتری در درون لوله‌ها کاشته شدند، در هر لوله یک عدد بذر قرار گرفت. مقداری آب به هریک از لوله‌ها اضافه گردید. آب موجود در قسمت انتهای لوله‌ها رطوبت مورد نیاز رشد گیاه را در طول آزمایش فراهم نمود. پس از سه هفته، ریشه‌ها از درون لوله‌ها خارج شدند و پس از شستشوی سطحی، ریشه‌ها به سه قسمت تقسیم شدند: ناحیه بالایی تا جایی که ریشه‌های ثانویه شروع می‌شود، قسمت مرکزی که شامل ریشه‌های ثانویه است و قسمت انتهایی. سپس جمعیت هر کدام از قسمت‌های ریشه به طور جداگانه تعیین گردید. این آزمایش برای هشت تیمار در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای انجام آزمایش در حضور قارچ بیمارگر *Ggt* از کشت گلخانه‌ای مطابق روش Thomashow & Weller (1988) استفاده شد. پس از چهار هفته درصد بازدارندگی هر کدام از تیمارها طبق فرمول درصد شدت بیماری محاسبه گردید. سپس طبق روش Maria Sanchez *et al.* (2001) جمعیت باکتری‌ها در هر کدام از قسمت‌های ریشه به طور جداگانه تعیین گردید.

محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن ($P\leq$۰/۰۵) و با استفاده از نرم‌افزارهای 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 عددی $\sqrt{x+0/5}$ استفاده گردید.

نتایج

جدایه‌های انتخاب شده

از میان ۱۳۰ جدایه باکتریایی سودوموناس فلورسنت که مورد تست هاله بازدارندگی قرار گرفتند ۲۴ جدایه که هاله بازدارندگی بین ۱۴/۶۷-۳ میلی‌متر داشتند به همراه جدایه باکتریایی *Pseudomonas fluorescens CHA89* (موتانت gacA) که کمترین هاله بازدارندگی را ایجاد کرده بود برای آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند. در آزمایش گلخانه‌ای که در حضور قارچ بیمارگر *Ggt* انجام گرفت ۱۲ جدایه باکتریایی Um141، 2- *P. fluorescens* 79 (از دانشگاه لوزان سوئیس)، UTPF4 (از کلکسیون

Archive of SID

www.SID.ir

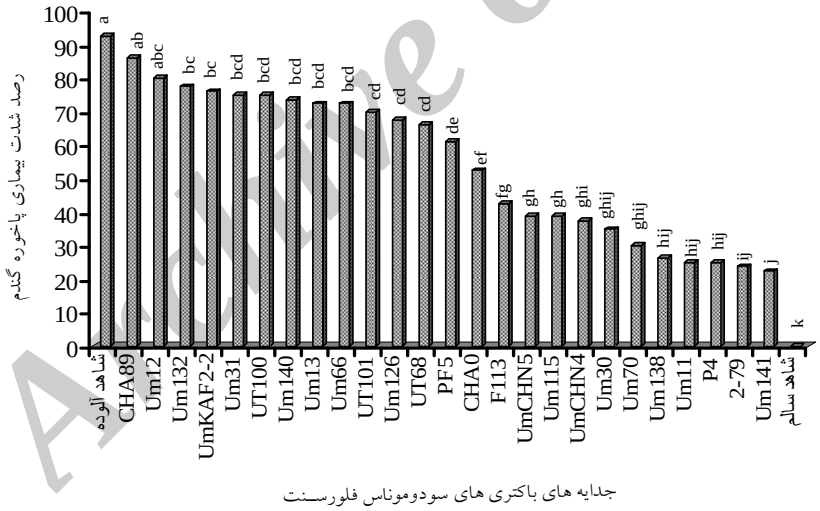
دانشگاه تهران)، Um11، Um138، Um70، Um30، UmCHN4، Um115، UmCHN5، *P. fluorescens* F113 (از دانشگاه لوزان سوئیس) و *P. fluorescens* CHA0 (از دانشگاه لوزان سوئیس) که موفق به کاهش بیماری پاخوره گندم شده بودند در کنار جدایه CHA89 که کمترین اثر بازدارندگی را در مقابل این بیماری داشت، برای بررسی تنوع فازی به آزمایشگاه برده شدند (شکل ۱).

نتایج بررسی پدیده تنوع فازی در شرایط آزمایشگاه

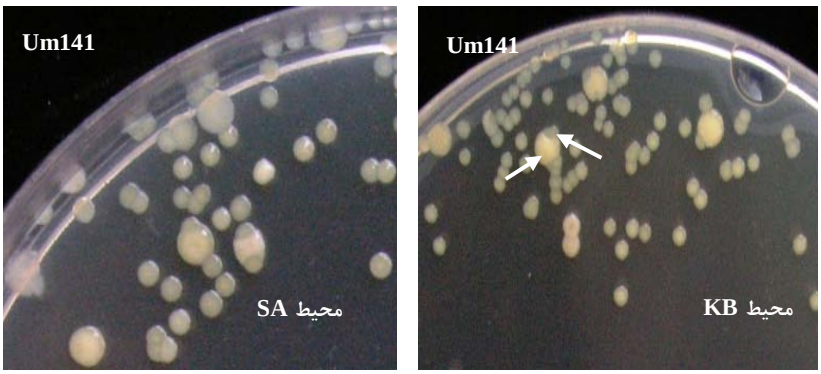
پس از کشت ۴۸ ساعته ۱۳ جدایه باکتریایی سودوموناس فلورسنت در محیط KB در هفت جدایه کلونی‌های متفاوتی از نظر تفاوت در مرفولوژی و رنگ که نشان‌دهنده وجود تنوع فازی هستند، مشاهده گردید در مورد جدایه CHA89 این کلونی‌ها دیده نشدند. در محیط جامد SA نیز پس از ۴۸ ساعت کشت، نتایج مشابه محیط KB به دست آمد (شکل۲). پس از کشت مجدد کلونی‌های متفاوت مشاهده شده به طور جداگانه نیز همان کلونی‌ها بار دیگر دیده شدند (از نظر تفاوت در مرفولوژی و رنگ) و به این ترتیب صحت آزمایش تأیید گردید. در پایان این مرحله جدایه‌های Um141، Um11، Um138، Um70، Um115، UmCHN5 به همراه جدایه باکتریایی F113 از دانشگاه لوزان سوئیس به عنوان شاهد مثبت و جدایه CHA89 از دانشگاه لوزان سوئیس (که ضعیف‌ترین عملکرد را طی مراحل تحقیق داشت برای مقایسه با دیگر جدایه‌ها) مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج بررسی الگوی توزیع کلونی‌ها

با مقایسه میانگین لگاریتم‌های به دست آمده از تعداد باکتری‌ها بر روی قسمت‌های مختلف ریشه گندم در تمامی جدایه‌های باکتریایی و در شرایط کاملاً سترون، مشخص گردید که بیشترین تجمع باکتریایی به ترتیب مربوط به قسمت انتهایی ریشه، قسمت میانی و ناحیه بالایی ریشه بود (شکل۳).



شکل ۱- بررسی اثر جدایه های *P. fluorescens* در کاهش میزان بیماری ناشی از قارچ *Ggt*



شکل ۲- وجود تنوع فازی در محیط کشت های SA و KB

Archive of SID

www.SID.ir

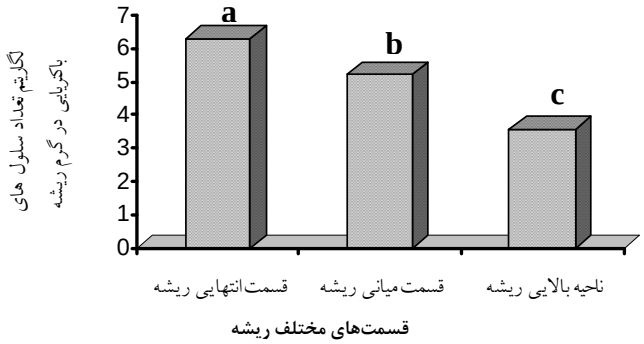
پس از کشت چهار هفته‌ای گیاه گندم در گلخانه و در حضور قارچ بیمارگر *Ggt*، مقایسه توانایی کلونیزاسیون هریک از جدایه‌های باکتریایی (شکل۴) با درصد شدت بیماری پاخوره گندم (شکل۵) نشان داد که ضریب همبستگی بین میزان کلونیزاسیون در سه قسمت ریشه(ناحیه بالایی ریشه، قسمت میانی ریشه، قسمت انتهایی ریشه) و شاخص کاهش شدت بیماری به ترتیب ۰/۷۹۸۸-، ۰/۸۹۴۴-، ۰/۹۳۲۹- است به این معنی که احتمالاً با توجه به این پژوهش بین توانایی کلونیزاسیون و کاهش شدت بیماری ارتباط مستقیم وجود دارد به نحوی که میانگین جمعیت سلول های باکتریایی در سه قسمت ریشه (جدول۱) در جدایه Um141 که از توانایی بازدارندگی به میزان ۷۸/۷۵٪ در برابر بیماری پاخوره گندم برخوردار بود بیش از سایر جدایه‌ها است در حالی که کمترین میانگین جمعیت سلول‌های باکتریایی در سه قسمت ریشه متعلق به جدایه CHA89 بود که کم ترین بازدارندگی را به میزان ۱۳/۷۵٪ در کنترل این بیماری نشان داده بود. همچنین مقایسه میانگین‌های به دست آمده از سه قسمت ریشه در هر جدایه به طور مستقل نیز نشان داد که در تمامی جدایه‌ها (به جز جدایه CHA89) میزان کلونیزه‌کنندگی در قسمت انتهایی ریشه بیشتر و در ناحیه ابتدایی کمتر بود. با این تفاوت که در جدایه‌هایی که از توانایی کلونیزه کنندگی بهتری برخوردار بودند شدت تجمع باکتری در قسمت‌های مختلف ریشه بیش از جدایه‌هایی بود که توانایی کلونیزه‌کنندگی پایین تری داشتند بنابراین از این حیث نیز میان باکتری‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

بحث

میکروارگانیسم‌ها برای حفظ بقای خود در محیط رقابتی ریزوسفر استراتژی‌های مختلفی را در واکنش و سازگاری به تغییرات محیطی دارند (مثل تغییرات فنوتیپی). تغییر برخی ساختارها به باکتری‌ها این امکان

جدول ۱- مقایسه میانگین جمعیت باکتریایی در قسمت‌های مختلف ریشه گندم در حضور قارچ بیمارگر *Ggt*

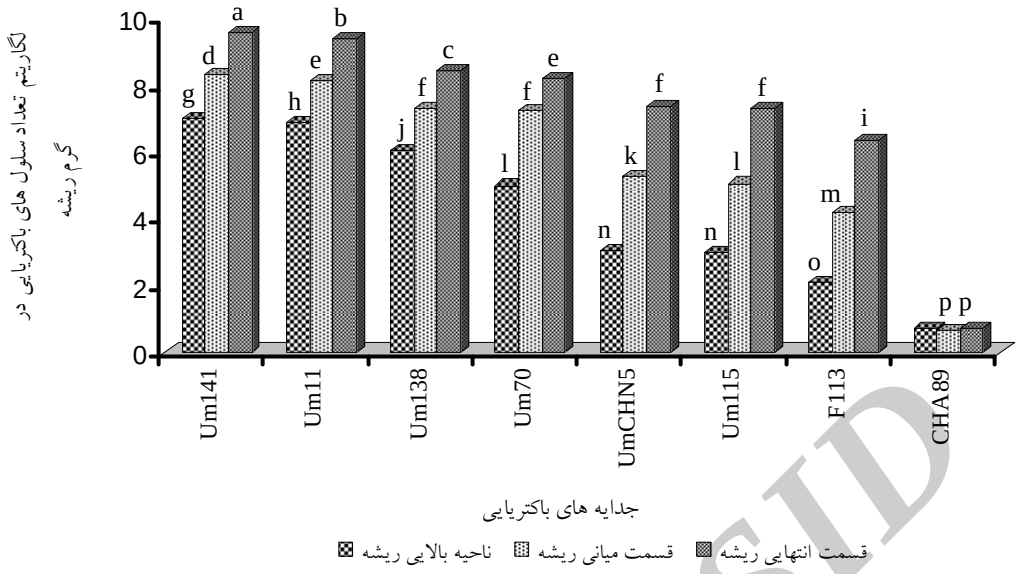
جدایه‌های باکتریایی	میانگین جمعیت باکتری در قسمت انتهایی ریشه	میانگین جمعیت باکتری در قسمت میانی ریشه	میانگین جمعیت باکتری در ناحیه بالایی ریشه
Um141	$۳/۶\times۱۰^{۹}$	۲×۱۰^{۸}	$۱/۰۲۵\times۱۰^{۷}$
Um11	$۲/۶۲۵\times۱۰^{۹}$	$۱/۳۲۵\times۱۰^{۸}$	$۷/۷۵\times۱۰^{۶}$
Um138	$۲/۷\times۱۰^{۸}$	$۲/۰۵\times۱۰^{۷}$	$۱/۱\times۱۰^{۶}$
Um70	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	$۱/۸\times۱۰^{۷}$	۱×۱۰^{۵}
UmCHN5	$۲/۳۷۵\times۱۰^{۷}$	$۱/۹۵\times۱۰^{۵}$	$۱/۲\times۱۰^{۳}$
Um115	$۲/۱\times۱۰^{۷}$	$۱/۱۵\times۱۰^{۵}$	$۱/۰۲۵\times۱۰^{۳}$
F113	$۲/۱۵\times۱۰^{۶}$	$۱/۵۲۵\times۱۰^{۴}$	$۱/۳۵\times۱۰^{۲}$
CHA89	$۱/۵\times۱۰^{۱}$	$۱/۲۵\times۱۰^{۱}$	$۱/۵\times۱۰^{۱}$



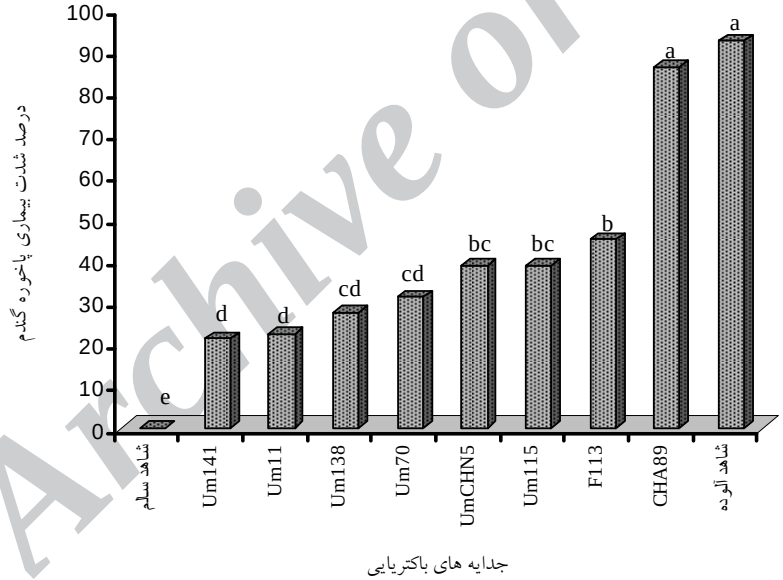
شکل۳- الگوی توزیع باکتری در قسمت‌های مختلف ریشه

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- الگوی توزیع کلونی‌ها بر روی قسمت‌های مختلف ریشه در حضور قارچ بیمارگر *Ggt*



شکل ۵- درصد شدت بیماری پاخوره گندم در جدایه های باکتریایی سودوموناس فلورسنت

را می‌دهد که جایگاه‌های اکولوژیکی جدیدی را کلونیزه نمایند و در برابر واکنش‌های دفاعی میزبان در امان بمانند (Craig & Scherf, 2003). سودوموناس‌های فلورسنت به عنوان عوامل بیوکنترل مؤثر در مقابل بیمارگرهای خاکزاد مورد توجه بسیاری می‌باشند (Gamalero *et al.*, 2004). یکی از ویژگی‌های مهم سودوموناس‌های فلورسنت قدرت و توانایی آنها در ایجاد تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه می‌باشد. پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که رفتار بیوکنترل سودوموناس‌های فلورسنت با توانایی تنوع فازی آنها طی کلونیزاسیون ریشه ارتباط مستقیم دارد (Dekkers, 1997).

در این تحقیق طبق نتایج به دست آمده ۱۲ جدایه باکتریایی سودوموناس فلورسنت که از سطح بازدارندگی بالایی در برابر بیماری پاخوره گندم بهره مند بودند در کنار جدایه CHA89، که کمترین اثر را در کاهش بیماری داشت، برای بررسی قابلیت تنوع فازی سودوموناس‌های فلورسنت انتخاب شدند. از بین این ۱۲ جدایه باکتریایی، در هفت جدایه Um141، Um11،

Archive of SID
www.SID.ir

Um138، Um70، Um115، UmCHN5 و F113 کلونی‌های متفاوتی که نشانه وجود تنوع فازی بودند دیده شد. در جدایه CHA89 چنین کلونی‌هایی دیده نشد.

نتایج به دست آمده از بررسی الگوی توزیع کلونی‌ها در قسمت‌های مختلف ریشه در هفت جدایه باکتریایی در شرایط آزمایشگاه نشان داد که باکتری در تمام قسمت‌های ریشه وجود داشت و بیشترین میزان جمعیت در هر هفت جدایه در قسمت انتهایی ریشه بود در حالی که کمترین میزان جمعیت در ناحیه بالایی ریشه دیده شد. کلونی‌های به دست آمده از قسمت‌های مختلف ریشه با کلونی‌های حاصل از کشت آزمایشگاهی کاملاً شباهت داشتند بنابراین می‌توان گفت که تنوع فازی طی کلونیزاسیون ریشه رخ داده و باکتری توانسته خود را با شرایط متفاوت رشدی ریشه سازگار نماید.

یکی از عوامل مؤثر در میزان کلونیزاسیون ریشه حضور عامل بیمارگر می‌باشد. وجود بیمارگر به عنوان یک فاکتور محیطی زنده می‌تواند توانایی کلونیزاسیون یک آنتاگونیست را تحت تأثیر قرار دهد. بیمارگرها با اثر گذاشتن بر روی گیاهان، در کلونیزاسیون ریشه دخالت دارند، چرا که قادر به تغییر ترشحات ریشه میزبان از لحاظ کمی و کیفی هستند (Duffy & Defago, 1997). ارزیابی تنوع فازی طی کلونیزاسیون و ارتباط آن با کاهش بیماری در این پژوهش مشخص کرد که در جدایه‌های Um141، Um11، Um138، Um70، Um115، UmCHN5 و F113 قدرت بازدارندگی در برابر قارچ بیمارگر *Ggt* به ترتیب عبارت بود از ۷۸/۷۵٪، ۷۷/۵٪، ۷۲/۵٪، ۶۸/۷۵٪، ۶۱/۲۵٪، ۶۱/۲۵٪، ۵۵٪، در مقابل، در جدایه CHA89 میزان بازدارندگی ۱۳/۷۵٪ بود. همانطور که می‌دانیم سیستم دو جزئی GacS/GacA از مهمترین سیستم‌های تنظیمی در باکتری‌های گرم منفی به خصوص سودوموناس‌های فلورسنت می‌باشد، چون این سیستم تولید متابولیت‌های باکتریایی و فاکتورهای دخیل در کلونیزاسیون را تنظیم می‌کند (Dekkers, 1997). در نتیجه موتاسیون در یکی از ژن‌های *gacA* و *gacS* می‌تواند در کاهش میزان کلونیزاسیون و میزان بیوکنترل تأثیر قابل توجهی داشته باشد که در نتیجه در پژوهش حاضر مشخص گردید. 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.

در مطالعات بسیاری رابطه مستقیم بین میزان جمعیت باکتری روی ریشه و کنترل بیماری به اثبات رسیده است (Weller, 1983). مطالعه جمعیت باکتری‌ها بر روی گیاهان نشان‌دهنده این مطلب است که سودوموناس‌های فلورسنت می‌توانند به طور وسیعی در طول ریشه گیاهان توزیع گردند. هنگامی که بذرها با عوامل بیوکنترل مایه‌زنی می‌گردند، موفقیت عوامل بیوکنترل به استقرار آنها بر روی و در امتداد ریشه در حال رشد بستگی دارد. آنها به وسیله حرکت در طول ریشه می‌توانند با جمعیت‌های میکروبی واقع در خاک به رقابت بپردازند (Parke, 1991). کلونیزاسیون موفق زمانی است که باکتری پس از قرار گرفتن روی بذر بتواند خود را به انتهای ریشه برساند و این ناحیه را کلونیزه نماید (Lugtenberg *et al*., 2001; De Weert & Bloemberg, 2006). در این تحقیق الگوی توزیع کلونی‌ها در هفت جدایه Um141، Um11، Um138، Um70، Um115، UmCHN5 و F113 و در سه قسمت ریشه گیاه گندم پس از آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان از آن داشت که بیشترین میزان کلونیزاسیون در این هفت جدایه مربوط به قسمت انتهایی ریشه بود از طرفی مقایسه میانگین جمعیت باکتری در سه قسمت ریشه در هر جدایه با جدایه CHA89 تأیید کرد که این جدایه‌های باکتریایی قادر به سازگاری با شرایط متفاوت رشدی ریشه و حرکت به سمت قسمت انتهایی ریشه و کلونیزه نمودن آن می‌باشند.

REFERENCES

1. Abraham, J. M., Freitag, C. S., Clements, J. R. & Eisenstein, B. I. (1985). An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. In: Proceedings of the *National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 5724-5727.
2. Banerjee, A., Wang, R., Uljon, S. N., Rice, P. A., Gotschlich, E. C. & Stein, D. C. (1998). Identification of the gene (*lgtG*) encoding the lipooligosaccharide beta chain synthesizing glucosyl transferase from

Archive of SID

www.SID.ir

Neisseria gonorrhoeae. In: Proceedings of the *National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 10872-10877.
3. Bossis, E., Lemanceau, Ph., Latour, X. & Gardan, L. (2000). The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 20, 51-63.
4. Craig, A. & Scherf, A. (2003). *Antigenic variation*. Academic Press Elsevier, Amsterdam. 443P.
5. De Weert, S. & Blomberg, G. V. (2006). Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocotrar. In: S. Gnanamanikam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria*. (Pp. 317-333). Springer.
6. Dekkers, L. C. (1997). *Isolation and characterization of novel rhizosphere colonization mutants of Pseudomonas fluorescens*. Ph. D. dissertation, WCS365. Leiden University. The Netherlands.
7. Duffy, B. K. & Defago, G. (1997). Zinc improves biocontrol of *Fusarium* crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87, 1250-1257.
8. Dybvig, K. (1993). DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, 10, 465-471.
9. Gamalero, E., Lingua, G., Capri, F. G., Fusconi, A., Berta, G. & Lemanceau, P. (2004). Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescens, confocal and scanning electronmicroscopy. *FEMS Microbiology Ecology*, 48, 79-87.
10. Glandorf, D. C. M., Brand, I., Bakker, P. A. H. M. & 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.
11. Hagedron, C., Gould, W. D. & Bardinelli, T. R. (1989). Rhizobacteria of cotton and their reprression of seedling disease pathogens. *Journal of Microbiology*, 55, 2793-2797.
12. Henderson, I. R., Owen, P. & Nataro, J. P. (1999). Molecular switches-the ON and OFF of bacterial phase variation. *Molecular Microbiology*, 33, 919-932.
13. Lugtenberg, B. J. J., Chin-A-Woeng, T. F. C. & Bloemberg, G. V. (2002). Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 81, 373-383.
14. Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L. C. & Bloemberg, G. V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas. Annual Review of Phytopathology*, 39, 461-490.
15. Lynch, J. M. (1990). The rhizosphere. In: J. M. Lynch (Ed.), *the rhizosphere*. Wiley, Chichester, pp 59-97.
16. Martinez-Granero, F., Capdevila, S., Sanchez-Contreras, M., Martin, M. & Rivilla, R. (2005). Two site specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 151, 975-983.
17. Nicholson, B. & Low, D. (2000). DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*, 35, 728-742.
18. Ownley, B. H., Duffy, B. K. & 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.
19. Parke, J. L. (1991). Root colonization by indigenous and introduced microorganisms. In: D. L. Keister & Cregan, P. B. (Eds.), *the Rhizosphere and Plant Growth*, (pp. 33-42). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
20. Rainey, P. B. & Travisano, M. (1998). Adaptive radiation in heterogeneous environment. *Nature*, 394, 69-72.
21. Rovira, A. D. & Wildermuth, G. B. (1981). The nature and mechanisms of suppression. In: M. J. C. Asher and P. Shipton, (Eds.), *Biology and control of take-all*. (pp. 385-415). Academic Press, London.
22. Sánchez-Contreras, M., Martin, M., Villacieros, M. & O'Gara, F. (2001). Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, 184, 1587-1596.
23. Saunders, J. R. (1994). Population genetics of phase variable antigens. In: S. Bamberg, J. P. Young, E. M. Welling and J. R. Saunders (Eds.), *Population genetics of bacteria*. (pp. 247-268). Cambridge University Press. New York.
24. Saunders, N. J., Moxon, E. R. & Gravenor, M. B. (2003). Mutation rates: estimating phase variation rates when fitness differences are present and their impact on population structure. *Microbiology*, 149, 485-495.
25. Thomashow, L. S. & 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.
26. van den Broek, D., Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. J. (2005). The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environmental microbiology*, 7, 1686-1697.

Archive of SID

www.SID.ir

27. Weiser, J. N., Goldberg, J. B., Pan, N., Wilson, L. & Virji, M. (1998). The phosphorylcholine epitope undergoes phase variation on a 43- kilodalton protein in *Pseudomonas aeruginosa* and on pili of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity*, 66, 4263-4267.
28. Weller, D. M. (1983). Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*, 73, 1548-1553.

Archive of SID

www.SID.ir