مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۴، شماره ۱، ۱۳۹۲ (۱۸۲-۱۷۳)

ارزیابی الگوی کلونیزاسیون ریشه گندم در کنترل بیولوژیک بیماری پاخوره توسط سودوموناس‌های فلورسنت

نجمه حاج عبدالهی[۱]، حمید روحانی[۲*]، عصمت مهدی خانی مقدم[۳] و ابراهیم بهنام[۱]
۱، ۲ و۳ دانشجویان کارشناسی ارشد، استاد و دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۵ - تاریخ تصویب: ۹۲/۷/۳)

چکیده

سودموناس‌های فلورسنت با تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی و قابلیت بالای کلونیزاسیون ریشه در زمان و مکان مناسب، به عنوان کارآمدترین عوامل بیوکنترل برای بیماری‌های ریشه شناخته می‌شوند. در این تحقیق الگوی کلونیزاسیون چهار استرین از Pseudomonas fluorescens در زمان‌های ۵، ۱۲ و ۲۱ روز پس از کاشت بذور آغشته به استرین‌ها در گلدان‌های ۸۰۰ گرمی حاوی مخلوطی از خاک باغبانی و ۸٪ اینوکولوم Gaeumannomyces graminis var. tritici (Ggt) عامل بیماری پاخوره، بررسی و جمعیت باکتری‌ها در سه ناحیه بالائی، میانی و انتهایی ریشه‌ی گیاه گندم بر اساس شمارش colony forming unit (cfu) تعیین شد و رابطه آماری الگوی کلونیزاسیون ریشه با ایندکس بیماری پاخوره مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نتایج حاصله نشان داد که جمعیت باکتری‌ها در زمان‌ها و نواحی مختلف ریشه متفاوت است. در اولین زمان نمونه‌برداری جمعیت باکتری در ناحیه بالایی و میانی ریشه بالاتر بود، در حالی که در سومین زمان جمعیت باکتری در نواحی بالایی و میانی کاهش و در ناحیه انتهایی ریشه افزایش یافت. رابطه بین الگوی کلونیزاسیون و شاخص بیماری نشان داد جمعیت باکتری به طور معنی‌داری روی کاهش شدت بیماری اثر دارد و بیشترین تاثیر جمعیت باکتری در کاهش شدت بیماری برای نوک ریشه مشاهده شد (r^2=۹۹,۶۰). به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که قابلیت کلونیزاسیون بهتر و موثرتر انتهای ریشه بوسیله چهار جدایه مورد استفاده ارتباط نزدیکی با توانایی آنها در کنترل بیماری پاخوره دارد و این امر نقش کلیدی در کنترل موفق بیماری به وسیله جدایه‌ها ایفا می‌کند.

واژه‌های کلیدی: Pseudomonas fluorescens ، کلونیزاسیون نواحی مختلف ریشه، جمعیت باکتری، Gaeumannomyces graminis var. tritici

مقدمه

بیماری پاخوره گندم، در اثرقارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici (Ggt)* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در سرتاسر جهان است. از علائم بارز این بیماری سیاه‌شدگی ریشه‌هاست که ممکن است از همان مراحل اولیه رشد گیاهچه‌ای خود را نشان دهد (Clarkson & Polley, 1981).

* نویسنده مسئول: حمید روحانی تلفن: ۰۹۱۳۲۹۱۴۹۵۸ E-mail: hrouhani@yahoo.com

گیاهان ممکن است در هر مرحله رشدی آلوده و کلنیزه شوند (Huber & McCay-Buis, 1993). آلودگی اولیه‌ی ریشه‌های اصلی گیاهچه‌های گندم زمستانه کاشته شده در پاییز با رشد هیف‌های تیره‌ی رونده روی سطح ریشه اتفاق می‌افتد.

انشعابات هیالاین ایجاد شده از این هیف‌های رونده با حمله قرار دادن کورتکس به داخل ریشه نفوذ می‌کنند و سپس بافت‌های آوندی را کلنیزه و تخریب می‌نمایند(Freeman & Ward, 2004). کنترل بیولوژیک بیماری پاخوره به طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته و محققان به این نتیجه رسیده‌اند که کنترل بیولوژیک می‌تواند از جمله انتخاب‌های مناسب برای کنترل این بیماری باشد (Liu *et al*., 2011). با این حال ناپایداری کنترل بیولوژیک و متغیر بودن اثرات آن در شرایط طبیعی از چالش‌های مهم این روش از کنترل به شمار می‌رود که این امر بیشتر به علت نبود اطلاعات دقیق در مورد رفتار عامل بیوکنترل و رابطه متقابل آن با گیاه و شرایط رقابتی موجود در خاک است (Schippers *et al*., 1987). مطالعات زیادی که در یکی دو دهه اخیر روی سودوموناس‌های فلورسنت به عمل آمده نشان داده که دلیل موفقیت نسبی آنها در کنترل بیولوژیک برخورداری از ویژگی‌هایی نظیر کلونیزاسیون کارآمد و موثر ریزوسفر(فراریشه)، سازش‌پذیری با شرایط در حال تغیر ریشه در اثر پدیده تنوع فازی، وجود حس‌گرهای محیطی (سیستم gac) در آنها، ایجاد بیوفیلم در سطح ریشه و محافظت موثر از نفوذ پاتوژن، تولید دامنه وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی ، تولید تنظیم‌کننده‌ها و محرکین رشد، تحریک سیستم دفاعی گیاه وکوتاه بودن نسبی زمان نسل است. در بین عوامل ذکر شده قابلیت کلونیزاسیون موثر و بلند مدت ریشه از اصلی‌ترین عوامل به شمار می‌رود (Weller, 1988)، زیرا اثرات بیوکنترلی عوامل بیوکنترل اعم از اثرات مستقیم آنها روی عامل بیماری ویا اثرات غیرمستقیم آنها که تحت تاثیر ردو بدل شدن سیگنال‌های بین ریشه و عامل بیوکنترل می‌باشد بدون دخالت خاک اطراف ریشه منجر به اثرات بهتری روی القاء مقاومت و تحریک سیستم دفاعی گیاه می‌گردد. بنابراین کلونیزاسیون ریشه و الگوی فضائی آن را می‌توان از کلیدی‌ترین فاکتورهای موثر در موفقیت نسبی بیشتر سودموناس‌های فلورسنت به شمار آورد. به همین دلیل در طی سال‌های گذشته مطالعات زیادی با هدف گسترش دانش ما پیرامون ویژگی‌هایی از باکتری‌ها که منجر به افزایش رقابت ریزوسفری می‌شوند و به تثبیت هر چه بیشتر و سریع‌تر آنها در منطقه ریزوسفر کمک می‌کنند، انجام شده است (Van Overbeek *et al*., 1995; Lugtenberg *et al*., 2001). توزیع، وسعت و سرعت پراکندگی باکتری‌ها بر روی ریشه احتمالا نقش کلیدی در کنترل پاتوژن و بیماری حاصل از آن ایفا می‌کند. هم‌چنین به نظر می‌رسد از آنجایی که حداقل بخشی از مقاومت سیستمیک القایی به ویژگی‌های الیسیتورهای باکتریایی نسبت داده می شود، تماس نزدیک باکتری‌ها با سلول‌های گیاه میزبان ضروری باشد(Gamalero et al., 2004). سیستم ریشه طیف وسیعی از مواد ارگانیک را در طول رشد گیاه (زمان) و برای مکان‌های خاصی در روی سیستم ریشه، آزاد می‌کند (Duineveld & Van Veen, 1999). از آنجایی که تعداد سلول‌های باکتری‌های تلقیح شده در طول محور یک ریشه تغییر می‌کند (Buddrus et al., 2010) بنابراین انتظار می‌رود کلونیزاسیون ریشه به وسیله‌ی باکتری‌های تلقیح شده بر حسب نواحی مختلف ریشه تغییر کند. ترکیبات ترشح شده از ریشه برای رشد باکتری‌ها و باقی‌ماندن آن‌ها در یک حالت رقابتی بر روی سیستم ریشه بسیار مهم‌اند. از طرفی برای جذب شیمیایی به طرف ریشه باکتری‌ها بایستی که متحرک باشند. تحرک نیازمند استفاده از فلاژل است. در بعضی از باکتری‌ها تولید فلاژل به وسیله آنزیم‌های site-specific recombinase تنظیم می‌شود (Dekkers et al., 1999). آنزیم‌های site-specific recombinase نقش مهمی در تنوع فازی در سودوموناس‌های فلورسنت دارند (Sanchez-Contreras et al., 2001; Martinez-Granero et al., 2005) که به وسیله ژن‌های sss و xerD کد می‌شوند (Lugtenberg et al., 1997; Martinez-Granero et al., 2005). این آنزیم‌ها که موجب نوترکیبی و در نتیجه تنوع فازی می‌گردند، باکتری را قادر به ایجاد زیرجمعیت‌های مختلف می‌نمایند. به وجود آوردن زیرجمعیت‌ها در باکتری

سبب تعدیل تغییرات محیطی ناگهانی(Dekkers et al. 1999) و در نتیجه کلونیزاسیون بهتر قسمت‌های مختلف ریشه می‌شود (keel & Defago, 1997). سیستم gac شامل ژن‌های gacA و gacS به عنوان هدف برای آنزیم‌های site-specific recombinase هستند (Martinez-Granero et al., 2005) و به عنوان حس‌گرهای محیطی نقش تعیین‌کننده‌ای در الگوی کلونیزاسیون ریشه و به کاراندازی سیستم حدنصاب[1](QS) آنها دارند. هدف این مطالعه بررسی کلونیزاسیون مکانی- زمانی ریزوسفر ریشه‌ی گندم به وسیله‌ی چهار استرین F141، F138، F70 و CHA89 از سودوموناس‌های فلورسنت و ارتباط آن با قابلیت بیوکنترلی استرین‌های ذکر شده روی بیماری پاخوره در اثر Ggt بوده است.

مواد و روش‌ها

انتخاب جدایه قارچ و آماده سازی اینوکلوم

در این تحقیق قارچ (Ggt) Gaeumannomyces graminis var. tritici جدایه T-41 استفاده گردید که از مرکز اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شده بود. اینوکلوم این قارچ روی مخلوط ۱۰۰گرم ارزن و ۱۰۰ گرم ماسه دو بار اتوکلاو شده بمدت ۳۰ روز در دمای ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد تهیه و در زیر هود استریل خشک و مورد استفاده قرار گرفت.

انتخاب جدایه‌های باکتریایی و آماده‌سازی اینوکلوم

سه جدایه‌ی F141 ، F138 ، F70 Pseudomonas fluorescens جداشده از ریزوسفر گندم با قابلیت بیوکنترل بالا روی بیماری پاخوره گندم و دارای تنوع فازی و تولید بیوفیلم، همراه با موتانت CHA89 (موتانت gacA فاقد حس‌گرهای محیطی) به عنوان شاهد منفی از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد و آقای دکتر احمدزاده _ دانشگاه تهران _ تهیه شدند. از هر استرین سوسپانسیونی با رقت $۴/۵\times۱۰^{۹}$ cfu/ml در آب مقطر استریل حاوی ۱٪ کربوکسی متیل سلولز تهیه شد. به منظور ضدعفونی بذور گندم زمستانه رقم گاسکوژن به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم ۱٪ قرار داده شدند. پس از چند مرحله شستشو با آب مقطر و خشک کردن آنها زیر هود استریل، بذرها آماده آغشته‌سازی با باکتری گردیدند. سپس بذرها به مدت نیم ساعت در سوسپانسیون تهیه شده از هر استرین شیک شدند (Ownley et al., 2003). پس از خشک شدن، بذور در گلدانهای ۸۰۰گرمی حاوی خاک استریل مخلوط شده با ۸٪ اینوکولوم قارچ Ggt کاشته و در گلخانه با دمای ۳± ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Thomashow & weller, 1988). برای جلوگیری از جا به جا شدن باکتری‌ها بوسیله جریان آب، در ته گلدان‌ها که دارای سوراخ های متعددی بود مقداری پرلیت ریخته شد و هر گلدان در تشتک جداگانه‌ای که حاوی آب بود قرار داده شد. آبیاری گلدان‌ها هر دو روز یکبار صورت می‌گرفت. دو تیمار شاهد آلوده (دارای قارچ و بدون باکتری) و شاهد سالم (بدون قارچ و باکتری) نیز در نظر گرفته شد و در مجموع با شش تیمار (چهار جدایه باکتریایی، شاهد سالم، شاهد آلوده) و چهار تکرار از هر تیمار آزمایش انجام شد.

بررسی الگوی توزیع کلونی باکتری‌ها در نواحی مختلف ریشه و اثر آن روی پاخوره گندم

در این بررسی در بازه های زمانی ۵، ۱۲ و ۲۱ روز پس از کاشت، بوته‌ها به دقت از خاک خارج و به شدت تکان داده شد تا خاک اضافی اطراف ریشه‌ها جدا گردد. ریشه‌های باقی مانده و خاک چسبیده به آنها (۲-۱ میلی‌متری منطقه ریزوسفر) به سه قسمت تقسیم شدند: ۱- ناحیه بالایی شامل ریشه بین بذر تا جایی که ریشه‌های ثانویه شروع می‌شود(A)۲- قسمت مرکزی که شامل منطقه ریشه‌های ثانویه است(B) و ۳- قسمت انتهایی(C).

سپس جمعیت هر کدام از قسمت‌های ریشه به طور جداگانه با انجام سری رقت برای هر تکرار مشخص گردید. باکتری‌های کشت داده شده روی محیط KB (فاقد هرگونه آنتی‌بیوتیک و قارچکش) درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از آن کلنی‌های به دست آمده شمارش گردیدند. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تیمار و چهار تکرار انجام و به صورت فاکتوریل آنالیز شد. شدت بیماری بر اساس میزان نکروز و سیاه

1. *Quorum sensing*

شدن ریشه‌ها در نمونه‌های برداشت شده مربوط به ۲۱ روز بعد از کاشت، و روش نمره‌دهی(Ownley et . (2003 alبین ۵-۰ به شرح ذیل تعیین شد:

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

درصد بیوکنترلی استرین‌ها روی بیماری پاخوره در بوته‌های ۲۱روزه با استفاده از فرمول‌های ۲ـ۱ و ۲ـ۲ محاسبه گردید.

فرمول ۲ـ۱:

$$\text{درصدشدت بیماری} = \sum_{i=1}^{n=1} \frac{(\text{تعداد گیاهچه های تیمار})}{\text{۵×تعداد کل گیاهچه های}} \times 100$$

فرمول ۲ـ۲:

درصد شدت بیماری در شاهد آلوده= درصد نسبی کاهش بیماری

درصد شاخص بیماری در تیمار ـ

محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین صفات به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن ($P \leq ۰/۰۵$) و با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS9.1 و JMP4 انجام گرفت.

نتایج

الگوی مکانی- زمانی پراکندگی استرین‌های باکتریایی در ریزوسفر و ریزوپلان ریشه گندم

بررسی تغییرات مکانی- زمانی جمعیت‌های باکتریایی بر طبق نواحی مختلف ریشه و در بازه‌های زمانی ۵، ۱۲و ۲۱ روز پس از کاشت در حضور قارچ Ggt نشان داد که در تمامی جدایه‌ها در زمان اول نمونه برداری (روز پنجم) بیشترین تجمع باکتریایی مربوط به ناحیه بالایی (A) وکمترین مقدار تراکم جمعیت باکتری نیز متعلق به ناحیه انتهایی ریشه بود (C). اما به تدریج و با گذشت زمان از جمعیت باکتری در ناحیه A و B کاسته شد و جمعیت در ناحیه C افزایش یافت(شکل۱). جمعیت استرین F141 در حضور قارچ بیمارگر Ggt در زمان اول نمونه‌برداری در نواحی بالایی، میانی و انتهایی ریشه به ترتیب برابر با ۸/۴۸، ۸/۴۲ و ۵/۹۸ log cfu/gr ریشه بود. (جدول ۱).

در زمان دوم نمونه برداری جمعیت در قسمت قاعده‌ی ریشه و قسمت میانی کاهش و در قسمت انتهایی افزایش یافت و جمعیت در نواحی بالایی، میانی و انتهایی ریشه به ترتیب به ۷/۱۳، ۸/۳۵ و ۸/۴۶ log cfu/gr ریشه تغییر پیدا کرد. این تغییرات جمعیت در زمان سوم افزایش بیشتری نشان داد به گونه‌ای که ناحیه انتهایی ریشه بیشترین جمعیت باکتری را به خود اختصاص داد و جمعیت در نواحی بالایی، میانی و انتهایی ریشه به ترتیب ۶,۹۳ ، ۸,۱۷ و ۹,۵۵ log cfu/gr ریشه تعیین شد.

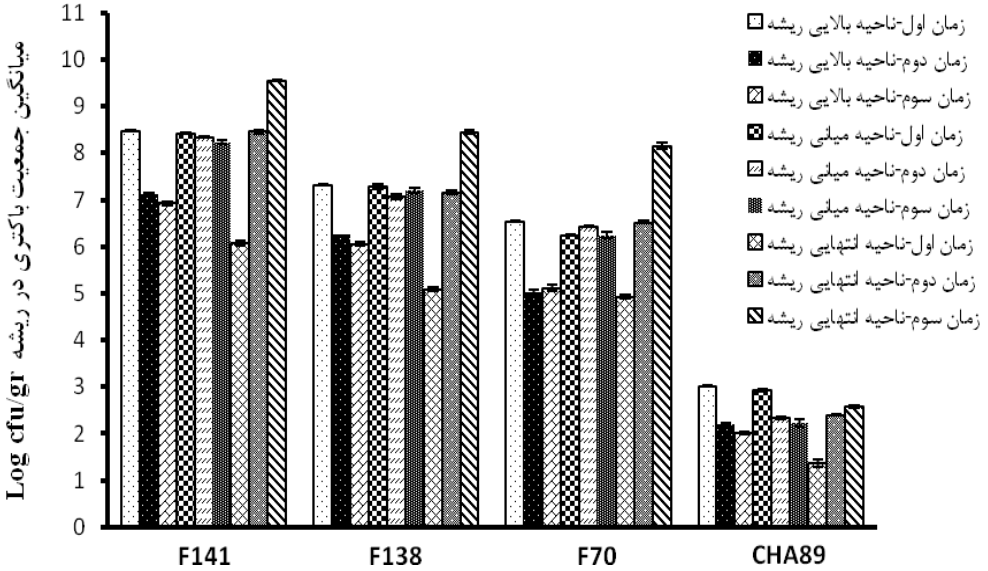
در این میان استرین F141 در مقایسه با سایر استرین‌ها قادر بود نوک ریشه را با شدت بیشتری کلونیزه نماید. پس از آن به ترتیب استرین‌های F138 و F70 بهترین عملکرد را در کلونیزه کردن ریشه داشتند. ضعیف‌ترین عملکرد نیز متعلق به استرین CHA89 بود(شکل ۴).

اثر جدایه‌های P. fluorescens در کاهش بیماری پاخوره گندم ناشی از قارچ Ggt در شرایط گلخانه

بررسی اثر استرین‌های باکتریایی در خاک آلوده به قارچ Ggt نشان داد که هیچ یک از جدایه‌ها نتوانستند به طور کامل از ایجاد بیماری جلوگیری نمایند، اما در مقایسه با شاهد آلوده باعث کاهش شدت بیماری در اندازه‌های متفاوت شدند (شکل۲). همانگونه که در شکل۳ دیده می‌شود، بهترین تأثیر مربوط به جدایه‌هایF141 و F138 می باشد که به ترتیب به میزان ۷۵ و ۷۰/۳ درصد باعث کاهش بیماری نسبت به شاهد آلوده گردیدند.

هم‌چنین مقایسه توانایی کلونیزاسیون هریک از جدایه‌های باکتریایی با درصد شدت بیماری پاخوره گندم نشان داد که بین توانایی کلونیزاسیون وکاهش شدت بیماری ارتباط مستقیم وجود دارد. میانگین جمعیت سلول‌های باکتریایی در سه قسمت ریشه در جدایه F141 که از توانایی بازدارندگی به میزان ۷۵٪ در برابر بیماری پاخوره گندم برخوردار بود بیش از سایر جدایه‌ها بود در حالی که کمترین میانگین جمعیت سلول‌های باکتریایی در سه قسمت ریشه متعلق بود به جدایه

CHA89 که کمترین بازدارندگی را به میزان ۵٫۵۹٪ در کنترل این بیماری نشان داده بود.



شکل ۱- تغییرات جمعیت استرین‌های P.fluorescens در هر گرم ریشه گندم در زمان‌های ۵، ۱۲ و ۲۱ روز پس از کاشت

جدول ۱- گروه‌بندی تغییرات جمعیت استرین‌های P.fluorescens در هر گرم ریشه گندم در زمان‌های ۵، ۱۲ و ۲۱ روز پس از کاشت

تیمار	میانگین جمعیت باکتری در هر گرم ریشه	گروه‌بندی در سطح ۵٪	تیمار	میانگین جمعیت باکتری در هر گرم ریشه	گروه‌بندی در سطح ۵٪
A3B3C1	*9.55*	*A*	*A1B2C2*	*6.26*	*I*
A1B1C1	*8.48*	*B*	*A2B1C3*	*6.25*	*I*
A3B2C1	*8.46*	*B*	*A2B3C3*	*6.24*	*I*
A3B3C2	*8.44*	*B*	*A1B3C2*	*6.05*	*J*
A2B1C1	*8.42*	*B*	*A3B1C1*	*5.98*	*J*
A2B2C1	*8.35*	*B*	*A1B3C3*	*5.11*	*K*
A2B3C1	*8.17*	*C*	*A3B1C2*	*5.09*	*K*
A3B3C3	*8.16*	*C*	*A1B2C3*	*5.03*	*KL*
A1B1C2	*7.32*	*D*	*A3B1C3*	*4.93*	*L*
A2B1C2	*7.28*	*DE*	*A1B1C4*	*3.02*	*M*
A2B3C2	*7.21*	*DEF*	*A2B1C4*	*2.93*	*M*
A3B2C2	*7.16*	*EF*	*A3B3C4*	*2.58*	*N*
A1B2C1	*7.13*	*EF*	*A3B2C4*	*2.40*	*O*
A2B2C2	*7.07*	*FG*	*A2B2C4*	*2.33*	*OP*
A1B3C1	*6.93*	*G*	*A2B3C4*	*2.24*	*P*
A1B1C3	*6.55*	*H*	*A1B2C4*	*2.21*	*P*
A3B2C3	*6.52*		*A1B3C4*	*2.01*	*Q*
A2B2C3	*6.44*	*H*	*A3B1C4*	*1.38*	*R*
		H			

- گروه بندی بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن درسطح P≤ ۰/۰۵ محاسبه شده ، هر عدد میانگین ۴ تکرار است
- ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح P≤ ۰/۰۵ هستند
- Coefficient of variation: 1.74

A: نواحی مختلف ریشه (A1: ناحیه ابتدایی ریشه، A2: ناحیه میانی ریشه، A3: ناحیه انتهایی ریشه)

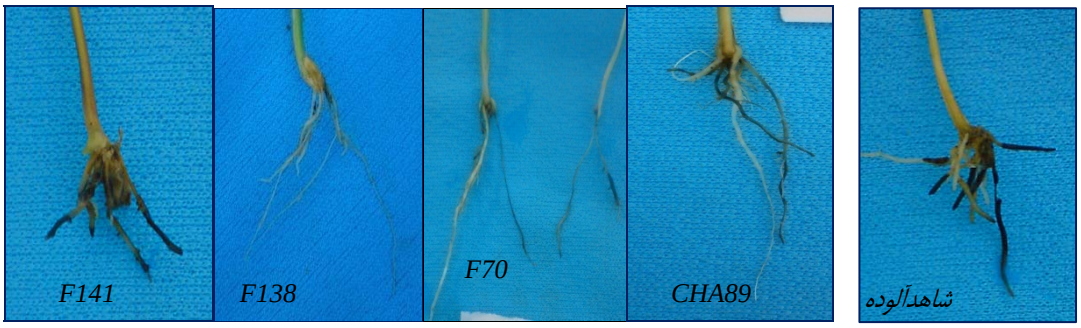
B: زمان(B1: روز پنجم، B2: روز دوازدهم، B3: روز بیست و یکم)

C: استرین‌های باکتریایی(C1: استرین F141، C2 : استرین F138، C3: استرین F70، C4: استرین CHA89)

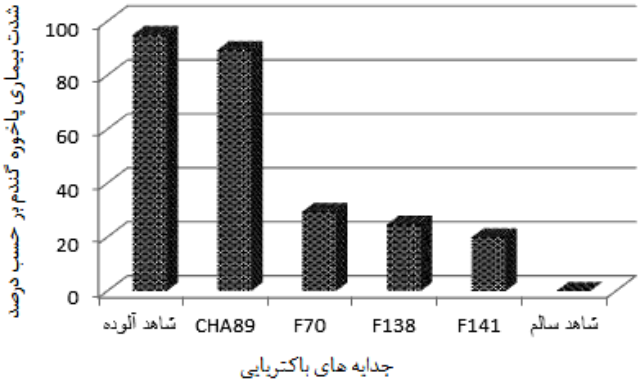
بررسی اثر میـــزان بـــازدارندگی بیمـــاری توسط استرین‌های P.fluorescens در نواحی مختلف ریشه

همانطور که در جدول۲ دیده می‌شود تاثیر جمعیت جدایه‌ها در کاهش شدت بیماری برای ناحیه انتهایی ریشه نسبت به سایر نواحی بیشتر بود(۹۹٫۶٪). این امر بیانگر اهمیت ارتباط بین کلونیزاسیون قسمت‌های مختلف ریشه به وسیله‌ی باکتری‌های آنتاگونیست و توانایی این استرین‌ها در کنترل بیماری است به عبارتی

هرچه جمعیت باکتری در ناحیه انتهایی ریشه بیشتر باشد درصد کنترل بیماری به وسیله استرین باکتریایی نیز بالاتر است که نشان دهنده تاثیر مستقیم و اثرگذار کلنیزاسیون قسمت انتهایی ریشه در کنترل بیماری است.



شکل ۲– تاثیر جدایه‌های P.fluorescens در کاهش علایم بیماری پاخوره در مقایسه با شاهد آلوده



شکل ۳- اثر جدایه‌های P.fluorescens در کاهش شدت بیماری پاخوره گندم در اثر Ggt

جدول ۲- ضرایب تبیین بین میزان بازدارندگی بیماری به وسیله استرین‌های P.fluorescens و نواحی مختلف ریشه

	ناحیه ابتدایی ریشه	ناحیه میانی ریشه	ناحیه انتهایی ریشه
درصد بیوکنترل	۰,۹۷۲۲ *	۰,۹۸۲۳ *	۰,۹۹۶۰ *

*معنی‌دار بودن در سطح ۵٪

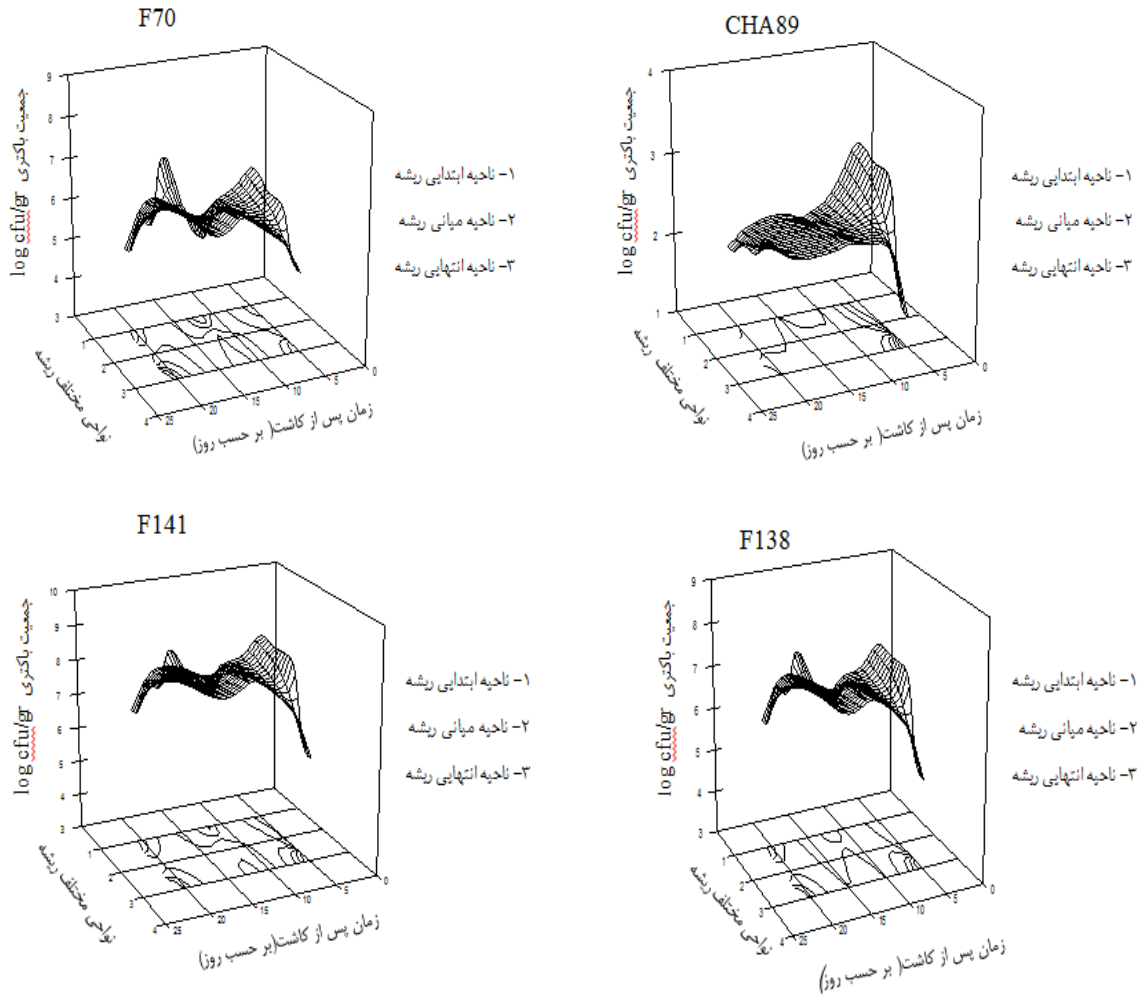
بحث

سودوموناس‌های فلورسنت به عنوان یک عامل بالقوه برای کنترل بیماری‌های خاکزاد مورد توجه بسیاری از محققان می‌باشند. بعضی استرین‌های سودوموناس فلورسنت به کار برده شده به صورت تیمار بذر، به طور موثری بیماری را در شرایط کنترل شده کاهش می‌دهند اما کارآیی آنها می‌تواند در شرایط مزرعه متغیر باشد. به نظر می‌رسد دلیل این تغییرات تفاوت در توانایی کلونیزاسیون استرین‌های باکتریایی در محیط رقابتی و شرایط مختلف محیطی باشد (Chapon et al. 2002.).

طبق نظر Lugtenberg و Dekkers (۱۹۹۹) کلونیزاسیون موفق رایزوسفر توسط باکتری‌ها زمانی است که باکتری پس از قرار گرفتن بر روی بذر به مدت چند هفته در حضور میکروفلور بومی خاک پایدار بماند و بتواند خود را به انتهای ریشه بذر در حال جوانه‌زنی برساند. بنابراین انتظار می‌رود پراکنش باکتریایی در

طول سیستم یک ریشه بر حسب مکان و زمان تغییر کند (Gamalero et al., 2004) .

در این تحقیق در ناحیه A ریشه با گذشت زمان جمعیت باکتری کاهش یافت که این امر می‌تواند مربوط به تغییرات فیزیولوژیکی در این ناحیه و تفاوت در مقدار و ترکیب مواد ترشح شده به داخل ریزوسفر باشد. نواحی از ریشه که ترشحات بیشتری دارند شامل نوک ریشه، در مجاورت مریستم نوک ریشه، ناحیه طویل شدن و ناحیه توسعه ریشه‌های موئین اصلی، جانبی و ریشه‌های نابه‌جا می‌باشد (Schroth & Snyder, 1961; Schroth & Cook, 1964; Schotzko & O'Keeffe, 1989; Pierson et al., 1994). به هر حال در مطالعه‌ی ما نیز بیشترین تجمع سودوموناس‌های فلورسنت در رایزوسفر در همان نواحی گزارش شده برای ترشحات بیشتر، یافت شد.



شکل ۴- پراکنش مکانی- زمانی استرین های P.fluorescens روی ریشه گندم در حضور قارچ بیمارگر Ggt

در تحقیق ما استرین F141 در مقایسه با سایر استرین‌ها قادر بود نوک ریشه را بهتر کلونیزه نماید. هم چنین این استرین بالاترین میزان کنترل کنندگی بیماری پاخوره (۷۵٪ کاهش بیماری) را در بین تمامی استرین‌ها در مقایسه با شاهد آلوده داشت. بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کلونیزاسیون سرتاسری ریشه به ویژه ناحیه نزدیک به نوک ریشه احتمالا یک فاکتور بسیار مهم در توانایی استرین‌های باکتریایی برای کنترل G.graminis var.tritici است. چرا که Weller (1984) بیان می‌دارد سلول‌های باکتریایی که نواحی نزدیک به نوک ریشه را کلونیزه می‌کنند قادرند به محض کلونیزه نمودن ریشه به وسیله‌ی قارچ عامل

پاخوره جلوی آن را بگیرند. این تماس زود هنگام بین باکتری و قارچ احتمالا باعث کاهش تعداد و اندازه لکه‌ها می‌شود. در عوض یک استرین باکتریایی که فقط چند سانتی‌متر از طول ریشه را کلونیزه می‌کند زمانی با قارچ مواجه خواهد شد که کلونیزاسیون ثانویه به وسیله‌ی هیف‌های رونده شروع و قارچ بر روی لکه‌های نزدیک به نوک ریشه مستقر شده است.

احتمالا این قبیل استرین‌ها اثرات کمتری در سرکوبی پاخوره دارند. استرین F138 و F70 نیز به ترتیب به میزان ۷۰/۳٪ و ۶۵/۵۹٪ قادر به کنترل بیماری بودند. با مقایسه میانگین جمعیت این دو استرین درمی‌یابیم که استرین F138 که بیماری را در مقایسه با F70 بهتر کنترل می‌نماید نوک ریشه را نیز با شدت بیشتری کلونیزه نموده و میانگین جمعیت باکتری نیز در تمامی قسمت‌ها بیشتر از استرین F70 است. در مقابل استرین CHA89 که فاقد سیستم gacA است پائین‌ترین میزان کلونیزه کنندگی و کنترل بیماری را در مقایسه با شاهد آلوده دارد. gacA یکی از اجزای سیستم دو جزئی پروتئینی gacS/gacA است. gacS به عنوان یک حسگر محیطی عمل می‌کند و gacA یک پروتئین تنظیم کننده عمومی با گستره وسیع است. ژن تنظیم کننده‌ی gacA به طور کلی تولید آنتی‌بیوتیک را کنترل می‌کند و برای کنترل بیماری ضروری است.

هم چنین این ژن تولید پروتئازهای خارج سلولی و فسفولیپاز را تنظیم می‌کند. بنابراین موتانت‌های gacA فاقد آنتی‌بیوتیک و برخی از اگزوآنزیم‌ها هستند (Natsch, 1994). هم‌چنین این استرین به دلیل از کار افتادن سیستم gac آن فاقد تنوع فازی است زیرا از آنجایی که سیستم gac یک تنظیم کننده عمومی محسوب می‌شود در تنظیم بیان ژن sss و در نتیجه تنوع فازی نیز دخالت دارد (Martinez- Granero et al., 2005). همگی این عوامل می‌تواند دلیلی برای عدم کنترل موفق بیماری در استرین CHA89 باشد.

تنوع فازی به وسیله‌ی فاکتورهای محیطی تنظیم می‌شود و در گونه‌های سودوموناس طیف وسیعی از ویژگی‌ها را تنظیم می‌کند و تشکیل بیوفیلم، کلونیزاسیون ریشه و تولید متابولیت‌های ثانویه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Van den Broek, 2005). از آنجایی که استرین‌های به کار رفته در این تحقیق قادر به ایجاد تنوع فازی می‌باشند توانسته‌اند با ایجاد زیر جمعیت‌های گوناگون، خود را با شرایط محیطی متفاوتی که در حین رشد ریشه ایجاد می‌شود وفق دهند و با کلونیزاسیون موفق نوک ریشه، فعالیت عامل بیماری را محدود نمایند.

سیستم Quroum sensing(QS) یا سیگنال رسانی بین‌سلولی یکی از مکانیزم‌های تنظیمی است که مشخص شده در بسیاری از گونه‌ها نقش مهم هماهنگ کننده را در تشکیل بیوفیلم بازی می‌کند (Irie & Parsek, 2008). یا به عبارت دیگر، مسیرهای سیگنال رسانی وابسته به تراکم سلولی بیان ژن‌های اختصاصی بیوفیلم را تنظیم خواهند نمود. بیوفیلم‌ها برای بقای باکتریایی روی گیاه، کلونیزاسیون گیاهان و نیز بقای پاتوژن‌ها در خارج از میزبان مهم می‌باشند. در اینجا نیز هرچه یک استرین ریشه را با شدت بیشتری کلونیزه نموده و در تشکیل بیوفیلم موفق‌تر بوده عامل بیماری را نیز بهتر کنترل کرده است.

در این تحقیق شمارش کلنی‌ها بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت KB برای شمارش باکتری‌های موجود در ریزوسفر استفاده شد. تعداد باکتری‌های ریزوسفر اغلب به وسیله‌ی شمارش واحدهای تشکیل دهنده‌ی کلنی(CFU) بر روی پلیت‌های دارای آگار اندازه‌گیری می‌شود. این روش تعداد باکتری‌ها را نسبت به تعداد واقعی کمتر تخمین می‌زند زیرا فقط ۱۰٪-۱ باکتری‌های موجود در خاک قابل کشت‌اند (Duineveld & Van Veen, 1999) و تجمع سلول‌ها به صورت یک تک کلنی ظاهر می‌شود (Bennet & Lynch, 1981). اما علیرغم محدودیت‌های موجود در تخمین صحیح جمعیت‌های میکروبی به وسیله‌ی رقیق‌سازی اگر این روش به طور مقایسه ای استفاده شود می‌تواند کاربرد بیشتری داشته باشد (Duineveld & Van Veen, 1999).

سپاسگزاری

با تشکر از جناب آقای دکتر احمدزاده و دوست عزیزم خانم مهندس فایزه باقری که استرین‌های باکتریایی خود را جهت انجام مطالعات و تحقیقات بیشتر در اختیار اینجانب و سایر دانشجویان قرار دادند.

REFERENCES

1. Bennet R.A. & Lynch J.M. (1981). Bacterial *g*rowth and *d*evelopment in the *r*hizosphere of *g*notobiotic *c*ereal *p*lants. **.** *Journal of General Microbiology,* 125, 95-102.
2. Buddrus-Schiemann K., Schmid M., Schreiner K., Welzl G., Hartmann A. (2010). Root colonization by *Pseudomonas sp.* DSMZ 13134 and impact on the indigenous rhizosphere bacterial community of barley. Microbial Ecology, DOI 10.1007/s00248-010-9720-8
3. Chapon A., Guillerm A., Delalande L., Lebreton L., Sarniguet A. (2002). Dominant colonisation of wheat roots by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A and selection of the indigenous microflora in the presence of the take-all fungus. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 449–459.
4. Clarkson, J. D. S. & Polley, R. W. (1981). Diagnosis, Assessment, Crop-loss Appraisal and Forecasting. In: M. J. C. Asher and P. J. Shipton (Ed.). *Biology and Control of Take-all* Academic Press, London.
5. Dekkers L.C., Phoelich C. & C., Lugtenberg J. J. (1999). Bacterial traits and genes involved in rhizosphere colonization. plant-microbe interactions. Proceedings of *the 8th International Symposium on Microbial Ecology*.9-14 Aug., Nova Scotia, Canada.
6. Duineveld B.M. & Van Veen J.A., (1999). The number of bacteria in the rhizosphere during plant development: relating colony-forming units to different reference units. *Biology and Fertility of Soils,* 28, 285–291.
7. Freeman, J. & Ward, E. (2004). *Gaeumannomyces graminis*, the take-all fungus and its relatives. Molecular Plant Pathology. 5(4), 235-252.
8. Gamalero E., Lingua G., Giusy Capri F., Fusconi A., Berta G., & Lemanceau P. (2004). Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. FEMS *Microbiology Ecology*, 48, 79–87
9. Huber, D. M. & McCay-Buis, T. S. (1993). A multiple component analysis of the take-all disease of cereals. *Plant Disease,* 77, 437-447.
10. Irie Y. & Parsek MR. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Current Topics in Microbiology and Immunology* , 322, 67-84.
11. Keel, C. & Defago, G. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanisms and ecological impact. In: Gange AC , Brown VK, (Ed.) *Multitrophic interactions in terrestrial system*. Blackwell: Oxford Science.
12. Liu B., Huang L., Kang Z., Bchenauer H. (2011). Evaluation of endophytic bacterial strains as antagonists of take-all in wheat caused by *Gaeumannomyces graminis var. tritici* in greenhouse and field. Journal of Pest Science. 84, 257–264.
13. Lugtenberg, B. J. J., Dekkers, L. C., Bansraj, M., Bloemberg, G. V., Camacho, M., Chin, T., Woeng, A., van den Hondel, K., Kravchenko, L., Kuiper, I., Lagopodi, A., Mulders, L. I., Phoelich, C., Ram, A., Tikhonovich, I., Tuinman, S., Wijffelman, C., and Wijfjies, A. (1999). *Pseudomonas* genes and traits involved in tomato root colonization, p. 9 13. In P. de Wit, T. Bisseling, and W. Stiekema (Ed.), *Biology of plant-microbe interactions. International Society for Molecular Plant- Microbe Interactions*, St. Paul, Minnesota, USA.
14. Lugtenberg B.J.J., Dekkers L. and Bloemberg G.V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas. Annual Review of Phytopathology*. 39,461–490.
15. Martinez-Granero F., Capdevila S., Sa´nchez-Contreras M., Martı´n M., Rivilla R. (2005). Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens. Microbiology*. 151,975–983. DOI 10.1099/mic.0.27583-0
16. Natsch A., Keel CH., A.Pfirter H., Haas D., Defago G.(1994). Contribution of the global regulator gene gacA to persistence and dissemination of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHAO introduced into soil microcosms. . *Applied and Environmental Microbiology*. 60(7), 2553-2560.
17. Ownley, B. H., Duffy, B. K., and Weller, D. M. (2003). Identification and *m*anipulation of soil properties to improve the biological control performance *of phenazine-producing Pseudomonas fluorescens* . *Applied and Environmental Microbiology*. 150,3333-3343.
18. Pierson L. S., III, V. D. Keppenne, and D. W. Wood. (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is regulated by PhzR in response to cell density. *Journal of Bacteriology*. 176,3966–3974.
19. Sanchez-Contreras, M., Martin, M., Villacieros, 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.

20. Schippers B., Bakker A. W., and Bakker P. A. H. M. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*. 25,339-358.
21. Schotzko D. J. & O'Keeffe L. E.. (1989). Geostatistical description of the spatial distribution of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) in lentils. *Journal of Economic Entomology*. 82,1277–1288.
22. Schroth M. N. & Snyder W. C. (1961). Effect of host exudates on chlamydospore germination of the bean root rot fungus, *Fusarium solani f.sp. phaseoli. Phytopathology* 51,389–393.
23. Schroth M. N. & Cook R. J. (1964). Seed exudation and its influence on pre-emergence damping off of bean. *Phytopathology*. 54,670–673.
24. 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.
25. Van den Broek D.(2005). *Phase variation in Pseudomonas*. PhD. thesis. Leiden University.
26. Van Overbeek L.S., Eberl L., Givskov M., Molin S. and van Elsas J.D. (1995). Survival of, and induced stress resistance in,carbon-starved *Pseudomonas fluorescens* cells residing in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 61,4202–4208.
27. Weller D.M. (1984). Distribution of a take-all suppressive strain of *Pseudomonas fluorescens* on seminal roots of winter wheat. *Applied and Environmental Microbiology*. 48(4), 897-899.
28. Weller D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. 26, 379-407.