کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۷، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۷ (۸۴-۷۵)
DOI: 10.22059/jbioc.2018.216667.169

غربال ریزوباکترهای تشکیل دهنده بیوفیلم گیاهان زراعی برای کنترل بیولوژیک *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*، عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی

فاطمه عبدلی[۱]، وحید فلاح‌زاده ممقانی[۲*] و اکبر شیرزاد[۳]
۱، ۲ و ۳. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۷/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۱)

چکیده

در این تحقیق به‌منظور به‌دست آوردن ریزوباکترهایی با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا و بررسی نقش آن‌ها در بیوکنترل *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*، ابتدا از مناطق مختلف استان‌های آذربایجان شرقی و غربی ۱۰۰ نمونه از ناحیه ریزوسفر گیاهان مختلف زراعی جمع‌آوری و ۲۱۴ جدایه باکتری با روش سری رقت جداسازی و خالص-سازی شد. جدایه‌های به دست آمده براساس میزان بازدارندگی علیه پکتوباکتریوم و توانایی تشکیل بیوفیلم در شرایط آزمایشگاهی غربالگری شدند. از ۲۱۴ جدایه مورد بررسی، ۱۳ جدایه علیه پکتوباکتریوم فعالیت آنتاگونیستی بالایی در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند و ۱۲ جدایه توانایی تشکیل بیوفیلم بالایی از خود نشان دادند. در آزمون برش‌های سیب زمینی جدایه-هایی با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا مانند G177 و G19-1 به صورت کامل از استقرار بیمارگر جلوگیری کرده و مانع ایجاد پوسیدگی نرم شدند. با این وجود در شرایط گلخانه‌ای تنها جدایه G177 بیماری را کنترل نمود و علاوه بر آن موجب افزایش رشد طولی ساقه نیز شد. به‌طور کلی نتایج به‌دست آمده نشان دهنده آن بود که تشکیل بیوفیلم به تنهایی به‌عنوان مکانیسم، مسئول بیوکنترل پکتوباکتریوم نبوده است و این فاکتور تحت تاثیر عوامل مختلف محیطی قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، پکتین، غشای نازک، کریستال ویوله.

Screening of biofilm forming rhizobacteria of field crops for biological control of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum*, the causal agent of potato soft rot

Fatemeh Abdoli [1], Vahid Fallahzadeh Mamaghani [2 *] and Akbar Shirzad [3]
1, 2 and 3. The former graduate student, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azad University of Shahid Madani, Tabriz, Iran
(Received: October 1, 2016 - Accepted: May 11, 2018)

ABSTRACT

In this research for obtaining rhizobacteria with high ability of biofilm formation and investigation of their role in biocontrol of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, 100 soil samples from East and West Azarbaijan provinces were collected and 214 bacterial isolates were isolated and purified by serial dilution method. Obtained isolates were screened based on their inhibition against *Pectobacterium* and the ability of biofilm formation under *in vitro*. Thirteen out of 214 isolates showed high antagonistic activity against *Pectobacterium* under *in vitro* condition and 12 isolates showed high ability of biofilm formation. In potato slices bioassay, isolates with high ability of biofilm formation such as G19-1 and G177 inhibited the establishment of pathogen and they prevent soft rotting. However, in greenhouse studies, only isolate G177 could reduce the disease. It increased the stem growth as well. In general, the results of this study showed that biofilm formation as a mechanism is not responsible for biocontrol of *Pectobacterium* and this factor is affected by different environmental agents.

Keywords: *Bacillus*, Pectin, Pellicle, Crystal violet.

* Corresponding author E-mail: fallahzadeh@azaruniv.edu

تازه‌های تحقیق

با توجه به اینکه تولید متابولیت‌های بازدارنده میکروبی و قابلیت کلنیزاسیون ریشه و تشکیل بیوفیلم توسط عوامل پروبیوتیک گیاهی نقش مهمی در کارایی آنها دارند، این ملاک‌ها جهت غربالگری باکتریهای جدا شده از ریزوسفر گیاهان زراعی به‌کار گرفته شدند و طی این بررسی استرینهایی جداسازی شدند که قدرت تشکیل بیوفیلم بسیار بالایی داشتند. این استرین‌ها قادر بودند که به سرعت ورقه‌های سیب زمینی را کلنیزه‌کنند و از ایجاد پوسیدگی نرم توسط پکتوباکتریوم بر روی آنها جلوگیری کنند. علاوه بر این یکی از جدایه‌های بدست آمده در شرایط گلخانه‌ای نیز به‌صورت موفقیت‌آمیزی از وقوع بیماری جلوگیری کرده و باعث افزایش رشد گیاه سیب زمینی شد.

مقدمه

باکتری‌های مختلفی از جنس‌های گوناگونی گیاه سیب زمینی را مورد حمله قرار داده و بیماری‌های مختلفی از جمله، پژمردگی باکتریایی، پوسیدگی‌نرم، ساق سیاه باکتریایی و جرب معمولی را به وجود می-آورند. بیماری پوسیدگی نرم سیب‌زمینی که توسط *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* ایجاد می‌شود می‌تواند در مزرعه و انبار به این محصول خسارت وارد کند (Perombelon and Kelman 1980, Xu and Gross 1986). این گونه دارای دامنه میزبانی نسبتاً وسیعی بوده و چون خاکزاد است، جمعیت آن در خاک‌های آلوده زیاد بوده و حتی در روی غده‌های بدون علایم بیماری، جمعیت قابل توجهی از بیمارگر وجود دارد. این باکتری سطح ریشه‌های سیب‌زمینی را کلنیزه کرده و تحت شرایط مساعد محیطی نظیر رطوبت بالا و دمای نسبتاً بالا خسارت فراوانی را وارد می‌کند (Berg *et al*. 2005, Xu and Gross 1986). کنترل این بیمارگر توسط روش‌های مختلفی انجام می‌شود از جمله تکنولوژی بذر یا به عبارتی پاستوریزاسیون غده، بهداشت زراعی و استفاده از بذرهای تایید شده، استفاده از ارقام مقاوم به *Pectobacterium carotovorum* و کاربرد سموم شیمیایی (Cronin *et al*. 1997). از آنجایی که خاک یک منبع مهم آلودگی باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی است، لذا کاشت غده‌های بذری عاری از بیمارگر در خاک‌های آلوده برای کنترل بیماری موفقیت آمیز نبوده است (Abdolghafar and Abdolsayed 1997, Grandar and Tanner 1976, Xu and Gross 1986). کاربرد ترکیبات شیمیایی برای کنترل بیماری-های گیاهی به علت ایجاد سوش‌های مقاوم باکتریایی، آلودگی محیط زیست و آسیب به سلامت انسان موفق نبوده است. با توجه به این معایب، استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای کنترل این بیمارگر و توسعه رشد گیاه رواج بیشتری یافته است. با این حال، موفقیت کنترل بیولوژیک و افزایش عملکرد بستگی به ماهیت خواص آنتاگونیستی و مکانیسم‌های عمل میکروارگانیسم-ها دارد. مکانیسم‌های عمل عوامل بیوکنترل به طور گسترده‌ای متفاوت بوده و از جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: آنتی‌بیوز، رقابت برای مواد غذایی، پارازیتیسم، القای مقاومت سیستمیک و غیره (Haas and Defago, 2005). ریزوسفر غنی از عوامل میکروبی است و ریزوباکتری‌های کلنیزه کننده ریشه، نقش برجسته‌ای در این مکان دارند. ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPR) یک گروه از باکتری‌های مرتبط با ریشه هستند که تعامل تنگاتنگی با ریشه‌های گیاهان داشته و در نتیجه در سلامت گیاه و حاصلخیزی خاک موثر هستند (Harish *et al*. 2009).

باکتری‌های افزایش دهنده رشد گیاه تاثیرات مثبتی بر پارامترهای سرعت جوانه‌زنی بذر، تحمل گیاه به خشکی و تنش شوری، افزایش وزن اندام هوایی، ریشه و مهم‌تر از همه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی دارند (Ji *et al*. 2006). تاکنون گزارش‌های متعددی مبنی بر تاثیر ریزوباکترهای مختلف جدا شده از ناحیه ریزوسفر بر روی پکتوباکتریوم شده است. سودوموناس‌های فلوروسنت و غیرفلوروسنت خاک که توسط غربالگری به دست آمدند، در شرایط آزمایشگاهی پتانسیل کنترل بیولوژیک بیماری‌های پوسیدگی نرم و ساق سیاه را نشان دادند (Kastelein *et al*. 1999). در یک تحقیق مشخص شد که *Bacillus subtilis* نسبت به سایر عوامل آنتاگونیست قدرت بیوکنترل بیشتری علیه پکتوباکتریوم داشته است (Rashid et al., 2013). مطالعات مختلف اهمیت تشکیل بیوفیلم، توسط باکتری‌های افزایش دهنده رشد در حفاظت گیاهان را نشان می‌دهند.

مطالعات انجام یافته بر روی باکتری‌های *Bacillus* spp. و *Paenibacillus* spp. نشان می‌دهند که کلنیزاسیون اندوفیتیک و تشکیل بیوفیلم کارایی فعالیت بیوکنترلی این باکتری‌ها علیه بیماری‌های گیاهی را بهبود می‌بخشند (Davey and O'tool 2000). جمعیت-هایی متشکل از یک گونه یا گونه‌های متنوع باکتری به صورت چسبیده به یکدیگر و یا به سطح زنده و غیر زنده در زمینه‌ای از پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی بیوفیلم نامیده می‌شوند. توانایی عوامل بیوکنترل برای کنترل بیماری‌های گیاهی به کلنیزاسیون سطح گیاه وابسته است. تشکیل بیوفیلم بازده کلنیزاسیون و نیز غلظت موضعی آنتی‌بیوتیک‌های اطراف ریشه‌ها را افزایش می-دهد. هدف از انجام این پژوهش، دستیابی به جدایه‌هایی از ریزوباکترهای موجود در ناحیه ریزوسفر با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا و همچنین بررسی اثر این جدایه‌ها در بیوکنترل بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی سیب-زمینی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های آنتاگونیست و تهیه بیمارگر

تعداد یکصد نمونه از ناحیه ریزوسفر گیاهان مختلف زراعی (مانند سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، خیار و ...) و از نواحی مختلف آذربایجان شرقی (مرند، هشترود، کلیبر و ...) و آذربایجان غربی (ارومیه، نقده) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای چهار درجه سلسیوس به مدت کوتاهی نگهداری شدند. جهت جداسازی جدایه‌های آنتاگونیست از محیط کشت آگار غذایی (Nutrient Agar-NA) و از روش سری رقت استفاده شد (Krzyzanowska *et al.* 2012). باکتری بیمارگر *Pectobacterium carotovorum* از کلکسیون باکتری-های گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان دریافت شد.

غربالگری جدایه‌های آنتاگونیست براساس قابلیت بازدارندگی‌شان علیه باکتری بیمارگر *Pectobacterium carotovorum*

بدین منظور از روش کاغذ صافی و از محیط کشت‌های NAو (Nutrient broth) استفاده شد. در این روش ابتدا جدایه‌های آنتاگونیست در محیط کشت NB داخل ویال‌های استریل کشت داده شده و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با ۱۲۰rpm قرار داده شدند. کاغذ صافی‌های استریل به قطر پنج میلی‌متر به جدایه‌های آنتاگونیست داخل ویال‌ها با غلظت (10^8cfu/ml) آغشته شده، سپس با استفاده از پنس استریل داخل تشتک پتری حاوی محیط کشت NA قرار داده شدند و در دمای ۲۶ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، از کشت ۱۸ ساعته باکتری بیمارگر با غلظت 10^8cfu/ml داخل تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی‌های آغشته به باکتری آنتاگونیست اسپری شده و به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه زیر هود هوا خشک شدند سپس تشتک‌های پتری ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند و نواحی عدم رشد باکتری بیمارگر اندازه‌گیری شد. این آزمون نیز در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار برای هر جدایه باکتری در نظر گرفته شد (Nguyen and Ranamukhaarachchi 2010).

غربالگری جدایه‌ها براساس قابلیت تشکیل بیوفیلم

تشکیل بیوفیلم با استفاده از پلیت‌های ۹۶ چاهکی

برای بررسی تشکیل بیوفیلم از روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله استفاده شد. ابتدا جدایه‌های آنتاگونیست در محیط کشت NB به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس با ۱۲۰rpmرشد داده شدند، سپس از هر جدایه ۲۵۰ میکرولیتر (OD_{600}=1) داخل چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی استریل، با سه بار تکرار ریخته شد و نیز برای شاهد از محیط کشت خالی NB با سه تکرار استفاده شد. پلیت الایزا به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفت. سپس محیط کشت با خالی کردن یکباره تمام چاهک‌ها حذف شده و سه بار با سرم فیزیولوژی استریل(NaCl ٪۸۵) شستشو شدند. سپس۲۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶٪ داخل هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه چاهک‌ها یکباره تخلیه شده و پلیت تا خشک شدن کامل (۲۰-۳۰ دقیقه) زیر هود قرار گرفت. ۲۰۰ میکرولیتر کریستال

ویوله یک درصد به هر چاهک اضافه شد و پس از پنج دقیقه چاهک‌ها تخلیه شدند ولی این بار تخلیه به یکباره صورت نگرفت و چاهک‌ها تک به تک تخلیه شدند، سپس پلیت به طور کامل زیر فشار آب شیر شستشو داده شد تا رنگ‌های اضافی حذف شوند در این مرحله باکتری‌های چسبیده به ته و دیواره چاهک‌ها که رنگ کریستال ویوله را به خود گرفته‌اند باقی می‌مانند. به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳ درصد اضافه شد تا رنگ جذب شده به باکتری‌های چسبیده به ته و دیواره چاهک‌ها را در خود حل کند، در نهایت جذب نوری محلول به دست آمده در طول موج ۵۹۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شد (Nagorska *et al*. 2008).

بررسی توانایی تشکیل غشای نازک (Pellicle) در پلیت‌های ۲۴تایی

در این آزمون محیط کشت LBMG (LB+0.1mM $MnSO_4$+1% glycerol) و محیط کشت حداقل MSNg(5 mM potassium phosphate buffer pH_7, 0.1 M Mops pH_7, 2mM $MgCl_2$, 0.05 mM $MnCl_2$, 1µM $ZnCl_2$, 2µM thiamine, 700 µM $CaCl_2$, 0.2% NH_4Cl, 0.5% Glycerol) (*et al*.2013 Beauregard) که به دو صورت همراه شده با پکتین ۰/۵ درصد و بدون پکتین به کار برده شد. برای انجام این بررسی از روش (Shemesh and Chai 2013) استفاده شد. ابتدا جدایه‌های مورد نظر، در محیط کشت LB مایع در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت شیکر قرار گرفت، سپس یک میلی‌لیتر از محیط کشت مورد نظر (LBMG, MSNg, MSNgp) به داخل هریک از چاهک‌های پلیت‌های ۲۴ چاهکی استریل ریخته شد و سپس چاهک‌ها با سوسپانسیون (10^6 cfu/ml) هر یک از جدایه‌ها به میزان ۱۰ میکرولیتر به ازای هر چاهک مایه‌زنی شد و پلیت به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. این آزمون برای هریک از محیط کشت‌ها به طور جداگانه با سه بار تکرار برای هر جدایه به همراه کنترل منفی انجام گرفت. پس از گذشت ۷۲ ساعت، تشکیل بیوفیلم به صورت لایه‌ای سفید تا شیری رنگ بر روی محیط کشت داخل چاهک‌ها دیده می‌شود که جدایه‌ها برحسب ضخامت و چین‌و چروک لایه‌های تشکیل شده از هم تفکیک می‌شوند.

بررسی قابلیت جدایه‌ها در بازدارندگی از پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی توسط باکتری *Pectobacterium carotovorum*

جهت انجام این بررسی از آزمون برش‌های سیب‌زمینی استفاده شد. غده‌های سیب‌زمینی رقم مارفونا (حساس به پکتوباکتریوم) و آگریا شسته شده و پوست آن‌ها گرفته و زیر هود توسط چاقوی استریل به قطعاتی با ضخامت یک سانتی‌متر برش داده شدند و توسط هیپوکلرید سدیم ده درصد به مدت ۱-۲ دقیقه استریل شده و با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند.

سپس چاهک‌هایی با ارتفاع و قطر نیم سانتی‌متر در وسط تکه‌های سیب‌زمینی ایجاد گردید و تکه‌های سیب‌زمینی به داخل تشتک‌های پتری استریل حاوی کاغذ صافی استریل آغشته به دو میلی‌لیتر آب مقطر استریل منتقل شدند. یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست (10^8cfu/ml) داخل هر چاهک تزریق و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱±۲۷ درجه - سلسیوس قرار داده شد. سپس یکصد میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر(10^8cfu/ml) در هر چاهک تزریق شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید.

این آزمون با سه تکرار برای هر جدایه با کنترل مثبت (فقط باکتری بیمارگر) و کنترل منفی (فقط محیط کشت NB) انجام شد (Lapwood and Cans 1984). برای آنالیز نتایج به دست آمده از فعالیت جدایه‌های آنتاگونیست بر روی تکه‌های سیب‌زمینی از مقیاس ۰-۳ استفاده شد.

به این ترتیب که عدد صفر نشانگر تکه‌هایی بدون علایم، ۱= شدت پوسیدگی از تکه‌های سیب‌زمینی ۲۵-۵۰٪، ۲= شدت پوسیدگی از تکه‌های سیب‌زمینی ۵۰-۷۵٪، ۳= پوسیدگی کامل تکه‌های سیب‌زمینی می‌باشد و جهت محاسبه درصد بازدارندگی از پوسیدگی از رابطه زیر استفاده گردید.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{۱۰۰× (شدت پوسیدگی در تیمار- شدت پوسیدگی در کنترل}}{\text{شدت پوسیدگی در کنترل مثبت}}$$

بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از پوسیدگی نرم باکتریایی سیب‌زمینی در شرایط گلخانه‌ای

جهت انجام این بررسی ابتدا سوسپانسیون جدایه‌های منتخب G177, G19-1, G6, G10 و N179 با غلظت 10^6 cfu/ml تهیه شد. غده‌های سیب‌زمینی (رقم آگریا) با اندازه‌های نسبتا یکنواخت برش داده شدند به طوری که هر تکه سیب‌زمینی دارای ۲-۳ جوانه بود. غده‌ها با استفاده از هیپوکلرید سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند، سپس زیر هود به مدت دو ساعت در سوسپانسیون تهیه شده از باکتری‌های آنتاگونیست قرار داده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای اتاق نگهداری شدند. سوسپانسیون باکتری بیمارگر با غلظت بیش از 10^8 cfu/ml تهیه گردید. سپس این غده‌ها توسط سوسپانسیون تهیه شده از باکتری بیمارگر اسپری و در خاک استریل کشت داده شدند و به مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. این آزمون با سه تکرار برای هر جدایه آنتاگونیست و کنترل منفی (بدون باکتری آنتاگونیست و بیمارگر) و کنترل مثبت (باکتری بیمارگر به تنهایی) در طرح کاملا تصادفی انجام شد و نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری Minitab آنالیز شد. نتایج به دست آمده از فعالیت جدایه‌های آنتاگونیست بر روی غده‌های کشت شده با استفاده از مقیاس ۰-۳ بررسی شد. بدین ترتیب که عدد صفر نمایانگر گیاهچه‌هایی بدون علایم (شدت پوسیدگی ٪۰)، ۱= آب‌سوختگی بر روی انتهای ساقه (شدت پوسیدگی ٪۲۵)، ۲= آب سوختگی بر روی ساقه و برگ (شدت پوسیدگی ٪۵۰)، ۳= فروپاشی گیاه (شدت پوسیدگی ٪۱۰۰) می‌باشد (Khodakaramian and Zafari 2009).

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

جهت شناسایی پنج جدایه مورد استفاده در بررسی‌های گلخانه‌ای بر روی غده‌های سیب‌زمینی برخی تست‌های بیوشیمیایی مانند آزمون گرم، کاتالاز، اکسیداز، رشد در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز نشاسته، تحمل شوری ٪۱۰، رشد هوازی و بی‌هوازی، Motilityو رنگ‌آمیزی اسپور با استفاده از روش شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) انجام شد.

نتایج

غربالگری جدایه‌های به دست آمده براساس بازدارندگی‌شان علیه باکتری بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی

بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌های جداسازی شده علیه *P. carotovorum* در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که تقریبا یک چهارم آن‌ها قادر به ایجاد هاله بازدارنده از رشد بوده که از ۲۱۴ جدایه به دست آمده، ۱۳ جدایه (N168, N179, N22, N164, N172, N163, N185, N181, N170, N94, N93, G8, G20-2). از فعالیت آنتاگونیستی بالایی (قطر هاله بازدارندگی بیش از بیست میلی‌متر) برخوردار بودند که احتمالا ناشی از تولید برخی از متابولیت‌های ضدباکتریایی بوده است. ماده باکتریوسین مانند تولید شده توسط باکتری *B. licheniformis* P40 قادر به کنترل *P. carotovorum* می‌باشد که به نظر می‌رسد این ماده در تماس با لیپیدهای غشای سلولی موجب تجزیه شدن سلول‌های پکتوباکتریوم می‌شوند و نیز در حفاظت غده‌های سیب-زمینی در برابر پوسیدگی نرم تحت شرایط انبارداری استاندارد موثر می‌باشد (Cladera-Olivera *et al.* 2006).

بررسی توانایی جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم با استفاده از پلیت‌های ۹۶ چاهکی

نتایج به دست آمده از سنجش غلظت کریستال ویوله داخل چاهک‌ها نشان داد که از ۲۱۴ جدایه آنتاگونیست، ۵۲ جدایه قدرت تشکیل بیوفیلم بالایی داشتند و سایر جدایه‌ها یا قدرت تشکیل بیوفیلم کمی داشتند و یا قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند (جدول ۱). جدول مقایسه میانگین این ۵۲ جدایه نمایانگر وجود اختلاف معنی-داری بین جدایه‌ها بوده است. آنالیز آماری داده‌های به دست آمده نیز نشانگر وجود اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۱ می‌باشد.

بررسی توانایی تشکیل غشای نازک

در این آزمون از ۵۲ جدایه، ۱۸ جدایه که قدرت تشکیل

بیوفیلم بالاتری در پلیت ۹۶ چاهکی داشتند مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در سه محیط کشت استفاده شده نشان داد که عملکرد جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم در محیط کشت‌های مختلف متفاوت است. هرچند تمام این جدایه‌ها در پلیت ۹۶ چاهکی قدرت تشکیل بیوفیلم بالایی داشتند در حالیکه برخی از جدایه‌ها مانند N168 در محیط کشت LBMG قادر به تشکیل بیوفیلم نبوده اما در محیط کشت MSNg و MSNgp غشای نازک قوی تشکیل داد و جدایه N64 با وجود توانایی تشکیل بیوفیلم بالا در پلیت ۹۶ چاهکی در هیچ یک از سه محیط کشت قادر به تشکیل بیوفیلم نبود (جدول ۲، شکل ۱). اما در این میان، جدایه هایی مانند G9 در هر سه محیط کشت قدرت تشکیل بیوفیلم خوبی نشان دادند (جدول ۲). با توجه به نتایج به دست آمده از بررسی توانایی جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم در دو روش مورد استفاده ۱۲ جدایه (G5, G8, G11, G12, G13, G15, G177, G9, G19-1, N181, N185, N168) توانایی تشکیل بیوفیلم بالاتری را داشتند.

جدول ۱. غربال ریزوباکترهای تشکیل دهنده بیوفیلم قوی با آزمون رنگ آمیزی کریستال ویوله

Table 1. Screening of robust biofilm forming rhizobacteria by crystal violet staining assay.

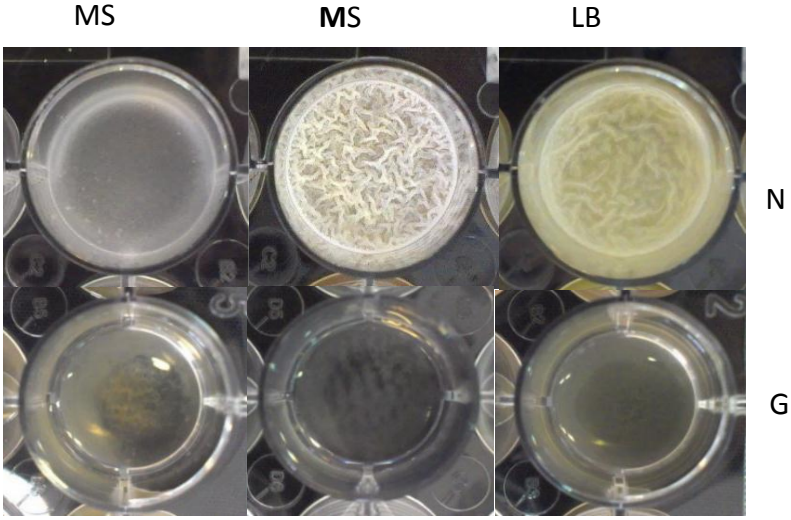
Antagonistic isolates	OD at 600 nm	Antagonistic isolates	OD at 600 nm
N168	3.06a	N69	2.18defghijklmno
G12	2.85ab	N50	2.12efghijklmnop
G15	2.88ab	N29	2.09fghijklmnopq
G8	2.82abc	N63	2.01ghijklmnopqr
N184	2.82abcd	N86	2.01ghijklmnopqr
N64	2.79abcde	N66	1.98ghijklmnopqr
G13	2.79abcde	N140	1.98hijklmnopqr
G11	2.81bcdef	N60	1.94ijklmnopqr
N30	2.77bcdef	N48	1.86ijklmnopqr
N59	2.74bcdef	N61	1.88ijklmnopqr
N177	2.73bcdefg	N15	1.87ijklmnopqr
G9	2.66bcdefgh	N80	1.84ijklmnopqr
N76	2.16bcdefghi	N45	1.77jklmnopqr
N185	2.6bcdefghi	N175	1.78jklmnopqr
G18	2.58bcdefghi	N127	1.72jklmnopqr
G5	2.52bcdefghij	N84	1.65klmnopqr
G19-1	2.53bcdefghijk	N67	1.67lmnopqr
N32	2.28bcdefghijk	N135	1.5mnopqr
N181	2.41bcdefghijkl	N92	1.47mnopqr
G7	2.43bcdefghijkl	N90	1.46nopqr
N53	2.4bcdefghijkl	N56	1.4opqr
N93	2.28bcdefghijkl	N65	1.55pqr
N136	2.30bcdefghijkl	N122	1.42qrs
N28	2.14cdefghijkl	N70	1.38rs
N2	2.25cdefghijkl	N72	1.21s
N68	2.18cdefghijkl		

جدول ۲. غربال ریزوباکترهای تشکیل دهنده بیوفیلم قوی توسط آزمون تشکیل غشای نازک در محیط کشت های مختلف.

Table 2. Screening of robust biofilm forming rhizobacteria by pellicle formation assay using different media.

Pellicle formation on different media								
MSNg*			MSNgp**			LBMG***		
N	M	R	N	M	R	N	M	R
N181	G5		N64	G7	G5	G18	G19-1	G9
N64	N185		N30	G59	G9	G59	G177	N181
N30	N168		G18		G184	N168	G184	N185
G184	G177				G8	N64	G7	
G18	G9				G13	N30	G5	
G7	G8				G12		G8	
G59	G13				G11		G11	
G19-1	G12				G15		G12	
	G11				G19-1		G13	
	G15				G177		G15	
					N168			
					N181			
					N185			

* MSN medium with glycerol and manganese, ** MSN medium with glycerol and pectin, ***LB medium with glycerol, N: none biofilm forming, M: mediocre biofilm forming, R: Robust biofilm forming



شکل۱- توانایی تشکیل پلک توسط جدایه‌های آنتاگونیست در پلیت ۲۴ چاهکی در سه محیط کشت متفاوت. چاهک‌های فوقانی مربوط به جدایه‌ای با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا و چاهک‌های پایینی مربوط به جدایه‌ای با قدرت تشکیل بیوفیلم پایین.

Figure 1. Biofilm formation of isolates N185 (robust biofilm forming) and G6 (weak biofilm forming) in three different media as determined by pellicle formation bioassay.

قابلیت جدایه‌ها در بازدارندگی از پوسیدگی غده-های سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی

در این آزمون جدایه‌هایی با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا مانندG177 و همچنین جدایه‌هایی که هم قدرت تشکیل بیوفیلم بالا و هم توانایی بازدارندگی بالایی در تشتک پتری داشتند N185, N181, N168 بازدارندگی ٪۱۰۰ از پوسیدگی سیب‌زمینی را نشان دادند. به طوریکه باکتری به سرعت رشد کرده و با تشکیل غشای نازک سطح تکه سیب‌زمینی را می‌پوشاند و مانند محافظی عمل کرده و مانع از تماس مستقیم سوسپانسیون باکتری بیمارگر با بافت سیب‌زمینی می‌شود. اما با وجود اینکه به طور کلی مانع از فعالیت پکتوباکتریوم شدند و هیچ علایمی از پوسیدگی نرم توسط پکتوباکتریوم بر روی تکه‌های سیب‌زمینی دیده نشد لاکن خود باکتری آنتاگونیست موجب نرم شدن کامل بافت سیب‌زمینی شده حتی زمانی که باکتری با جمعیت کمی تلقیح می-شد.

اثر جدایه‌های منتخب علیه بیمارگر در شرایط گلخانه‌ای

در این آزمون دو جدایه با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا (G177, G19-1) و دو جدایه با عدم توانایی تشکیل بیوفیلم (G6, G10) و جدایه‌ای با بیشترین هاله بازدارندگی در تشتک پتری (N179) مورد استفاده قرار گرفتند. جدول مقایسه میانگین درصد پوسیدگی نشان دهنده آن بود که جدایه G177، همانند شاهد غیرآلوده علایمی نشان نداده و موجب کنترل کامل بیماری شده است و جدایه‌های G10 و G19-1 با ۶۶٪ ۶۷٪ پوسیدگی، بیشترین درصد پوسیدگی حتی بیشتر از شاهد مثبت را داشتند و آنالیز آماری داده‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌ها از لحاظ درصد پوسیدگی بود. مقایسه میانگین و آنالیز آماری داده‌های حاصل از فاکتورهای رشدی نیز بیانگر آن بود که جدایه‌ها از نظر وزن تر ریشه و اندام هوایی و طول ریشه تفاوت معنی-داری نداشتند، اما جدایه G177 بیشترین طول ساقه را داشته و اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بین جدایه‌ها از لحاظ طول ساقه وجود داشته است.

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

برای شناسایی ایزوله‌های انتخاب شده از بررسی‌های میکروسکوپی و آزمون‌های بیوشیمیایی استفاده شد. نتایج نشان داد که هر ۵ جدایه مورد بررسی گرم مثبت بوده و قادر به تولید اندوسپور بودند. نتایج به دست آمده از آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که هر پنج

جدایه مورد استفاده در بررسی گلخانه‌ای به جنس *Bacillus* spp. تعلق دارند.

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد پوسیدگی و فاکتورهای رشدی در بررسی‌های گلخانه‌ای

Table 3. comparison of rotting percent and growth factors means in greenhouse studies

Antagonistic isolates	Percent of rotting	Fresh root weight (g)	Foliage fresh weight (g)	Length of stem	Length of root
N179	67.16ab	3.67[a]	12.58a	23.667ab	15ab
G6	33.8ab	6.126a	16.95a	24.333ab	18ab
G10	67.66a	3.777[a]	6.63a	11.333b	18.333ab
G177	0b	5.184a	21.23a	36.833a	18.500ab
G19-1	67.66a	2.880a	7.51a	8.500b	13.833b
Mock treated control	0b	6.693a	22.47a	35.167a	20.500ab
Infected control	33.8ab	5.392a	13.69a	24ab	21.500a

جدول ۴. خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های آنتاگونیستی.

Table 4. Biochemical and physiologic characteristics of antagonistic isolates

Test	N179	G6	G10	G177	G19-1
Gram reaction	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+
Spore formation	+	+	+	+	+
Swelling of bacterial body	+	-	-	-	-
Aginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Pectolytic Activity	-	-	-	-	-
Growth @ 45°C	+	+	+	+	+
Growth in 7% NaCl	+	+	+	+	+
Utilization of citrate	-	+	+	+	+
Anaerobic growth in glucose broth	+	-	-	-	-

بحث

در این تحقیق ، بررسی توان آنتاگونیستی جدایه‌های جداسازی شده علیه پکتوباکتریوم در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که تقریبا یک چهارم آن‌ها توانایی ایجاد هاله بازدارنده از رشد را داشته و از این نظر در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند که احتمالا ناشی از تولید برخی از متابولیت‌های ضدباکتریایی بوده است. در یک تحقیق مشابه مشخص شد که از ۱۱۰۷ جدایه باکتری جداسازی شده از ناحیه ریزوسفر و سطوح گیاه *Pinellia ternata*، ۵۵ جدایه قادر به ایجاد هاله بازدارندگی علیه *P. carotovorum* SXR1 بودند (Xiufang *et al*. 2009).

نتایج حاصل از بررسی توانایی جدایه‌ها در تشکیل بیوفیلم نشان دهنده آن می‌باشد که استفاده از روش رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله همراه با توانایی تشکیل غشای نازک در محیط‌های مختلف تواما روشی قابل اطمینان جهت یافتن جدایه‌هایی با توانایی تشکیل بیوفیلم قوی می‌باشد. در محیط کشت LBMG، منگنز و گلیسرول به عنوان سیگنالی جهت فعال شدن مسیر تشکیل بیوفیلم عمل می‌کنند، به طوری که این دو فاکتور موجب فعال شدن یکی از پنج کیناز درگیر در این مسیر (KinD) شده و به دنبال آن موجب فسفریله و فعال شدن تنظیم کننده اصلی (Spo0A-P) و القا تشکیل بیوفیلم می‌شوند (Smith *et al*. 1999). بررسی‌ها نشان می‌دهند که اثر القا کنندگی منگنز و گلیسرول در تشکیل بیوفیلم در *B. licheniformis* و *B. cereus* حفاظت شده است (Chemesh and Chai 2013). محیط کشت حداقل MSNg و MSNgp نیز در این غربالگری استفاده شدند که در این محیط‌ها پکتین (Pectin) به عنوان القا کننده تشکیل بیوفیلم عمل می‌کند. از بین پلی‌ساکاریدهای گیاهی مختلف، سه پلی‌ساکارید زایلان (Xylan)، آرابینوگالاکتان (Arabinogalactan) و پکتین نسبت به سایر پلی‌ساکاریدها بیشترین اثر را هم به عنوان یک محرک محیطی در القای تشکیل بیوفیلم و هم به عنوان بستری برای تشکیل ماتریکس بیوفیلم در *Bacillus subtilis* دارند (Beauregard *et al*. 2013).

نتایج به دست آمده از بررسی توان جدایه‌هایی با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا در بازدارندگی از پوسیدگی نرم تکه‌های سیب‌زمینی حاکی از کنترل کامل بیماری توسط این جدایه‌ها بوده است اما با وجود اینکه به طور کلی مانع از فعالیت پکتوباکتریوم شدند و هیچ علایمی

از پوسیدگی نرم توسط پکتوباکتریوم بر روی تکه‌های سیب‌زمینی دیده نشد اما با گذشت زمان خود باکتری-های آنتاگونیست نیز موجب نرم شدن کامل بافت سیب-زمینی شدند و حتی زمانی که باکتری با جمعیت کمی تلقیح می‌شد، باکتری سریعا سطح بافت تکه سیب‌زمینی را پوشانده و به جمعیت بالایی می‌رسید و موجب تشکیل غشای نازک روی سطح تکه سیب‌زمینی می‌شد. به نظر می‌رسد با افزایش سریع جمعیت باکتری و کلنیزه کردن سطح بافت سیب‌زمینی، میزان متابولیت-های تولید شده از جمله برخی آنزیم‌ها مانند پکتیناز افزایش یافته و موجب نرم شدن سریع بافت می‌شوند. بررسی‌ها نشان می‌دهند که اکثر باکتری‌های موجود در ناحیه ریزوسفر دارای ژن‌های پکتولیتیک (*Pel*) می-باشند که در شرایط خاصی بیان می‌شوند (Klug-Santner *et al*. 2006).

در این آزمون نیز به دلیل اینکه تکه‌های سیب‌زمینی به طور کامل به صورت پوست کنده مورد استفاده قرار گرفتند، به احتمال زیاد منجر به القای بیان ژن‌های پکتولیتیک شده‌اند. توانایی تولید آنزیم‌های پکتات لیاز در باکتری *Bacillus pumilus* BK2 نیزگزارش کردند (Klug-Santner *et al*. 2006).

نتایج حاصل از بررسی‌های گلخانه‌ای حاکی از وجود تفاوت در فعالیت جدایه‌ها در شرایط مختلف می‌باشد، که این تفاوت نیز به تاثیر محیط آزمون برمی‌گردد که برخی از مکانیسم‌های بیوکنترلی مانند رقابت، کلنیزاسیون در محیط آزمایشگاهی امکان عمل و بروز ندارند. در شرایط آزمایشگاهی، محیط آزمایشگاه به صورت کنترل شده بوده و بدون دخالت میزبان، شرایط فیزیکی و شیمیایی خاک و سایر میکروارگانیسم‌های خاکزی می‌باشد. تفاوت‌هایی که در عملکرد میکروارگانیسم‌های مختلف در شرایط متفاوت دیده می-شود را می‌توان به دخالت شرایط محیط، میزبان و وجود سایر میکروارگانیسم‌های بیوکنترل نسبت داد، چرا که شرایط طبیعی بسیار پیچیده‌تر از شرایط آزمایشگاه بوده و میکروارگانیسم از تمام پتانسیل خود برای بقا و رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های اطراف ریشه استفاده می-نماید. هدف از این تحقیق بررسی نقش تشکیل بیوفیلم در بیوکنترل گیاه بوده است و نتایج به دست آمده به طور کلی بیانگر آن بوده که رابطه بین تشکیل بیوفیلم و بیوکنترل گیاه، رابطه‌ای بسیار پیچیده می‌باشد که تحت تاثیر فاکتورهای مختلفی قرار می‌گیرد. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده آن بود که با اینکه برخی از جدایه-هایی با قدرت تشکیل بیوفیلم بالا مانند جدایه G177 فعالیت بیوکنترلی خوبی علیه پکتوباکتریوم داشته‌اند اما تشکیل بیوفیلم تنها عامل بیوکنترلی نبوده است: زیرا تعدادی از جدایه‌هایی با توانایی زیاد تشکیل بیوفیلم مانند جدایه G19-1 فعالیت آنتاگونیستی خوبی نشان ندادند.

REFERENCES

Abdolghafar NY, Abdolsayed WM (1997) Biological control of soft rot of potato using fluorescent pseudomonads. Arab Universities. Journal of Agricultural Sciences. 22: 419-431.

Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallamann J (2005) Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS Microbiology Ecology 51: 215-29.

Beauregard PB, Chai Y, Vlamakis H, Losick R, Kolter R (2013) *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.

Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowlling DN, O'Gara F (1997) Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiology Ecology 23: 95–106.

Davey ME, O'Toole GA (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biological Review 64: 847-867.

Douches DS, Maas D, Jastrzebski K (1996). Assessment of potato breeding progress in the USA over the last century. Crop Science 36:1544–1552.

Grandar A R P W, C B. Tanner (1976) Potato leaf and tuber water potential measurements with a pressure chamber. American Potato Journal 53: 1.

Kastelein P, Schepel EG, Mulder A, Turkensteen LJ, Van-Vuurde JWL (1999) Pirlminary selection of antagonists of *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* (Van Hall) Dye for application during green crop lifting of seed potato tuber. Potato Reasearch 42:161-171.

Klug-Santner BG, Schnitzhofer W, Vrsanska M, Weber J, Agrawal PB, Nierstrasz VA, Guebitz GM (2006) Purification and characterization of a new bioscouring pectatelyase from *Bacillus pumilus*

BK2. Journal of Biotechnology 121: 390-401.

Khodakaramian GH, Zafari D (2009) Identification of fluorescent pseudomonads isolated from potato Rhizosphere and assessment of their antagonistic activity towards *Pectobacterium carotovorum* under field condition. Plant Diseases and Pestes. 77(2): 1-18. In Persian.

Krzyzanowska DM, Potrykus M, GolanowskaM, Polonis K, Gwizdek-Wisniewska A (2012) Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. Plant pathology 94(2): 367-378.

Lapwood DH, Cans PT (1984) "A method for assessing the field susceptibility of potato cultivars to blackleg (*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica),"* Annuals of Applied Biology.104(2), pp. 315-320.

Melo IS. (1998). Agents' microbianos de controle de fungosfitopatogenicos. In; Melo, I. S. and Azevedo, J. L. (Eds). Controle Biologico. Embrapa, Jaguariuna. 1: 17-30.

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

Nguyen MT, Ranamukhaarachchi SL (2010) Soil-Borne Antagonists for Biological Control of Bacterial Wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* in Tomato and Pepper. Journal of Plant Pathology 92: 395-406.

Perombelon MCM, Kelman A (1980) Ecology of the soft rot Erwinias. Annual Review of Phytopathology 18: 361- 387.

Rashid M, Chowdhury MSM, Sultana N (2013) In- vitro screening of some chemicals and biocontrol agents against *Erwiniacarotovora* subsp. *carotovora*, the causal agent of soft rot of potato (*solanumtuberosum*) . The Agricalturists 11(2): 1-9.

Schaad NW, Jones JB, Chun (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd. Ed. APS Press, St. Paul, MN. USA.

Shemesh M, Chai Y (2013) A Combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling. Journal of Bacteriology 195(12): 2747-2754.

Smith KP, Handelsman J, Goodman RM (1999) Genetic basis in plants for interactions with disease-suppressive bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 96(9): 4786–4790.

Xiufang Hu, Qionglou Fang, Shixiao Li, Jinguang Wu Jishuang Chen (2009) Isolationand characterization of endophytic and rhizosphere bacterial antagonists of soft rot pathogen from Pinelliaternata. FEMS Microbiology 295:10-16.

Xu GW, Gross DC (1986) Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppression of potato seed piece decay. Phytopathology 76: 414-422.