فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۲
صص ۷۴-۶۵

تهیه جهش یافته های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری *Pseudomonas fluorescens* و بررسی فعالیت و مکانیسمهای آنتاگونیستی آنها بر علیه قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه

هانیه جهانی‌فر[۱]، اصغر حیدری*[۲]، نادر حسن‌زاده[۳]، لاله نراقی[۴]
تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۹

چکیده

در این تحقیق با استفاده از پدیده جهش خود به خودی (*Spontaneous mutation*)، سه جهش یافته مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک Rifampicin (Rif) و Nalidixic acid (Nal) از شش جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens* تهیه گردید و در مقایسه با انواع وحشی آنها در شرایط آزمایشگاه بر علیه قارچ بیماریزای *Rhizoctonia solani* عامل بیماری مرگ گیاهچه پنبه از طریق روش آزمون کشت متقابل (Dual culture) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که دو جدایه از سه جدایه جهش یافته خصوصیات آنتاگونیستی بهتری نسبت به انواع وحشی خود نشان دادند. همچنین جدایه‌های جهش یافته از نظر مکانیسمهای بازدارندگی بر علیه قارچ مذکور مورد بررسی قرار گرفته و نتایج حاکی از آن بود که هر سه باکتری جهش یافته از نظر تولید مواد فرار بهتر از انواع وحشی ، از نظر تولید مواد غیرفرار تقریبا مشابه و از نظر تولید سیدروفور برخی جدایه‌های جهش یافته در برخی غلظت ها نسبت به انواع وحشی آنها توانستند سیدروفور بیشتری تولید کنند. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده این است که پدیده جهش خودجوش ممکن است بر خواص آنتاگونیستی باکتریهای آنتاگونیست تاثیر گذاشته و آن را افزایش دهد.

واژه های کلیدی: باکتریهای آنتاگونیست، جهش یافته های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، مکانیسمهای بازدارندگی، بیماری مرگ گیاهچه پنبه، *Rhizoctonia solani*.

۱- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.
۲- استادیارمؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور.
۳- دانشیارگروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.
۴- مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور.
*نویسنده مسئول مقاله: heydari1384@yahoo.com

مقدمه:

پنبه نیز همانند دیگر محصولات گیاهی، به عوامل بیماریزای متعدد از جمله قارچها حساس می‌باشد. بیماری مرگ گیاهچه پنبه با عامل *Rhizoctonia solani* یکی از مهمترین بیماریهای پنبه در ایران به شمار می‌آید و هر ساله خسارات فراوانی را بوجود می‌آورد (Naraghi *et al*., 2007). علی‌رغم تاثیر قارچ‌کشها ، استفاده گسترده از آنها بیماری مرگ گیاهچه پنبه که توسط *R. solani* و دیگر بیمارگرها ایجاد می شود را حذف نمی‌کند (Asaka and Shoda, 1993). به علاوه استفاده وسیع از سموم شیمیایی به دلیل توسعه نژاد مقاوم بیمارگرها، تاثیرات زیان بار روی موجودات غیر هدف، تاثیرات منفی بهداشتی برخی از آنها و آلودگی محیط زیست باعث شده است تا مبارزه بیولوژیک با استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید برای کنترل و مدیریت بیماری مرگ گیاهچه پنبه به عنوان یک روش جایگزین مورد توجه قرار گیرد (Heydari and Misaghi, 1998; Zaki *et al*., 1998).

مبارزه بیولوژیک اصولا یک پدیده آنتاگونیستی می‌باشد و مکانیسمهای موثر در کنترل بیولوژیکی بیماریهای گیاهی پیچیده بوده و امکان دارد به چند طریق صورت پذیرد و یا چند عامل در این امر دخالت داشته باشند که مهمترین آنها شامل رقابت، آنتی‌بیوز و پارازیتیسم می‌باشند (موسوی، ۲۰۰۱). کنترل عوامل بیماریزا توسط گروههای مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* از طریق تولید چندین متابولیت ثانویه شامل آنتی‌بیوتیک‌ها ، سیدروفورها و هیدروژن سیانید صورت می‌گیرد (O'Sullivan and O'Gara, 1992) .

تحقیقات زیادی در زمینه استفاده از باکتریها و قارچهای آنتاگونیست برای مبارزه با بیماری مرگ گیاهچه پنبه با عامل *R. solani* انجام گرفته و نتایج امیدوارکننده‌ای نیز بدست آمده است (Brannen and Kenney, 1997; Howell *et al*., 1997; Zaki *et al*., 1998). برای مثال افزایش رویش و سالم ماندن ۳۰ تا ۷۹٪ گیاهچه‌های پنبه در خاکهای آلوده به *R. solani* را مرهون تولید آنتی‌بیوتیک پیرونیترین توسط باکتری *P. fluorescens* دانسته‌اند (Howell and Stipanovic, 1979). همچنین قارچ آنتاگونیست (*Gliocladium virens*) *Trichoderma virens* به عنوان یک مایکوپارازیت بیمارگر گیاهچه پنبه گزارش شده است که از طریق تولید آنتی‌بیوتیک *Gliotoxin* در مقابل *R. solani* فعال می‌باشد (Howell *et al*., 1997).

تنش‌های محیطی ناشی از عوامل مختلف از جمله آنتی‌بیوتیکها می‌تواند بر باکتریهای آنتاگونیست تاثیر گذاشته و باعث ایجاد تغییرات ژنتیکی در آنها شوند که این تغییرات ممکن است کارایی و توان آنتاگونیستی این باکتریها را تحت تاثیر قرار دهد (Ownley and Windham, 2003). یکی از این تغییرات پدیده جهش خودجوش می‌باشد که احتمال وقوع آن در طبیعت بر روی موجودات از جمله میکروارگانیسمهای آنتاگونیست وجود دارد.

جهش هر تغییر ارثی در مواد ژنتیکی می‌باشد و به عنوان منبع نهایی ایجاد دگرگونی ژنتیکی شناخته شده است (اشرف و همکاران، ۲۰۰۸ ;Blazquez, 2003). برخی جهش‌ها در اثر اشتباه طبیعی و خودبخودی در همانندسازی DNA (یا در نتیجه واکنشهای شیمیایی ناشناخته) بوجود می‌آیند که به عنوان جهش‌های خودجوش (Spontaneous mutation) شناخته می‌شوند. منشا این نوع جهش‌ها شامل اشتباه در همانندسازی DNA، تغییرات بازها در اثر واکنشهای توتومریزاسیون، تخریب بازها و جهش فریم شیفت خودبخودی می‌باشند (Drake, 1991; Maki, 2002). همچنین برخی از جهش‌ها می‌توانند توسط عوامل جهش‌زای شیمیایی مانند آنتی بیوتیک ها به وجود آیند (سالاری و همکاران، ۲۰۰۲) و یا در محیط و یا تابش و ورود ترانسپوزانها ایجاد شوند که این نوع جهش‌ها را جهش‌های القایی (Induced mutations) می‌نامند.

از آنجا که جهش‌ها و از جمله جهش خودجوش ممکن است خصوصیات و کارایی میکروارگانیسم‌ها را از طریق تاثیر بر مکانیسمهای آنها تحت تاثیر قرار دهند ، هدف از این تحقیق بررسی و مطالعه تاثیر پدیده جهش خودجوش بر توان آنتاگونیستی چند باکتری آنتاگونیست و مکانیسمهای عمل آنها از طریق تهیه جهش یافته های مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک Rif-Nal بود.

مواد و روش‌ها:

انتخاب و تهیه سوسپانسیون باکتریهای آنتاگونیست:

تعداد ۶ جدایه از باکتریهای آنتاگونیست که همگی متعلق به گونه *P. fluorescens* و جدا شده از ریشه گیاهان مختلف بودند ، از میان کلکسیون باکتریهای آنتاگونیست موجود در آزمایشگاه تحقیقات میکروارگانیسم‌های مفید موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور انتخاب گردیدند. جدایه‌ها از میان موثرترین آنتاگونیستها که در تحقیقات گذشته (Heydari *et al*., 2005) بیشترین قدرت آنتاگونیستی را در مقابل بیماری مرگ گیاهچه پنبه با عامل *R. solani* نشان داده بودند، انتخاب شدند.

برای تهیه سوسپانسیون از این باکتریها ، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریها روی محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient Agar) پخش گردید. تشتک های پتری در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شدند. سوسپانسیون باکتریها از کشت جدید باکتریها روی محیط کشت *NA* تهیه گردید.

تهیه و آماده‌سازی محلول آنتی‌بیوتیک‌ها:

در این تحقیق از دو آنتی‌بیوتیک Rifampicin و Nalidixic acid استفاده گردید که استفاده از آنها در تحقیقات بین‌المللی (Mariano and McCarter, 1993; Heydari and Misaghi, 1998; Steddom and Menge, 2001) رایج می‌باشد. محلولهای متفاوتی از هر دو آنتی‌بیوتیک با غلظتهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید.

تهیه جهش یافته های مقاوم به آنتی‌بیوتیکها:

برای تهیه جهش یافته های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، از محیط کشت (King's B (KB (۱۵ گرم Agar ، ۱۵ گرم Protease peptone # 3، ۱/۵ گرم K_2HPO_4، ۱/۵ گرم $MgSO_4$، ۱۲/۶ گرم Glycerol و ۱ لیتر آب مقطر) (Heydari *et al*., 1997) مخلوط با دو آنتی‌بیوتیک Rifampicin و Nalidixic acid استفاده گردید. سپس از سوسپانسیون تهیه شده از باکتریهای آنتاگونیست، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر توسط sampler برداشته و روی محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک با غلظتهای متفاوت پخش گردید و تشتک ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰-۳ روز قرار داده شد تا جهش یافته های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها ظاهر شوند. به این ترتیب پدیده جهش خودجوش در باکتریها تحت شرایط فشار و استرس ناشی از آنتی‌بیوتیکها رخ داده و جهش یافته های مقاوم به صورت کلنی‌های بسیار کوچک بر روی محیط کشت ظاهر گشت. کلنی‌های جهش یافته باکتریها با دقت از سطح پتریها برداشته شده و برای تهیه سوسپانسیون از آنها ، به داخل لوله آزمایش محتوی آب مقطر استریل انتقال داده شدند. همچنین پایداری جهش یافته های بدست‌آمده از طریق کشت مکرر روی محیط کشتهای *NA* و *KB* بدون آنتی‌بیوتیک بررسی شد.

انتخاب جدایه قارچ *Rhizoctonia solani* بیماریزای پنبه:

از میان جدایه‌های قارچ *R. solani* جدا شده از ریشه گیاهچه‌های پنبه موجود در آزمایشگاه میکروارگانیسم‌های مفید موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور ، یک جدایه انتخاب گردید و روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) خالص سازی شد. انتخاب این جدایه بر اساس قدرت بیماریزایی بالای آن روی گیاهچه های پنبه بود که قبلا در آزمایش قدرت بیماریزایی و بر اساس اصول کخ انجام گرفته بود (Heydari *et al*., 2005).

بررسی و مقایسه قدرت آنتاگونیستی باکتریهای آنتاگونیست در آزمایشگاه:

در این آزمایش قدرت آنتاگونیستی جهش یافته های بدست آمده ، در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) برعلیه جدایه انتخاب شده از قارچ *R. solani* در مقایسه با انواع وحشی آن مورد آزمایش و ارزیابی قرار گرفت. این آزمایش به صورت طرح آماری کاملا تصادفی و با ۷ تیمار برای جدایه قارچ مذکور (۳ باکتری نوع وحشی – ۳ باکتری جهش یافته و ۱ شاهد بدون باکتری) و ۴ تکرار برای هر تیمار به صورت آزمون کشت متقابل انجام گرفت.

به این صورت که هر کدام از جدایه‌های باکتریایی در وسط تشتک پتری به قطر ۹ سانتی‌متر حاوی محیط کشت NA به صورت خطی کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس ۲ دیسک ۱ سانتی‌متری از حاشیه پرگنه قارچ سه روزه *R. solani* با فاصله مساوی در دو طرف خطوط کشت باکتری قرار داده شد و در انکوباتور نگهداری گردید.

پس از آنکه دو پرگنه قارچ در پتری شاهد در مدت ۷۲ ساعت به هم رسیدند، میزان بازدارندگی از رشد قارچ مذکور در تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد. همچنین قدرت آنتاگونیستی باکتریها با اندازه‌گیری میزان قطر پرگنه قارچ در جدایه‌های باکتری نوع وحشی و جهش یافته مورد بررسی قرار گرفت. فرمول زیر جهت محاسبه درصد بازدارندگی (Inhibition percent) مورد استفاده قرار گرفت.

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{قطر کلنی قارچ در تیمار شاهد} - \text{قطر کلنی قارچ در تیمار باکتری}}{\text{قطر کلنی قارچ در تیمار شاهد}} \times ۱۰۰$$

بررسی مکانیسم‌های عمل باکتریهای آنتاگونیست:

در این آزمایش مکانیسم‌های موثر در بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* توسط سه جدایه باکتریایی نوع وحشی و جهش یافته مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت و برای هر جدایه در آزمایشات ۳ تکرار در نظر گرفته شد. آزمایشهای انجام شده به شرح ذیل بود :

- بررسی تولید مواد غیرفرار:

اثبات تولید مواد غیرفرار مطابق روش (Kraus and Loper, 1990) انجام گرفت. به این صورت که ابتدا یک قطره سوسپانسیون از هرجدایه باکتریایی (نوع وحشی و جهش یافته) روی محیط کشت NAG (آگار غذایی محتوی گلوکز٪۳) ریخته و با استفاده از پیپت پاستور استریل پخش گردید. پتریها به مدت ۴ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. سپس با استفاده از لوپ و آب مقطر استریل کلنی باکتری‌ها از سطح پتریها برداشته شد و پنبه استریل آغشته به فرمالین ٪۴۰ درون پتری بصورت وارونه قرار داده شد. پس از ۳۰ دقیقه تقریبا تمام باکتریها از بین رفتند. سپس یک دیسک قارچ به قطر۰/۵ سانتی‌متر در وسط پتری قرار داده شد. زمانی که قطر کلنی قارچ شاهد تمام سطح پتری را پوشش داد ، نتایج در بقیه جدایه‌ها نیز اندازه گیری گردید.

- بررسی تولید سیدروفور:

با توجه به نقش مهم سیدروفورها به عنوان یکی از مکانیسم‌های بازدارندگی در باکتریهای سودوموناس فلورسنت ، این آزمایش طبق روش (Weller and Cook, 1983) با اندکی تغییر انجام گرفت. به این ترتیب که هر جدایه باکتریایی توسط لوپ به روش کشت خطی در وسط پتری حاوی محیط کشت KB با غلظتهای متفاوت ۰، ۲۵، ۱۰۰ میکرو مول در لیتر کلرید آهن III کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس دو دیسک قارچ به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از کشت ۷۲ ساعته قارچ *Geotrichum candidum* در دو طرف کشت خطی قرار داده شد. نتایج ۵ روز بعد از قرار گرفتن پتریها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و زمانیکه قارچ در شاهد تمام پتری را پوشاند ، مورد بررسی قرار گرفت.

- بررسی تولید مواد فرار بازدارنده:

برای انجام این آزمون از روش (Kraus and Loper, 1990) استفاده گردید. ابتدا سوسپانسیون غلیظی از هر جدایه باکتریایی (نوع وحشی و جهش یافته) تهیه شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مذکور روی محیط کشت NAG (آگارغذایی محتوی گلوکز٪۲) پخش گردید. پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

همزمان یک قطعه قارچ به قطر ۰/۵ سانتی‌متر به طور وارونه در وسط یک پتری حاوی PDA قرار داده شد و پس از برداشتن درب دو محیط کشت ، دو پتری در زیر هود استریل مقابل هم قرار داده شد بطوریکه پتری حاوی قارچ بطور وارونه در بالا روی محیط کشت NAG قرار گرفت. سپس با نوار پارافیلم کاملا مسدود گردید و پتریها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت ۵-۴ روز نگهداری شدند و زمانی که قطر کلنی قارچ شاهد تمام سطح محیط کشت PDA را پوشش داد ، نتایج همانند آزمون تولید مواد غیرفرار ارزیابی گردید.

تجزیه و تحلیل آماری:

نتایج بدست آمده از آزمون کشت متقابل، با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت . ابتدا تجزیه واریانس‌ها و سپس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's Multiple Range Test) انجام شد و سطوح اختلافات معنی‌دار در سطح ۱٪ مشخص گردید.

نتایج

نتایج تهیه جهش یافته های باکتریایی مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک Rif-Nal:

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، در جدایه Pf-C-2 در هیچ غلظتی از آنتی‌بیوتیک‌ها، کلنی جهش یافته مشاهده نگردید، در حالیکه کلنی‌های کوچک جهش یافته از دو جدایه Pf-W-1 و Pf-S در همه غلظتهای استفاده شده از آنتی‌بیوتیک حاصل گشت و در بقیه جدایه‌ها شامل Pf-C-1 ، Pf-C-3 و Pf-W-2 تنها در یک غلظت (به ترتیب در ۱۰،۱۰۰و ۱۰۰میلی گرم در لیتر) از آنتی‌بیوتیک، جهش یافته های مقاوم رشد کردند. لازم به ذکر است که از میان جهش یافته های تهیه شده، سه جهش یافته که بیشترین تراکم را از نظر تعداد کلنی در غلظتهای متفاوت آنتی‌بیوتیک دارا بودند، انتخاب گردید که شامل جدایه‌های باکتریایی Pf-C-1 ، Pf-S و Pf-W-2 بودند.

جدول۱- نتایج تهیه جهش یافته‌های بدست آمده و انتخاب شده در بین ۶ جدایه باکتریایی در غلظتهای متفاوت آنتی بیوتیک های Rifampicin و Nalidixic Acid

کد اختصاری جدایه‌های باکتری	مشخصات جدایه‌های باکتری	غلظت mg/L۱۰	غلظت mg/L۵۰	غلظتmg/L ۱۰۰
Pf-C-1	جدا شده از ریشه پنبه*P. fluorescens*	+	–	–
Pf-C-2	جدا شده از ریشه پنبه*P. fluorescens*	–	–	–
Pf-C-3	جدا شده از ریشه پنبه*P. fluorescens*	–	–	+
Pf-S	جدا شده از ریشه چغندرقند*P. fluorescens*	+	+	+
Pf-W-1	جدا شده از ریشه گندم*P. fluorescens*	+	+	+
Pf-W-2	جدا شده از ریشه گندم*P. fluorescens*	–	–	+

نتایج مقایسه قدرت آنتاگونیستی باکتریهای آنتاگونیست (انواع وحشی و جهش یافته) در شرایط آزمایشگاه:

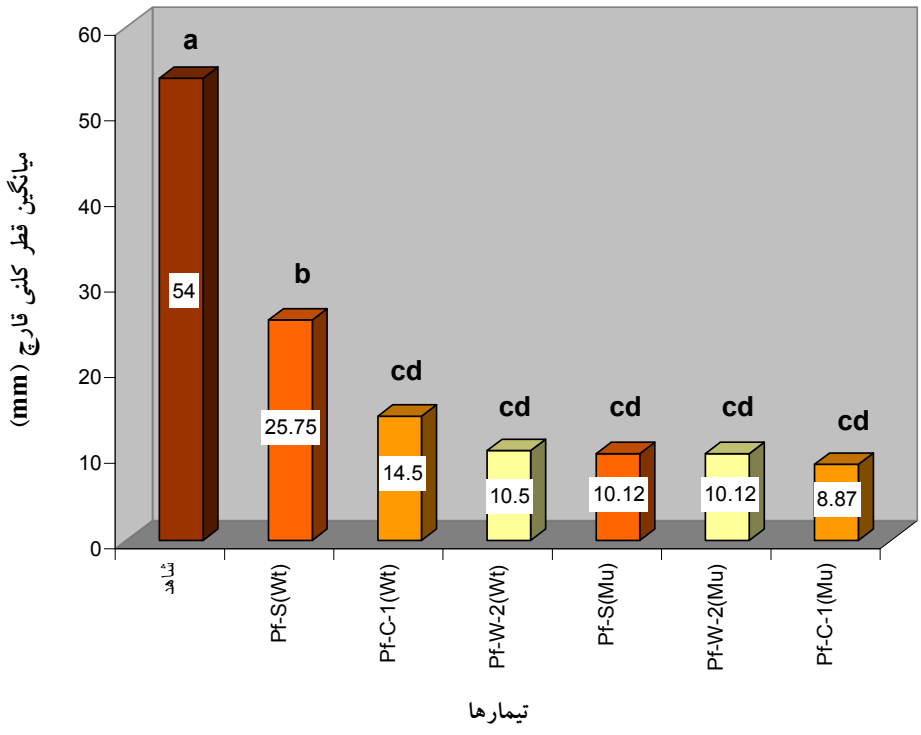
نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که درصد بازدارندگی در بین سه جدایه جهش یافته Pf-W-2 ، Pf-S و Pf-C-1 نسبت به انواع وحشی آنها بیشتر بود. اگرچه در بین این سه جدایه ، دو جدایه جهش یافته Pf-C-1 و Pf-S از نظر درصد بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* در مقایسه با انواع وحشی خود دارای اختلاف بیشتر می‌باشند.

جدول ۲- نتایج مقایسه درصد بازدارندگی از رشد کلنی قارچ *R. solani* توسط جدایه‌های باکتریایی (نوع وحشی و جهش یافته) در روش کشت متقابل (Dual culture).

تیمارها	میانگین قطر کلنی قارچ (mm)	درصد بازدارندگی نسبت به شاهد
شاهد	۵۴	------
Pf-C-1(Mu)	۸/۸۷	٪۸۳
Pf-C-1(Wt)	۱۴/۵	٪۷۳
Pf-S(Mu)	۱۰/۱۲	٪۸۱
Pf-S(Wt)	۲۵/۷۵	٪۵۲
Pf-W-2(Mu)	۱۰/۱۲	٪۸۱
Pf-W-2(Wt)	۱۰/۵	٪۸۰

با توجه به نتایج نمودار ۱ مشهود است که در جدایه نوع وحشی Pf-S با جهش یافته آن اختلاف معنی‌دار از نظر قدرت بازدارندگی در کنترل قارچ *R. solani* وجود دارد در حالیکه در دو جدایه دیگر اختلاف چندانی مشاهده نگردید.

نمودار۱- نتایج مقایسه میانگین رشد قطر کلنی قارچ Rhizoctonia solani توسط جدایه‌های باکتریایی (نوع وحشی و جهش یافته) از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن.



نتایج مقایسه مکانیسم‌های عمل باکتریهای آنتاگونیست جهش یافته با انواع وحشی آن:

- نتایج تولید مواد غیرفرار:

در این آزمایش اختلاف معنی‌دار از نظر تاثیر بر رشد قارچ مذکور، بین سه جدایه باکتریهای آنتاگونیست (جهش یافته و نوع وحشی) با شاهد مشاهده گردید. به عبارت دیگر هر سه جدایه باکتری (نوع وحشی و جهش یافته) توانستند با تولید مواد غیرفرار در محیط کشت از رشد قارچ *R. solani* جلوگیری به عمل آورده و از این نظر، تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های جهش یافته با انواع وحشی آنها مشاهده نگردید.

- نتایج تولید سیدروفور:

در این آزمون نیز هر سه جدایه باکتریایی *Pf-S*، *Pf-C-1* و *Pf-W-2* موجود در آزمایش قبلی از نظر تولید مواد سیدروفور مورد آزمایش قرار گرفتند و نتایج بدست آمده از این آزمایش که در غلظتهای ۰، ۲۵ و ۱۰۰ میکرومول کلریدآهن III و با استفاده از قارچ *Geotrichum candidum* انجام گردید، نشان داد که تولید سیدروفور در جدایه‌های جهش یافته در بعضی از غلظتهای یادشده نسبت به انواع وحشی آنها بیشتر بود. به عنوان مثال در غلظت ۲۵ میکرومول در لیتر کلریدآهن III تولید سیدروفور در جدایه‌های جهش یافته *Pf-C-1* و *Pf-W-2* نسبت به انواع وحشی به میزان ۱۷/۴۲ و ۱۷ درصد بیشتر بود.

- نتایج تولید مواد فرار بازدارنده:

در این آزمون نیز نتایج نشان داد که هر سه جدایه جهش یافته بیشتر از انواع وحشی آنها توانستند از رشد قارچ *R. solani* در اثر تولید مواد فرار جلوگیری کنند و در میان این سه جدایه، جدایه جهش یافته *Pf-W-2* نسبت به نوع وحشی آن، اختلاف بیشتر از نظر تولید مواد فرار و بازدارندگی از رشد قارچ مذکور را نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری:

یکی از نکات مهمی که در استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست در کنترل بیولوژیک بیماریهای گیاهی حائز اهمیت می‌باشد، تاثیر تنش های ناشی از عوامل مختلف از جمله آنتی‌بیوتیکها بر این عوامل و کارایی آنها می‌باشد. این عوامل قادر هستند میکروارگانیسم‌های موجود در خاک و یا قسمتهای دیگر گیاهان را تحت تاثیر قرار داده و باعث ایجاد تغییراتی در آنها گردند که این تغییرات می‌تواند کارایی و توان آنتاگونیستی این عوامل را تحت تاثیر قرار دهند (Ownley and Windham, 2003). یکی از پدیده‌هایی که احتمال وقوع آن در طبیعت بر روی موجودات و از جمله میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست وجود دارد، پدیده جهش خودجوش می‌باشد که در این تحقیق این پدیده و تاثیرات آن بر روی چند باکتری آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج کلی این تحقیق نشان می‌دهد که پدیده جهش خودجوش می‌تواند بر توان آنتاگونیستی باکتریهای آنتاگونیست تاثیر گذاشته و باعث افزایش قدرت آنتاگونیستی آنها در کنترل بیماری مرگ گیاهچه پنبه با عامل *R. solani* گردد. در ضمن افزایش قدرت آنتاگونیستی جهش یافته ها ممکن است مربوط به تغییراتی در آنها در رابطه با مقاومت و تحمل به شرایط محیطی و نیز تغییرات در ساختار آنها باشد که منجر به تولید متابولیت‌ها و سیدروفور شده است.

در این تحقیق باکتریهای آنتاگونیست از گونه سودوموناس فلورسنت انتخاب گردیدند که در زمره موثرترین آنتاگونیستهای بیمارگرهای ریشه و طوقه بوده و بسیار مورد توجه زیست‌شناسان خاک و بیماری‌شناسان گیاهی در دنیا می‌باشند و از میان آنها ۳ جدایه در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. این باکتریها چون ساکنین طبیعی خاک می‌باشند زمانی‌که به خاک اضافه می‌شوند ، به خوبی با آن سازگار شده و به راحتی استقرار می‌یابند و تکثیر می‌شوند (موسوی، ۲۰۰۱) و چندین نوع آنتی‌بیوتیک و سیدروفور تولید می‌کنند (Delany *et al*., 2000).

تحقیقات مختلف انجام شده نشان می‌دهد که تولید جهش یافته های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در باکتریهای مختلف در غلظتهای متفاوتی از آنتی‌بیوتیک رخ می‌دهد که اصطلاحا به این دامنه غلظت از آنتی‌بیوتیک، پنجره انتخاب جهش یافته

(Mutant Selection Window) گفته می‌شود (سالاری و همکاران، ۲۰۰۲ ;Zhao and Drlica, 2002). به عبارت دیگر باکتریها در مقابل آنتی‌بیوتیکها دامنه‌ای از تحمل دارند که این احتمالا به خصوصیات ژنتیکی آنها ، خواص فیزیکی و عوامل دیگر نسبت داده می‌شود. برخی در غلظت بالایی از آنتی‌بیوتیک زنده مانده و تولید جهش یافته می‌نمایند در صورتی که تعدادی از آنها حتی در غلظتهای پایین آنتی‌بیوتیکها قادر به بقا نمی‌باشند و این تفاوت در بین جدایه‌های باکتریایی استفاده شده در این تحقیق نیز مشاهده گردید.

در بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های نوع وحشی و جهش یافته‌ها در شرایط آزمایشگاه، اکثر جدایه‌های باکتریایی نوع جهش یافته توانستند در بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* در محیط کشت نسبت به انواع وحشی آنها بهتر عمل کنند و این نشان دهنده آن است که پدیده جهش خودجوش که در نتیجه مقاومت به آنتی‌بیوتیک در باکتریها اتفاق افتاده بود، منجر به افزایش توان آنتاگونیستی باکتریها در شرایط آزمایشگاه شده است و این احتمالا می‌تواند ناشی از تاثیر این تغییر بر روی مکانیسم‌های این آنتاگونیستها باشد.

در مرحله دیگری از این تحقیق ، مکانیسم‌های مختلف جدایه‌های نوع وحشی و جهش یافته مورد بررسی قرار گرفت که عبارت بودند از : تولید متابولیت‌های غیرفرار ، سیدروفور و مواد فرار. تولید متابولیتهای غیرفرار از جمله آنتی‌بیوتیکهای مختلف توسط اکثر سویه‌های سودوموناس فلورسنت به عنوان مکانیسم اصلی جلوگیری از رشد قارچ و کنترل بیماری ذکر شده است (Ganeshan and Kumar, 2005). نتایج حاصل از این آزمون که مطابق روش (Kraus and Loper, 1990) انجام گرفت، نشان داد که بین جدایه‌های باکتریایی جهش یافته با انواع وحشی آنها از نظر تولید مواد غیرفرار تفاوتی وجود نداشت و این بدان معنی است که این پدیده برروی این مکانیسم از باکتریها تاثیری نداشته است.

پس از آنتی‌بیوتیکها ، مهمترین نقش را سیدروفورهای این باکتریها دارند. نتایج آزمون تولید سیدروفور و رشد قارچ *Geotrichum candidum* در غلظتهای مختلف کلریدآهن III نشان داد که برخی از باکتریهای جهش یافته در غلظتهای کم آهن توانستند سیدروفور بیشتری نسبت به انواع وحشی آنها تولید کنند. بنابراین می‌توان تاثیر پدیده جهش را بر روی این مکانیسم از باکتریها موثر تلقی نمود که احتمالا می‌توان آن را به خواص و فعالیت آنها نسبت داد.

از دیگر مکانیسمهای مورد اشاره برای باکتریهای سودوموناس آنتاگونیست می‌توان تولید مواد فرار از جمله ترکیب فرار سیانید هیدروژن را نام برد (Defago *et al*., 1990). ترکیب مذکور برای قارچها ماده‌ای سمی به شمار می‌آید. همچنین این ترکیب با تاثیر بر متابولیسم گیاه ، موجب تشکیل ریشه‌های مویین فراوان می‌گردد. این آزمون نیز نشان داد که جدایه‌های جهش یافته آنتاگونیست توانستند با تولید بیشتر متابولیت‌های فرار نسبت به انواع وحشی آنها ، از رشد قارچ *R. solani* جلوگیری کنند.

اگرچه پدیده جهش خودجوش به طور کلی بر روی مکانیسم‌های عمل این باکتریهای آنتاگونیست در جهت افزایش تاثیر این باکتریها در کنترل بیماری مذکور موثر واقع گردید ، اما باید اذعان داشت که موثربودن جدایه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاه دلیل قاطع بر موفق بودن آنها در شرایط گلخانه و مزرعه نبوده و لازم است که این جدایه‌ها در شرایط واقعی مزرعه و گیاه مورد بررسی قرار گیرند. زیرا در شرایط واقعی ، عوامل محیطی متعددی از قبیل گیاه میزبان ، نوع خاک ، درجه حرارت خاک ، رطوبت خاک و عوامل دیگر قادر هستند که تاثیرات بسزایی بر رشد و فعالیت این باکتریها گذاشته و کارایی آنها را تحت تاثیر قرار دهند (Heydari *et al*., 1997).

نتایج کلی حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که پدیده‌های ژنتیکی از قبیل جهش خودجوش می‌تواند منجر به تغییراتی در کارایی و مکانیسم عمل باکتریهای آنتاگونیست گردند که این امر می‌تواند در کنترل بیولوژیکی بیماریهای گیاهی بسیار مهم بوده و باید مورد توجه قرار گیرد. در نهایت انجام چنین تحقیقاتی می‌تواند راهگشای موفقیت روشهای کنترل بیولوژیک (زیستی) بیماریهای گیاهی بوده و گامی موثر در جهت افزایش تولید محصولات کشاورزی ، کاهش استفاده از سموم شیمیایی و حفاظت از محیط زیست و ذخایر بیولوژیکی باشد.

Reference:

1. Asaka O. and Shoda M. 1993. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. Applied and Environmental Microbiology 62: 4081-4085.
2. Ashraf S, Soudi M R and Sadeghizadeh M. 2008. Isolation of a mutant strain *of Xanthamonas campestris* using cheese juice as the only substrate. Iranian Journal of Biology 21 (2): 184-193.
3. Blazquez J. 2003. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. Clinical Infectious Disease 37: 1201-1209.
4. Brannen P M and Kenney D S. 1997. Kodiak- A successful biological-control product for suppression of soil-borne plant pathogens of cotton. Industrial Microbiology Biotechnology 19: 169-171.
5. Défago G, Berling C H, Burger U, Haas D, Kahr G, Keel C, Voisard C, Wirthner P and Wurthrich, B. 1990. Suppression of black root rot of tobacco and other root diseases by strains of *Pseudomonas fluorescens*: Potential applications and mechanisms. pp. 93-108, *In* D. Hornby (ed) Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens. Wallingford, UK: CAB International.
6. Delany I, Sheehan M M, Fenton A, Bardin S, Aarons S and O'Gara F. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of ph1F as a transcriptional repressor. Microbiology 146: 537-546.
7. Drake J W. 1991. Spontaneous Mutation. Annual Review of Genetics 25: 125-146.
8. Ganeshan G and Kumar A M. 2005. *Pseudomonas fluorescens*, a potential bacterial antagonist to control plant diseases. Plant Interactions 1: 123-134.
9. Heydari A, Fattahi H, Zamanizadeh H R, Hassanzadeh N and Naraghi L. 2005. Investigation on the possibility of using bacterial antagonists for biological control of cotton seedling damping-off in greenhouse. Applied Entomology and Phytopathology 72: 51-69.
10. Heydari A and Misaghi I J. 1998. Biocontrol activity of *Burkholderia cepacia* against *Rhizoctonia solani* in herbicide-treated soils. Plant and Soil 202: 109-110.
11. Heydari A, Misaghi I J and McCloskey W B. 1997. Effects of three soil-applied herbicides on populations of plant disease suppressing bacteria in the cotton rhizosphere. Plant and soil 195: 75-81.
12. Howell C R, DeVay J E, Garber R H and Batson W E. 1997. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. Cotton Science. 1: 15-20.
13. Howell C R and Stipanovic R D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathology 69: 480-482.
14. Kraus J and Loper J E. 1990. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Applied and Environmental Microbiology 61: 849-854.
15. Maki H, 2002. Origins of Spontaneous Mutation: Specificity and Directionality of Base Substitution, Frameshift, and Sequence-Substitution Mutageneses. Annual Review of Genetics 36: 279-303.
16. Mariano R L R and McCarter S M. 1993. Epiphytic survival of *Pseudomonas viridiflava* on tomato and some selected weed species. Microbial Ecology 26: 47-58.
17. Mousavi M R. 2001. Biological Control. Mashhad, Iran: Mashhad University Press. 486 p.

18. Naraghi L, Zareh-Maivan H, Heydari A and Afshari-Azad H. 2007. Investigation of the effect of heating Vesicular Arbuscular Mycorrhiza and thermophillic fungus on cotton wilt disease. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 1596-1603.
19. O'Sullivan D B and O'Gara F. 1992. Traits of fluorescent Pseudomonas spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological Reviews 56: 662-676.
20. Ownley B H and Windham M T. 2003. Biological control of plant pathogens. pp: 323-332, *In* RN Trigiano, MT Windham and AS Windham (eds). Plant Pathology Concepts and Laboratory Exercises. 2ed., London, UK: CRC Press.
21. Salari M, Kadkhoda Z, Behnaz M, Khoshreza M, Pourtaher M, and Vahabzadeh A. 2002. Comparison of the sensitivity of pathogenic periodento capnofile bacteria to bacteriocide and bacteriostatic antibiotics. Journal of Dental school 2:213-219.
22. Steddom K and Menge J A. 2001. Evaluation of continuous application technology for delivery of the biocontrol agent *Pseudomonas putida* 06909-rif/nal. Plant Disease 85: 387-392.
23. Weller D M and Cook R J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology 73: 463-469.
24. Zaki K, Misaghi I J, Heydari A and Shatla M N. 1998. Control of cotton seedling damping-off in the field by *Burkholderia cepacia*. Plant Disease 82: 291-293.
25. Zhao X and Drlica K. 2002. Restricting the selection of antibiotic-resistant mutant bacteria: Measurement and potential use of the mutant selection window. Infectious Diseases 185: 561-565.