مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۱۷۰-۱۶۳)

بررسی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* استرین UTPF86 و تأثیر قارچ *Rhizoctonia solani* بر آن

مهسا حاج ملک زنجانی[۱]، مسعود احمدزاده[۲]*، عباس شریفی تهرانی[۳]، کیوان بهبودی[۴] و روح‌اله صابری ریسه[۵]

۱، ۲، ۳، ۴، دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۵، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان، رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۶ - تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۴)

چکیده

کلنیزاسیون ریشه توسط باکتری‌های آنتاگونیست به عنوان یک پیش‌نیاز برای بیوکنترل موفق مورد توجه قرار می‌گیرد. برای بازدارندگی مؤثر در مقابل بیماری‌های گیاهی، کلنیزاسیون سریع و مناسب برای ممانعت از استقرار بیمارگرها روی سیستم ریشه ضروری می‌باشد. به این منظور، کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین *Pseudomonas fluorescens* UTPF86 در حضور قارچ *Rhizoctonia solani* AG-4 و بدون حضور آن در شرایط گلخانه در طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۴ استرین باکتری طی چهار هفته مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۱۴ استرین سودوموناس فلورسنس، استرین UTPF86 بر اساس قدرت بیوکنترل و کلنیزه نمودن ریشه انتخاب گردید. به منظور ردیابی استرین باکتری فوق، این استرین مقاوم به دو آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل و تتراسیکلین شد. ریشه‌ها پس از ۴-۱ هفته از کاشت نمونه‌برداری شدند. جمعیت باکتری بوسیله سری رقت روی محیط S1 روی محیط تعیین گردید. این پژوهش مشخص کرد که در حضور قارچ *R. solani* کلنیزاسیون ریشه به طور معنی‌داری توسط استرین UTPF86 افزایش می‌یابد. همچنین میزان کلنیزاسیون ریشه در طی دو هفته اول افزایش یافت و سپس در طی هفته سوم و چهارم دارای سیر نزولی داشت و به ترتیب از $۲/۵۲\times۱۰^{۷}$ به $۲/۸۱\times۱۰^{۱۰}$، $۷/۰۷\times۱۰^{۱۰}$، $۴/۹\times۱۰^{۸}$ و $۲/۸۱\times۱۰^{۸}$ در هر گرم ریشه در حضور بیمارگر رسید.

واژه‌های کلیدی: کلنیزاسیون، کلرامفنیکل، تتراسیکلین، آنتاگونیست، ریزوسفر، بیوکنترل.

مقدمه

قدرت و توانایی کلنیزه کردن ریشه یک خصوصیت مهم برای ریزوباکترهایی است که به عنوان یک عامل بیوکنترل مطرح می‌شوند. یکی از دلایل مهم برای اختلاف در رفتار آنتاگونیستی باکتری‌ها در شرایط زمانی و مکانی مختلف، به دلیل تفاوت در میزان کلنیزاسیون ریزوسفر می‌باشد. کلنیزاسیون ریشه غالباً به علت بی‌ثباتی و تغییرپذیری، عامل محدودکننده در استفاده از ریزوباکترهایی است که به عنوان عامل بیوکنترل مطرح می‌شوند (Weller, 1988). با توجه به کاربرد اغلب عوامل آنتاگونیست روی بذر یا درون خاک مسأله کلنیزاسیون دارای اهمیت زیادی می‌باشد. کلنیزاسیون فرایندی است

* نویسنده مسئول: مسعود احمدزاده تلفن: ۰۹۱۲-۲۶۰۹۱۱۰۰ E-mail: ahmadz@ut.ac.ir

که در صورت موفقیت منجر به حذف رقابتی میکروارگانیزم‌های زیان‌آور می‌شود. در بسیاری از مطالعات رابطه مستقیمی بین افزایش کلنیزاسیون ریزوسفر توسط یک عامل آنتاگونیست با کاهش بیماری دیده شده است. کلنیزاسیون موفق یک باکتری آنتاگونیست عامل بسیار مهم و تعیین‌کننده در محصور نمودن جایگاه میکروبی، تلقی می‌گردد. باکتری‌های آنتاگونیست و ریزوباکترهای محرک رشد گیاهان باید بتوانند در زمان و مکان‌های مناسب، در رقابت با میکروارگانیزم‌های مضر، ریشه گیاهان را کلنیزه کنند و از استقرار و ورود بیمارگرها جلوگیری نمایند (De Weert & Bloemberg, 2006).

Schippers *et al.* (1987) نشان دادند که کلنیزاسیون ناکافی ریشه منجر به کاهش فعالیت بیوکنترل می‌شود. Bull *et al.* (1991) گزارش‌ها حاکی است که ارتباط خطی مثبتی بین کلنیزاسیون ریشه گندم توسط *Pseudomonas fluorescens* 2-79 و کنترل بیولوژیکی بیماری پاخوره در اثر *Guemunnomyces gramminus* وجود دارد. گزارش شده است کاهش بیماری بوته‌میری نخودفرنگی در اثر بیمارگر *Pythium ultimum* Trow با افزایش کلنیزاسیون ریشه توسط باکتری *Burkholderia cepacia* AMMD همبستگی معنی‌داری داشته است (Parke *et al*., 1990).

وجود بیمارگر به عنوان یک فاکتور زنده محیطی می‌تواند کلنیزاسیون باکتری آنتاگونیست را تحت تأثیر قرار دهد. بررسی‌ها نشان داده که حضور عامل بیماریزای *P. ultimum* در ریزوسفر خیار باعث افزایش کلنیزاسیون گردید (Notz *et al*., 2001). Leben *et al.* (1987) رابطه خطی معنی‌داری را بین میزان کلنیزاسیون استرین باکتری *P. fluorescens* M-4 روی گیاه سیب‌زمینی و حضور بیمارگر *Verticillium dahliae* Kleb. نشان دادند. نتایج حاصل از بررسی‌ها روی کلنیزاسیون ریشه سویا توسط استرین باکتری *Bacillus megaterium* B153-2-2 در حضور بیمارگر *Rhizoctonia solani* Kühn نشان داد جمعیت باکتری و میزان کلنیزاسیون هنگامی که قارچ بیماریزا در خاک وجود داشت، به طور معنی‌داری افزایش یافت (Zheng & Sinclair, 2000).

مواد و روش‌ها

استرین‌های باکتریایی و قارچ مورد آزمایش

در این تحقیق از ۱۴ استرین باکتریایی *Pseudomans fluorescens* و قارچ *R. solani* با گروه آناستوموزی AG_4 جداسازی شده از روی گیاه کلزا استفاده شد که از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه گردیدند.

آزمایشات گلخانه‌ای اولیه به منظور انتخاب استرین برتر

بررسی خواص بازدارندگی *P. fluorescens* در شرایط گلخانه علیه بیمارگر *R. solani*

برای انجام این آزمایش، توانایی آنتاگونیستی ۱۴ استرین باکتریایی روی بیماریزایی قارچ *R. solani* در شرایط گلخانه به روش Maurhofer *et al.* (1994) بررسی گردید. به این منظور ۲ گرم از زاد مایه بیمارگر (بذور ارزن) به ۱ کیلوگرم خاک سترون اضافه گردید. بذور کلزا که توسط سوسپانسیون استرین‌های آنتاگونیست با جمعیت 10^8 سلول باکتری آغشته شده بودند، در گلدان‌های حاوی $^2/_3$ خاک آلوده به قارچ و $^1/_3$ خاک سترون کاشته شدند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۶ تیمار [۱۴ استرین باکتریایی، شاهد سالم (فاقد باکتری و قارچ)، شاهد آلوده (فاقد باکتری)] در چهار تکرار انجام گرفت.

درصد مرگ گیاهچه و درصد کاهش بیماری پس از ۴ هفته برآورد گردید. داده‌های به دست آمده از آزمایش (درصد تلفات گیاهچه‌ها و میزان بازدارندگی علیه بیمارگر) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

بررسی قدرت کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط ریزوباکترهای آنتاگونیست در شرایط گلخانه

به منظور انتخاب استرینی با توانایی کلنیزاسیون بالا، بذور کلزا توسط سوسپانسیون 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر، ۱۴ استرین باکتریایی مایه‌زنی گردیدند و در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شدند. بر طبق روش Yan *et al.* (2003)، نمونه‌گیری از ریشه‌ها بعد از

۴ هفته صورت گرفت. ابتدا ریشه‌ها توسط جریان ملایم آب شسته شدند و سپس توسط کاغذ خشک‌کن آبگیری و خشک شدند. پس از آن به طور تصادفی به میزان ۱ گرم از ریشه‌ها درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و به مدت ۱ ساعت با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه روی دستگاه شیکر قرار گرفتند. مقدار ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های حاصل از هر ارلن برای تهیه سریال رقت برداشته شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مناسب روی محیط کشت انتخابی S1 پخش گردید. پس از نگهداری در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت، شمارش باکتری‌ها صورت گرفت که مؤید جمعیت باکتری روی ریشه بود. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۴ تیمار در چهار تکرار انجام گرفت. داده‌های به دست آمده از آزمایش (لگاریتم تعداد باکتری‌ها در هر گرم ریشه) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵٪ انجام شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای نهایی در رابطه با کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین برتر UTPF86

بررسی میزان کلنیزاسیون بذر کلزا توسط استرین UTPF86

به این منظور مقدار یک گرم بذور کلزای آغشته به ۱×۱۰^{۸} سلول باکتری در میلی‌لیتر استرین UTPF86 در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به مدت یک ساعت در ۱۵۰ دور در دقیقه روی دستگاه شیکر در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری غوطه‌ور شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل را برداشته و سری رقت تهیه می‌گردد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مورد نظر برداشته و روی محیط کینگ‌بی پخش گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شده و پس از آن شمارش جمعیت باکتری صورت گرفت که مؤید جمعیت باکتری روی بذر است.

لازم به ذکر است به منظور ردیابی استرین مورد نظر و بررسی دینامیک جمعیت و میزان بقاء آن، اقدام به تهیه موتانت مقاوم به آنتی‌بیوتیک شد. در این روش از دو آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین و کلرامفنیکل استفاده شد. ابتدا تک کلنی حاصل از محیط کشت تازه باکتری مرحله به مرحله وارد غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۲۰، ۳۵، ۵۰، ۷۰، ۱۰۰، ۱۵۰ پی‌پی‌ام آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین شد. سپس سوشی که در غلظت ۱۰۰ppm از این آنتی‌بیوتیک قادر به رشد بود، انتخاب و پس از تثبیت آن در این غلظت، وارد غلظت‌های مختلف (همانند بالا) کلرامفنیکل شد به همین ترتیب این سوش تا غلظت ۱۰۰ppm از آنتی‌بیوتیک دوم هم رشد کرد (Glandorf *et al.*, 1992).

بررسی الگوی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین UTPF86 در شرایط عاری از بیمارگر

این آزمایش مطابق روش Yan *et al.* (2003) انجام گرفت. بذور کلزا توسط سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ استرین UTPF86 مایه‌زنی شد و در گلدان‌هایی که خاک آنها در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۴ ساعت در دو روز متوالی پاستوریزه گردیده بود، کاشته شدند (Zheng & Sinclair, 2000).

نمونه‌برداری از ریشه‌ها به ترتیب در ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روز بعد از کاشت بذور انجام گرفت و در طی ۴ هفته مقدار جمعیت باکتری روی ریشه و میزان کلنیزاسیون ریشه مورد نظر بررسی گردید و الگوی کلنیزاسیون ریشه بعد از ۴ هفته به دست آمد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۴ تیمار در ۱۶ تکرار انجام گرفت.

بررسی الگوی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین UTPF86 در شرایط حضور بیمارگر

برای انجام این آزمایش ابتدا طبق روش Maurhofer *et al.* (1994) آلوده‌سازی خاک با قارچ بیماریزای *R. solani* صورت گرفت. سپس بذور تلقیح شده با سوسپانسیون $۱۰^{۸}$ در خاک پاستوریزه کاشته شدند. در طی ۴ هفته به ترتیب در ۷ و ۱۴ و ۲۱ و ۲۸ روز، به روش Yan *et al.* (2003) نمونه‌برداری انجام گرفت و تأثیر حضور بیمارگر بر میزان کلنیزاسیون و کاهش بیماری مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۴ تیمار در ۱۶ تکرار انجام گرفت.

محاسبات آماری

تجزیه و تحلیل آماری و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن ($P\leq ۰/۰۵$) و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت. در مورد صفاتی که عدد صفر در بین آنها وجود داشت از تبدیل عددی $\sqrt{x+۰/۵}$ استفاده گردید.

نتایج

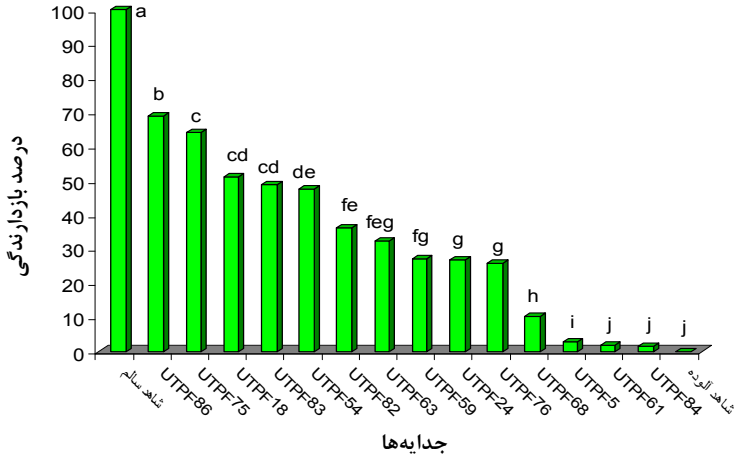
بررسی‌های گلخانه‌ای اولیه به منظور انتخاب استرین برتر

بررسی اثر سودوموناس فلورسنس در کاهش بیماری مرگ گیاهچه کلزا ناشی از قارچ *R. solani* در شرایط گلخانه

همان گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، بررسی اثر ریزوباکترها در خاک آلوده به قارچ *R. solani* نشان داد بهترین تأثیر مربوط به استرین UTPF86 می‌باشد که به میزان ۶۹ درصد باعث کاهش بیماری نسبت به شاهد آلوده گردید (گروه b).

بررسی قدرت کلنیزاسیون ریشه‌های کلزا توسط سودوموناس فلورسنس

همان گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، نتایج حاصل از شمارش کلنی باکتری‌های رشد یافته روی محیط کشت S1 پس از ۴ هفته نشان داد که بیشترین قدرت کلنیزاسیون ریشه مربوط به استرین UTPF86 بود که قادر به کلنیزه نمودن ریشه کلزا با جمعیت $۶/۶۴\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری در گرم ریشه بود (گروه a).



شکل ۱- بررسی اثر استرین های سودوموناس فلورسنس در کاهش بیماری مرگ گیاهچه کلزا

جدول ۱- بررسی قدرت کلنیزاسیون ریشه‌های کلزا توسط سودوموناس فلورسنس

استرین باکتریایی	میانگین جمعیت سلول باکتری در هر گرم ریشه
UTPF86	$۶/۶۴\times۱۰^{۷}$ a
UTPF 75	$۵/۲۱\times۱۰^{۶}$ b
UTPF 83	$۲/۱\times۱۰^{۶}$ c
UTPF 63	$۴/۱۵\times۱۰^{۵}$ d
UTPF 54	$۴/۲۱\times۱۰^{۵}$ d
UTPF 82	$۲/۰۷\times۱۰^{۵}$ e
UTPF 18	۱×۱۰^{۵} fe
UTPF 59	$۱/۲۹\times۱۰^{۵}$ fe
UTPF 24	$۸/۲۳\times۱۰^{۴}$ fg
UTPF 76	$۵/۲۴\times۱۰^{۴}$ g
UTPF 68	$۴/۰۹\times۱۰^{۴}$ g
UTPF 5	$۲/۰۵\times۱۰^{۴}$ h
UTPF 84	$۱/۶۴\times۱۰^{۴}$ h
UTPF 61	۱×۱۰^{۴} h

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار است.

اعداد هر ستون که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند، در سطح ۵ ٪ براساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

بررسی‌های گلخانه‌ای نهایی روی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین UTPF86

ارزیابی میزان کلنیزاسیون بذور کلزا توسط استرین UTPF86

نتایج حاصل از شمارش کلنی باکتری‌های رشد یافته روی محیط کینگ‌بی مشخص کرد که باکتری با جمعیت $\times۱۰^{۷}$ ۲/۵۲ سلول باکتری بر گرم بذر، بذور کلزا را کلنیزه نمود.

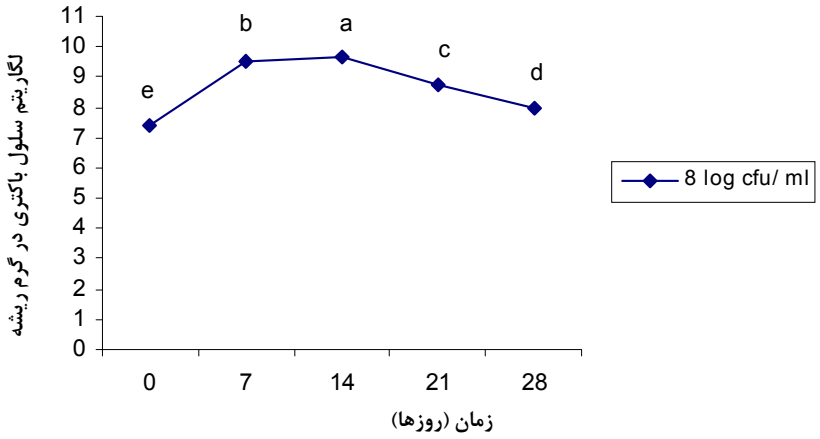
بررسی الگوی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین UTPF86 در شرایط عاری از بیمارگر

مقایسه میانگین‌های به دست آمده از الگوی کلنیزاسیون ریشه کلزا در طی چهار هفته مشخص کرد تراکم جمعیت باکتری پس از طی هفته اول دارای افزایش قابل ملاحظه‌ای بود و جمعیت باکتری از $۲/۵۲\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری بر گرم بذر که بذور کلزا را کلنیزه نموده به $۳/۱۶\times۱۰^{۹}$ سلول باکتری روی هر گرم

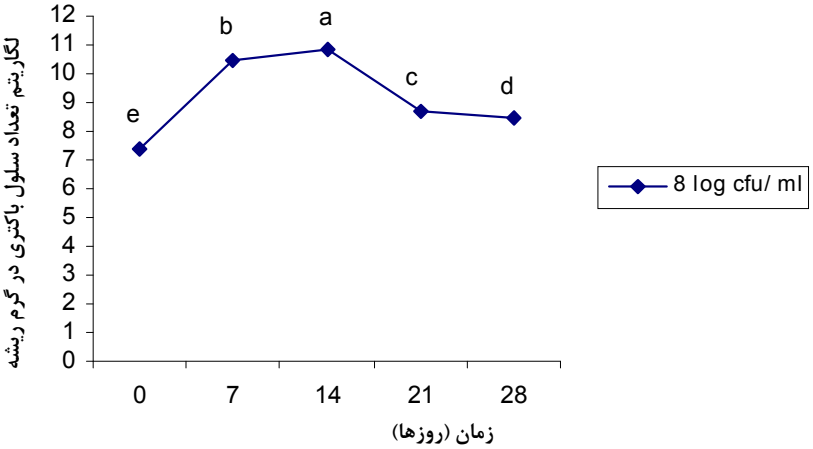
ریشه کلزا رسید. سپس بعد از اتمام هفته دوم، باکتری دارای تراکم جمعیت $۴/۴۶\times۱۰^{۹}$ بود و افزایش کمی را نشان داد. بعد از گذشت ۲۱ روز، میزان کلنیزاسیون باکتری برروی ریشه کلزا سیر نزولی را نشان داد و از سطح جمعیت $۴/۴۶\times۱۰^{۹}$ در انتهای هفته دوم، به $۸/۹۲\times۱۰^{۸}$ تقلیل یافت (شکل ۲).

بررسی الگوی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین UTPF86 در حضور قارچ *R. solani*

همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد مقایسه میزان کلنیزاسیون ریشه کلزا در حضور قارچ *R. solani* نشان داد پس از طی ۷ روز جمعیت باکتری در حضور بیمارگر افزایش بسیاری را نشان داد و میزان جمعیت باکتری از $۲/۵۲\times۱۰^{۷}$ روی بذور به $۲/۸۱\times۱۰^{۱۰}$ روی ریشه‌های کلزا رسید. در این راستا، پس از گذشت ۱۴ روز تراکم جمعیت باکتری روند رو به رشدی را طی نمود و با جمعیت $۷/۰۷\times۱۰^{۱۰}$ در حضور قارچ، ریشه‌ها را کلنیزه نمود. در ادامه، نتایج به دست آمده از بررسی کلنیزاسیون پس از ۲۱ روز بیانگر سیر نزولی قابل ملاحظه‌ای در جمعیت باکتری بود و جمعیت به $۴/۹\times۱۰^{۸}$ تقلیل یافت پس از گذشته ۲۸ روز، باکتری در خاک آلوده به ریزوکتونیا توانست با کاهش نامحسوسی نسبت به مقدار جمعیت در انتهای هفته سوم ریشه کلزا را کلنیزه نماید و با جمعیت $۲/۸۱\times۱۰^{۸}$ روی ریشه‌ها استقرار یابد.



شکل ۲- الگوی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین UTPF86 در شرایط عاری از بیمارگر در طی ۴ هفته



شکل ۳- الگوی کلنیزاسیون ریشه کلزا توسط استرین UTPF86 در شرایط حضور بیمارگر در طی ۴ هفته

بحث

به منظور محافظت کافی و مناسب ریشه در مقابل حمله میکروارگانیزم‌های بیمارگر، عوامل آنتاگونیست باید بتوانند خود را در ریزوسفر مستقر نمایند. باکتری‌های آنتاگونیست باید قادر به کلنیزه نمودن منطقه ریزوسفر باشند تا بتوانند در فرآیند بیوکنترل نقش مؤثری ایفا نمایند (De Weert & Bloemberg, 2006)، و توانایی یک باکتری برای کلنیزاسیون ریشه شرط لازم برای فعالیت کنترل بیولوژیک علیه قارچ‌های بیمارگر به شمار می‌رود (Keel & D'efago, 1997).

در این پژوهش برای انتخاب استرین برتر باکتریایی به منظور بررسی کلنیزاسیون ریشه کلزا، آزمایشات گلخانه‌ای اولیه انجام گردید. نتایج آزمایشات گلخانه‌ای روی سطح بازدارندگی چهار استرین باکتریایی در مقابل عامل بیماریزای *R. solani* مشخص کرد استرین‌های UTPF86 به میزان ۶۹٪ باعث کاهش بیماری گردید که با شاهد آلوده اختلاف قابل ملاحظه‌ای را نشان دادند. همچنین نتیجه مقایسه میزان کلنیزاسیون ۱۴ استرین سودوموناس فلورسنس در شرایط گلخانه نشان داد استرین UTPF86 دارای بالاترین مقدار کلنیزاسیون با جمعیت $۶/۴۶\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری برروی هر گرم ریشه کلزا بود. ریشه گیاهان ظرفیت معینی از نظر میزان کلنیزاسیون را دارند. سودوموناس‌های فلورسنت ریشه گندم را جمعیت $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۶}$ سلول باکتری در هر گرم ریشه کلنیزه می‌کنند (Vincent *et al*., 1991). جمعیت‌های کمتر از مقدار قادر به تأثیر مثبت روی گیاه و بیوکنترل نمی‌باشند (Weller *et al*., 2002).

پس از انتخاب استرین برتر UTPF86، آزمایشات گلخانه‌ای نهایی برای بررسی کلنیزاسیون ریشه کلزا انجام گرفت. ارزیابی جمعیت کلنیزه کننده بذور کلزا نشان داد هنگامی که باکتری با جمعیت $۱۰^{۸}$ مایه‌زنی می‌گردد، قادر است به میزان $۲/۵۲\times۱۰^{۷}$ سلول باکتری بر گرم بذر، بذور کلزا را کلنیزه نمایند و به نظر می‌رسد این کاهش جمعیت یا به علت از بین رفتن تعدادی از سلولهای باکتری و یا عدم توانایی آنها در چسبندگی و استقرار روی بذور است.

بررسی‌های گلخانه‌ای روی میزان کلنیزاسیون در طی چهارهفته نشان داد در طی هفته اول و دوم کلنیزاسیون در خاک عاری از بیمارگر به‌طور معنی‌داری افزایش نشان داد. سپس بعد از گذشت هفته سوم و چهارم کلنیزاسیون سیر نزولی را طی نمود و در حدود ۱ واحد لگاریتمی به ازای هر هفته کاهش یافت. این نتایج با یافته‌های Yan *et al*. (2003) مطابقت داشت. آنها نشان دادند جمعیت باکتری به طور معنی‌داری در حدود ۲ واحد لگاریتم بعد از ۲۸ روز کاهش یافت.

نتایج به طور واضحی دلالت دارد بر اینکه استرین UTPF86 می‌تواند به خوبی ریشه‌های کلزا را کلنیزه نماید و در منطقه ریزوپلان بقا پیدا کند، هرچند که توانایی کلنیزاسیون این استرین با گذشت زمان کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد کاهش معنی‌دار کلنیزاسیون ریشه با زمان، مربوط به عملکرد ریشه که در طی چهار هفته طول آن به طور سریع افزایش می‌یابد، می‌باشد. همچنین محققین اظهار می‌دارند با توجه به اینکه ترشحات ریشه به عنوان منبع غذایی میکروارگانیزم‌های ریزوسفر بوده و ترکیب این ترشحات تحت تأثیر مراحل رشدی گیاه می‌باشد، لذا باعث تغییراتی در الگوها و فعالیت‌های جمعیت ریزوباکترها می‌گردد (Picard *et al*., 2000).

بر همکنش بین گیاهان و میکروارگانیزم‌ها بسیار پیچیده بوده و عوامل متعددی در آن دخیل می‌باشد. حضور بیمارگر از دیگر عوامل مؤثر در میزان کلنیزاسیون ریشه می‌باشد. وجود بیمارگر به عنوان یک فاکتور محیطی زنده می‌تواند توانایی کلنیزاسیون یک آنتاگونیست را تحت تأثیر قرار دهد. برای مطالعه اثر بیمارگر در فراوانی جمعیت باکتری، تغییرات تجمع میکروبی ریزوپلان کلزا وقتی که ریشه‌های کلزا از یک وضعیت سالم به وضعیت بیمار می‌روند، بررسی گردید و تفاوتهای معنی‌داری در تنوع جمعیت باکتری روی ریشه کلزا در حضور قارچ *R. solani* مشاهده گردید و مشخص شد فراوانی جمعیت باکتری در ریزوپلان گیاه بیمار بیشتر از ریزوپلان گیاه سالم بود.

بر اساس نتایج محاسبه جمعیت باکتری روی ریشه‌های کلزا پس از چهار هفته در خاک آلوده به ریزوکتونیا می‌توان گفت که استرین UTPF86 نه تنها جمعیت اولیه خود را حفظ نمود، بلکه توانست پس از گذشت ۲۸ روز در خاک آلوده ریشه‌های کلزا را با

جمعیت $۲/۸۱\times۱۰^{۸}$ سلول باکتری بر گرم ریشه کلنیزه نماید که نشانه توانایی این باکتری برای رقابت کلنیزه نمودن ریشه کلزا در خاک بود.

افزایش جمعیت باکتری در حضور قارچ، احتمالاً به خاطر ترکیبات بیشتری است که ریشه‌های آلوده ترشح می‌نمایند و در نتیجه مقدار زیادی مواد غذایی در دسترس باکتری‌ها قرار می‌گیرد. مناطقی از ریشه که به هر دلیلی زخم شده باشند کلنیزاسیون در آن ناحیه به خوبی صورت می‌گیرد، زیرا ترشحات ریشه راحت‌تر به بیرون تراوش می‌شوند (Zheng & Sinclair, 2000). کلنیزاسیون مناسب و سریع توسط باکتری آنتاگونیست برای قادر بودن از ممانعت و استقرار بیمارگر روی سیستم ریشه و آلودگی‌های بعدی ضروری و مهم می‌باشد (De Weert & Bloemberg, 2006).

در مطالعات بسیاری رابطه مستقیمی بین میزان جمعیت باکتری روی ریشه و کنترل بیماری به اثبات رسیده است. نتیجه مطالعات Weller (1983) نشان داد در حضور قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* جمعیت باکتری افزایش یافت. وجود یک زخم ناشی از فعالیت قارچ باعث ۱۰ برابر افزایش جمعیت باکتری گردید. لذا عامل بیمارگر در فراوانی جمعیت باکتری مؤثر است.

کلنیزاسیون می‌تواند فرایند محدودکننده‌ای در بیوکنترل *Pseudomonas chlororaphis* استرین PCL1391 باشد. استفاده از استرین PCL1391 که کلنیزاسیون ریشه آنها توسط موتانت در ژن‌های کلنیزاسیون کاهش یافته بود، نشان داد کلنیزاسیون برای توانایی بیوکنترل این استرین لازم و ضروری می‌باشد (Chin-A-Woeng *et al*., 2005).

سپاسگزاری

اعتبار این طرح از محل قطب کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی دانشگاه تهران تأمین شده است.

REFERENCES

1. Bull, C. T., Weller, D. M. & Thomashow, L. S. (1991). Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomanas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81, 954-959.
2. Chabot, R., Antoun, H., Klopper, J. W. & Beauchamp, C. J. (1996). Root colonization of maize and lettuce by bioluminescent *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2767-2772.
3. Chin-A-Woeng, T. F. C., van den Broek, D., Lugtenberg, B. J. J. & Bloemberg, G. V. (2005). The *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 sigma regulator psrA represses the production of the metabolite phenazine-1-carboxamide. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18, 244-253.
4. De Weert, S. & Bloemberg, G. V. (2006). Rhizosphere competence and the role of root colonization in biocontral. In: S. Gnanamanickam (Ed.), *Plant-Associated Bacteria*, (pp. 317-333). Springer.
5. Glandorf, D. C. M., Brand, I., Bakker, P. A. H. M. & Schippers, B. (1992). Stability of rifampicin resistance as a marker for root colonization studies of *Pseudomonas putida* in the field. *Plant and Soil*, 147, 135-142.
6. Keel, C. & D′efago, G. (1997). Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: Mechanisms and ecological impact. In: A. C. Gange and V. K. Brown (Eds.), *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. (P. 27-46). Blackwell Scientific Publishers, London.
7. Leben, S. D., Wadi, J. A. & Easton, G. D. (1987). Effects of *Pseudomonas fluorescens* on potato plant growth and control of *Verticillium dahliae*. *Phytopathology*, 77, 1592-1595.
8. Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & D′efago, G. (1994). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology*, 44, 40-50.
9. Notz, R., Maurhofer, M., Schnider-Keel, U., Duffy, B., Haas, D. & D′efago, G. (2001). Biotic factors affecting expression of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis gene *phlA* in *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain CHA0 in the rhizosphere. *Phytopathology*, 91, 873-881.
10. Parke, J. L. (1990). Pupulation dynamics of *Pseudomonas cepacia* in the pea spermosphere in relation to biocontrol of *Pythium*. *Phytopothology*, 80, 1307-1311.
11. Picard, C. F. D., Cello, I., Ventura, M., Fani, R. & Guckert, A. (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetyphloroglucinol production bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 948-955.

12. Schippers, B., Bakker, A. W. & Bakker, P. A. H. M. (1987). Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microrganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology*, 25, 339-358.
13. Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J., Kovacevich, P., Mukerji, P., Weller, D. M. & Pierson, E. A. (1991). Genetic analysis of the antifungal activity of a soil-borne *Pseudomonas aureofacience* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2928-2934.
14. Weller, D. M. (1983). Colonization of wheat roots by fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology*, 73, 1548-1553.
15. Weller, D. M. (1988). Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26, 379-407.
16. Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B. & Thomashow, L. S. (2002). Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 309-348.
17. Yan, Z., Reddy, M. S. & Kloepper, J. W. (2003). Survival and colonization of rhizobacteria in a tomato transplant system. *Canadian Journal of Microbiology*, 49, 383-389.
18. Zheng, X. Y. & Sinclair, J. B. (2000). The effects of traits of *Bacillus megaterium* on seed and root colonization and their correlation with the suppression of *Rhizoctonia* root rot of soybean. *Biocontrol*, 45, 223-243.