

بررسی تنوع فازی در *Pseudomonas fluorescens* B1 و تاثیر آن روی برخی ویژگی‌های رفتاری و بیوکنترلی باکتری*

رباب اعزازی^{۱*}، مسعود احمدزاده^۱، اکبر شیرزاد^۲، وحید فلاح‌زاده^۲ و کیوان بهبودی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴)

چکیده

یکی از مکانیسم‌های سازگاری سودوموناس‌های فلورسنت، پدیده تنوع فازی می‌باشد؛ این پدیده در اثر تغییرات ژنتیکی برگشت‌پذیر رخ داده که نتیجه آن ظهور زیرجمعیت‌های متنوع از یک باکتری با رفتارهای متفاوت می‌باشد که سبب بقا و سازگاری آنها با شرایط مختلف محیطی و تغییرات ناگهانی آنها می‌شود. در این تحقیق وقوع پدیده تنوع فازی در جدایه B1 باکتری *Pseudomonas fluorescens* (جدایه واجد ژن تنظیم کننده تنوع فازی) مشاهده شد. جدایه مزبور دارای دو تیپ کلونی بود، کلونی‌های تیپ وحشی کوچک و کدر بودند، در حالیکه کلونی تیپ ثانویه بزرگ‌تر بوده و شدت رنگ فلورسنس بیشتری داشتند. این دو تیپ از نظر تولید آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز، فسفاتاز و تولید متابولیت‌های سیانید هیدروژن، سیدروفور و اکسین و رفتارهای تحرک، تشکیل بیوفیلم و فعالیت ضدقارچی علیه چند قارچ بیماری‌زای گیاهی مورد مقایسه قرار گرفتند. تفاوت‌های رفتاری معنی‌داری بین دو تیپ مشخص گردید؛ هر دو تیپ توانایی تولید پروتئاز، لیپاز و فسفاتاز را داشتند اما تولید سیانید هیدروژن در تیپ ثانویه به شدت کاهش پیدا کرده و برعکس میزان سیدروفور و اکسین تولیدشده توسط این تیپ در مقایسه با تیپ وحشی افزایش پیدا کرده بود. میزان تحرک کلونی‌هایی تیپ ثانویه بسیار بیشتر از تیپ وحشی بوده ولی میزان تشکیل بیوفیلم توسط تیپ اولیه بیشتر از تیپ ثانویه بود. از نظر فعالیت ضدقارچی تیپ وحشی قوی‌تر از تیپ ثانویه عمل کرد. انگشت‌نگاری DNA به روش BOX-PCR شباهت کامل واریانت‌ها را با جدایه اولیه تایید کرد.

کلیدواژه: تفاوت رفتاری و بیوکنترلی، سودومونادهای فلورسنت، واریانت فنوتیپی

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارنده اول ارائه شده به پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: R.ezazi333@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

۲. استادیاران بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز.

Evaluation of phase variation in *Pseudomonas fluorescens* b1 and its effect on some bacterial phenotypic and biocontrol characteristics*

R. Ezazi^{1**}, M. Ahmadzadeh¹, A. Shirzad², V. Fallahzadeh², and K. Behbudi¹

(Received: 30.10.2012; Accepted: 3.2.2016)

Abstract

Phase variation is one of the adaptive mechanisms in fluorescent pseudomonads; this process caused by reversible genetic modification that generate subpopulation diversity with phenotypic differences that eventually lead to bacterial survival and their fitness under certain environmental conditions and is important in niche adaptation. In the present study, phase variation was observed in *P. fluorescens* strain B1 that carrying gene for phase variation. *P. fluorescens* B1 had two colony types, wild-type colony was small and opaque whereas the second type colony was larger in size and more fluorescent pigment production. These two types colony were tested for production of several enzymes such as protease, lipase, phosphatase and some metabolites production such as hydrogen cyanide, siderophore and auxin and for motility behaviors, biofilm formation and antagonistic activity against some phytopathogenic fungi. The results showed significant difference between the two types. Both of two types produced protease, lipase, phosphatase, but production of hydrogen cyanide in second type decreased strongly, in contrast production of siderophore and auxin in secondary type increased. The second cell types was more motile than the wild-type and biofilm formation in wild-type was more than the secondary type. Antifungal activity of wild-type was higher than the secondary type. DNA fingerprint using BOX-PCR confirmed the identity of the second colony type with the parental isolate.

Keywords: differences in behavior and biocontrol, fluorescent pseudomonads, phenotypic variants

* A Part of MSc. Thesis of the First Author, Submitted to College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran.

** Corresponding author's E-mail: R.ezazi333@gmail.com

1. Ph.D. Student, Prof. and Assoc. Prof. of Plant Pathology, Respectively, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran.

2. Assis. Prof. of Plant Pathology, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

مقدمه

می‌باشد که بوسیله جهش، بازآرایی یا تغییر دیگری در DNA ایجاد می‌شود (Henderson et al. 1999). پدیده تنوع فازی در جنس‌های باکتریایی مختلف با رفتارهای اکولوژیکی متفاوت (بیمارگرها، ساپروفیت‌ها و همزیست‌ها) توصیف شده است. این پدیده با تنظیم بعضی رفتارها و ویژگی‌های فنوتیپی باکتری منجر به افزایش تنوع درون جمعیت باکتریایی و در نتیجه افزایش شایستگی و سازگاری آنها با شرایط محیطی متغیر می‌گردد، بنابراین برای باکتری امکان کلنیزه کردن نیچ‌های مختلف و فرار از سیستم دفاعی میزبان را فراهم می‌سازد (Vial et al. 2010; Wisniewski-Dye & Vial 2008). این پدیده غالباً روی ویژگی‌های سطحی و ظاهری سلول باکتریایی تاثیر گذاشته و منجر به ظهور کلونی‌هایی با مورفولوژی متفاوت مانند پیللی نوع I در *Escherichia coli* (Abraham et al. 1985)، تازک در *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*، پروتئین‌های غشای بیرونی در *Helicobacter pylori*، خصوصیات سطحی سلول در *Shigella flexner* (Mills et al. 1992)، تشکیل بیوفیلم در *Staphylococcus epidermis* (Ziebeuhr et al. 1997) و سنتز کپسول در *Streptococcus pneumoniae* می‌گردد. تغییر فنوتیپی ناشی از این پدیده معمولاً برگشت‌پذیر می‌باشد ولی در مواردی هم برگشت به حالت اولیه مشاهده نمی‌شود (Wisniewski-Dye & Vial 2008). وقوع پدیده تنوع فازی در سودومونادهای فلورسنت نیز گزارش شده است؛ باکتری *P. fluorescens* SBW25 زمانی که در محیط مایع در حال سکون کشت داده شد، سه زیر جمعیت از آن مشاهده گردید که نواحی مختلف محیط شامل قسمت‌های سطحی، میانی و عمقی را اشغال کرده بودند (Rainy & Travisano 1998). در باکتری *P.*

استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست از جمله سودومونادهای فلورسنت به منظور حفاظت گیاهان بخصوص علیه بیماری‌های خاکزاد به عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی مطرح است (Dekkers et al. 2003). توانایی کنترل قارچ‌های بیماریزا به وسیله عوامل میکروبی به ویژگی‌های متعددی از جمله تولید متابولیت‌های ضد قارچی، تولید آنزیم‌های خارج سلولی از قبیل پروتئاز، لیپاز، کیتیناز و گلوکوناز (Buchenaer 1998; Dunlap et al. 1998 and Trejo et al. 1998)، تولید سیانید هیدروژن (Voisard et al. 1989)، سیدروفور (Leong 1986) و بیوسورفکتانت (Stanghellini & Miller 1997) بستگی دارد.

اگرچه مکانیسم‌های بیوکنترل پیچیده و متنوع هستند، اما جهت نیل به بیوکنترل موفق لازم است عوامل بیوکنترل در زمان مناسب و در مکان مناسب حضور داشته باشند؛ این موضوع بیانگر اهمیت مسئله کلینزاسیون می‌باشد (Dekkers et al. 2003). ریزوسفر یک محیط بسیار غنی از نظر مواد غذایی می‌باشد که میکروارگانیسم‌های خاک جهت تامین منبع انرژی خود و به دست آوردن نیچ اکولوژیکی مناسب برای استقرار رقابت شدیدی برای تصرف آن دارند. بقا میکروارگانیسم‌ها در این محیط دینامیک به توانایی سازگاری آنها با شرایط ریزوسفر بستگی دارد. میکروارگانیسم‌ها راهکارهای مختلفی برای پاسخ به تغییرات محیطی و سازگاری با آن دارند. از موفق‌ترین میکروارگانیسم‌های ناحیه ریزوسفر جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* می‌باشند که تنوع فازی یکی از مکانیسم‌های سازگاری آنها می‌باشد (Achouak et al. 2004). تنوع فازی یک فرآیند برگشت‌پذیر با فراوانی بالا

از قبیل سیانید هیدروژن، پایووردین، آنزیم‌های برون‌سلولی نظیر پروتئاز و تشکیل بیوفیلم را تنظیم می‌کند. به نظر می‌رسد برخی از جهش‌های تصادفی در ژن‌های *gacA/gacS* به واسطه آنزیم رکامیناز جایگاه ویژه کنترل می‌شود، هر چند که تاکنون مکانیسم مولکولی آن شناسایی نشده است (van den Broek et al. 2005).

هدف از این پژوهش ردیابی ژن *sss* در چند جدایه دارای فعالیت بیوکنترلی *P. fluorescens* و بررسی وقوع پدیده تنوع فازی در جدایه واجد ژن مزبور و مقایسه برخی ویژگی‌های مورفولوژیکی و رفتارهای بیوکنترلی متأثر از این پدیده در واریانت‌های فنوتیپی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری جدایه‌های بیوکنترل:

در این تحقیق نه جدایه *P. fluorescens* که قبلاً خواص بیوکنترلی آنها مورد بررسی قرار گرفته بود، از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران و آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان دریافت گردید (جدول ۱). باکتری‌ها در محیط (KB) King's B کشت داده شدند. برای نگهداری کوتاه مدت جدایه‌ها، از محلول ۰/۱ مولار $MgSO_4$ استفاده شد. به منظور نگهداری بلند مدت، کشت مایع ۱۶ تا ۲۴ ساعته باکتری در محیط KB به نسبت حجمی ۴۰ درصد با گلیسرول سترون در درون ویال‌های اپندورف مخلوط شده و در فریزر $20^{\circ}C$ - نگهداری شدند (McSpadden et al. 2000).

تهیه و نگهداری قارچ‌های بیمارگر:

سه قارچ بیماریزای *Fusarium culmorum* (Wm.G.

brassicasearum NFM421 که کلنیزه کننده قوی ریزوسفر آرابیدوپسیس و کلزا می‌باشد، پدیده تنوع فازی منجر به ظهور واریانت‌هایی شده است که از نظر مورفولوژی و نواحی کلنیزه‌شده ریشه با هم تفاوت دارند. واریانت‌های حاصله قسمت‌های جوان و نوک ریشه را کلنیزه می‌کنند که با تولید زیاد پروتئین فلاژلین و در نتیجه افزایش تحرک مرتبط است (Achouak et al. 2004). در *P. fluorescens* F113 تنوع فازی هنگام کلنیزاسیون ریشه اتفاق افتاده و سه واریانت S، C و F جداسازی شده‌اند که از نظر مورفولوژیکی، تولید پروتئاز، سیدروفور پایووردین و سیانید هیدروژن، تحرک و بیان ژن *flic* (یکی از ژن‌های کدکننده پروتئین فلاژلین) با هم تفاوت داشته‌اند (Sanchez-Contreras 2002).

از نظر ژنتیکی این پدیده تحت تنظیم ژن *sss* می‌باشد؛ این ژن یک نوع آنزیم رکامیناز جایگاه ویژه (Site Specific Recombinase) را کد می‌کند. فعالیت آنزیم مزبور منجر به بروز نوترکیبی برگشتی حفاظتی بدون نیاز به سنتز DNA در ناحیه بین دو قطعه کوچک همولوگ (حدود ۱۵ جفت باز) می‌شود؛ بسته به موقعیت این دو توالی همولوگ، فعالیت آنزیم سبب وارونگی یا حذف ناحیه ۱۵ جفت بازی می‌شود (Lugtenberg & Dekkers 1999). ژن *xerC* در *E. coli* همولوگ ژن *sss* می‌باشد که هر دو متعلق به خانواده λ integrase می‌باشد و همزمان دارای خاصیت اندونکلئازی و ایتنگرازی می‌باشند (Dekkers et al. 1998; Martinez-Granero et al. 2005). در واقع بازآرایی DNA در نتیجه فعالیت این آنزیم منجر به وقوع پدیده تنوع فازی می‌شود که در باکتری‌های مختلف، رفتارها و صفات متفاوتی را تحت تاثیر قرار می‌دهند (Lugtenberg & Dekkers 1999).

سیستم تنظیمی *GacA/GacS* تولید متابولیت‌های ثانویه

جدول ۱: فهرست میزبانان و مکان جداسازی جدایه‌های *P. fluorescens*

Table1: List of hosts and geographical origins of bacterial isolates

Bacterial isolate	Location of isolation	Host	Remarkable trait	received from
<i>P. fluorescens</i> 34B	Sarab	Wheat	<i>phz</i> +	1*
<i>P. fluorescens</i> 8B	Maragheh	Wheat	<i>phz</i> +	1
<i>P. fluorescens</i> F70	Mashhad	Wheat	<i>phlD</i> +	1
<i>P. fluorescens</i> F23	Mashhad	Wheat	<i>phlD</i> +	1
<i>P. fluorescens</i> UTPf5	Rafsanjan	Pistachio	<i>phlD</i> +	2
<i>P. fluorescens</i> UTPf68	Mazandaran	Canola	<i>phlD</i> +	2
<i>P. fluorescens</i> B1	Karaj	Wheat	<i>phlD</i> +	2
<i>P. fluorescens</i> B6	Karaj	Wheat	<i>phlD</i> +	2
<i>P. fluorescens</i> CHA0	Switzerland	Tobacco	<i>phlD</i> +	2

* ۱: جدایه‌های دریافت شده آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

2: جدایه‌های دریافت شده از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران

phz+: واجد ژن کد کننده فنازین*phlD*+: واجد ژن کد کننده DAPG

همکاران (Wang *et al.* 2001) انجام گردید. تکثیر DNA با استفاده از آغازگر مستقیم B2BF و آغازگر معکوس BPR4 (جدول ۲) انجام شد. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مول، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر ۱۰ پیکومول، ۰/۳ میکرولیتر پلیمرز تک (Taq Polymerase)، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی‌مولار و ۴ میکرولیتر DNA الگو در ۱۰/۱ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. تکثیر DNA در دستگاه ترموسایکلر مدل TGRADIENT (Biometra آلمان) انجام گرفت. برنامه حرارتی PCR به صورت یک چرخه واسرشت

F. oxysporum Schlecht. Emend. (Sm.) Sacc. و Snyder & Hansen *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) و Shoemaker از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و *Phytophthora drechsleri* Tucker از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران دریافت شد، نگهداری سه قارچ اول در روی کاغذ صافی و *P. drechsleri* در آب مقطر استریل انجام شد (ارشاد، ۱۳۷۱).

ردیابی ژن *phlD* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

استخراج DNA باکتری‌ها مطابق روش ونگ و

جدول ۲: نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در PCR برای ردیابی ژن‌های *phlD* و *sss* و بررسی تنوع ژنتیکی واریانت‌های فنوتیپی*P. fluorescens* B1Table2: Name and sequence of primers used in PCR for detection of *phlD* and *sss* genes and for evaluation of genetic diversity of *P. fluorescens* B1 phenotypic variants

genes	Primers	Sequence	Reference
<i>phlD</i>	B2BF (forward)	5'-ACCCACCGCAGCATCGTTTATGAGC-3'	McSpadden Gardener <i>et al.</i> 2001
	BPR4 (reverse)	5'-CCGCCGGTATGGAAGATGAAAAAGTC-3'	
<i>sss</i>	SSS UP (forward)	5'-CGT CTT TCG CAC CTG ATG GA-3'	Mavrodi <i>et al.</i> 2006
	SSS LOW (reverse)	5'-CCT GGG ATG GGC ACT GTC A'-3	
BOX 626	BOX (forward/ reverse)	5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG'-3	McSpadden Gardener <i>et al.</i> 2000

۴۸ ساعت در دمای 28°C نگهداری شده و واریانت‌های فنوتیپی در حال رشد مشخص و انتخاب گردید.

ارزیابی تولید برخی متابولیت‌های ضدقارچی

توانایی تولید آنزیم پروتئاز در واریانت‌ها مطابق روش مارهوفر و همکاران (Maurhofer et al. 1995) صورت گرفت. تشکیل هاله شفاف در اطراف کلونی‌های باکتری، پس از یک هفته رشد روی محیط شیر بدون چربی-آگار (Skim milk Agar) نشانه داشتن آنزیم پروتئاز تلقی گردید.

ارزیابی فعالیت لیپازی در محیط حاوی توئین ۸۰ (Tween 80) صورت گرفت (Schaad et al. 2001). تولید هاله کدر یا نقاط رسوبی در اطراف توده کشت شده باکتری پس از یک هفته نشانه تولید لیپاز محسوب گردید.

بررسی توانایی محلول کردن فسفات معدنی:

محیطی شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم، ۰/۵ گرم فسفات کلسیم، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم و ۱۵ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و باکتری به صورت نقطه‌ای روی آن کشت داده شده و در دمای 28°C نگهداری شد. پس از ۴۸ ساعت قطر هاله شفاف در اطراف کلونی که نشان دهنده خاصیت حل‌کنندگی فسفات بود، اندازه گرفته شد (Sperber, 1958).

تولید سیانید هیدروژن:

تعیین توان تولید سیانید هیدروژن (HCN) با استفاده از روش اصلاح شده آلستروم و بورنز (Alstrom & Burns 1989) انجام گردید. محیط TSB (Tryptic Soy Broth) حاوی ۴/۴ گرم گلايسين و ۱۵ گرم آگار در لیتر به کار

سازی در دمای 94°C به مدت سه دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۶۰ ثانیه در 94°C ، ۶۰ ثانیه در 55°C و ۶۰ ثانیه در 72°C و در پایان یک چرخه 72°C به مدت ۱۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت (McSpadden, Gardener et al, 2001).

ردیابی ژن *sss* در برخی از جدایه‌های *P. fluorescens*

آغازگرهای SSS-UP و SSS-LOW (جدول ۲) برای تکثیر ژن *sss* از شرکت تکاپوزیست (تهران) تهیه شدند. برنامه حرارتی PCR به صورت یک چرخه واسرشت سازی در دمای 94°C به مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس ۳۲ چرخه شامل برنامه ۳۰ ثانیه در 94°C ، ۳۰ ثانیه در 55°C و ۶۰ ثانیه در 72°C و در پایان یک مرحله تکثیر ده دقیقه‌ای در دمای 72°C مورد استفاده قرار گرفت (Mavrodi et al. 2006). محصول PCR در ژل آگارز ادرصد به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۷۵ ولت الکتروفورز شدند و نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentation (مدل Bio Doc Analyze، آلمان) بررسی شد.

بررسی تنوع فازی در شرایط آزمایشگاه

جدایه واجد ژن *sss* برای بررسی تنوع فازی انتخاب گردید. یک کلونی از کشت ۴۸ ساعته آن در محیط KB به ۵ میلی‌لیتر محیط NBY (Nutrient broth yeast extract) انتقال داده شده و ظرف کشت به مدت ۱۲ ساعت در روی شیکر انکوباتور با دور 120rpm در دمای 28°C و در ادامه به مدت ۴۸ ساعت در حالت سکون نگهداری شدند. رقت‌های مناسب از کشت مایع تهیه و در محیط‌های KBA و SA (سوکروز: 20g/L ؛ آسپارژین: 2g/L ؛ K_2HPO_4 : 1g/L ؛ MgSO_4 : 0.5g/L و آگار: 15g/L) (Scher & Baker 1982) کشت داده شدند و به مدت ۷۲-

رسوب داده شدند. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر قرائت شد.

تولید اکسین (اینډول-۳-استیک اسید: IAA):

توانایی تولید اکسین توسط جدایه‌ها به روش پاتن و گلیک (Patten & Glic 2002) انجام شد؛ جدایه‌ها در محیط NBT (Nutrient broth+5mM L-tryptophan) به مدت ۴۸ ساعت روی شیکرانکوباتور با دور rpm ۱۲۰ و دمای °C ۲۷ رشد داده شدند. سپس به مقدار ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری کردن با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و ۱ میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی با ۴ میلی‌لیتر محلول معرف سالکوفسکی (Salkowfski) مخلوط و پس از ۲۵ دقیقه جذب نوری رنگ ایجاد شده به وسیله اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان تولید اکسین هر واریانت بر اساس منحنی استاندارد که قبلاً تهیه شده بود و با استفاده از رابطه $Y = 48.64 X + 2.74$ محاسبه شد که در این معادله، Y بیانگر میزان اکسین تولید شده و X بیانگر مقدار عددی جذب نوری در طول موج ۵۳۵ نانومتر می‌باشد. برای رسم منحنی استاندارد IAA، از اینډول-۳-استیک اسید خالص استفاده شد. جذب‌های نوری در طول موج nm ۵۳۵ یک ساعت بعد از اضافه کردن معرف سالکوفسکی به غلظت‌های مختلف IAA به دست آمده و با کمک نرم‌افزار Excel نمودار استاندارد برحسب میزان جذب نوری بر غلظت IAA رسم گردید.

بررسی شدت تحرک واریانت‌های جدایه P.

fluorescens B1 (شناوری، توده‌ای، ناگهانی)

تعیین تحرک واریانت‌های فنوتیپی با استفاده از محیط KB و SA حاوی درصدهای مختلف آگار شامل ۰/۳، ۰/۵

برده شد و از کاغذ صافی آغشته به اسید پیکریک ۰/۵٪ و بیکرینات سدیم ۲٪ به عنوان معرف (در قسمت درب پتری‌دیش) استفاده شد. جمعیت یکسانی از هر واریانت در هر پتری‌دیش کشت داده شده و تشتک‌های پتری با نوار پارافیلیم مسدود شدند تا از خروج متابولیت‌های فرار جلوگیری شود؛ سپس پتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت به صورت وارونه درانکوباتور نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف از رنگ زرد اولیه به رنگ کرم (I)، یا قهوه‌ای روشن (II)، یا قهوه‌ای تیره (III) و یا آجری (IV) به عنوان تولید مقادیر نسبی سیانید هیدروژن ارزیابی گردید.

تولید سیدروفور:

تولید سیدروفور مطابق روش الکساندر و زوبر (Alexander & Zuberer 1991) در محیط آبی رنگ CAS (Chrome azurol-S) انجام شد. باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای در محیط مزبور کشت و تشتک‌ها در دمای °C ۲۷ نگهداری شد؛ قطر هاله نارنجی ایجاد شده در اطراف کلونی باکتری‌ها، در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. برای تعیین کمی میزان سیدروفور تولیدی از روش کاستاندا و همکاران (Csataneda et al. 2005) استفاده شد. صد میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته در محیط مایع سوکسینات (۴ گرم سوکسینیک اسید، ۱ گرم سولفات آمونیوم، ۶ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات، ۳ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر شده، pH ۷) به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط سوکسینات منتقل شده و به مدت ۴۰ ساعت روی شیکرانکوباتور با دور rpm ۱۲۰ و دمای °C ۲۷ رشد داده شدند، سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ کردن در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه

روی چاهک‌ها قابل مشاهده بود. سنجش کمی تولید بیوفیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳ درصد به هر چاهک و خواندن جذب نوری (OD) کریستال ویوله موجود در حلال در طول موج ۴۹۲ nm توسط دستگاه ELISA reader خوانده شد (Fletcher, 1977).

مقایسه بازدارندگی از رشد قارچ‌های بیماریزای گیاهی به وسیله واریانت‌های فنوتیپی

میزان بازدارندگی قارچ‌های بیماریزگر به وسیله واریانت‌های فنوتیپی به روش کشت متقابل (Hagedorn et al. 1998) در محیط Waksman (۵ گرم پروتئوز پیتون، ۱۰ میلی لیتر گلیسرول، ۳ گرم عصاره گوشت، ۵ گرم کلرید سدیم و ۱۵ گرم آگار در لیتر آب مقطر؛ pH ۶/۷) و محیط PDA (برای قارچ *P. drechsleri*) ارزیابی شد. یک لوپ باکتری از کشت تازه باکتری در محیط KB، برداشته و به صورت نقطه‌ای به قطر حدود ۴ میلی متر و به فاصله نیم سانتی متری از لبه تشتک پتری به صورت سطحی کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ °C نگهداری شد؛ سپس یک دیسک میسلومی به قطر شش میلی متر از کشت شش روزه قارچ‌های مزبور در مرکز پتری دیش‌های حاوی باکتری قرار داده شد و تشتک‌ها در دمای ۲۸ °C نگهداری شدند؛ از آب مقطر استریل به عنوان شاهد استفاده شد. میزان رشد میسلیوم قارچ و فاصله کلونی قارچ تا حاشیه کلونی باکتری از روز سوم به بعد اندازه‌گیری شد. این آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

انگشت نگاری DNA واریانت‌های فنوتیپی با استفاده از

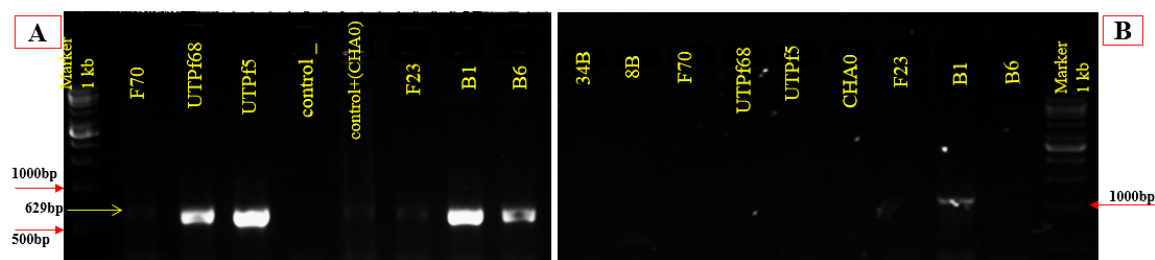
نشانگر مولکولی BOX-PCR

پس از مشاهده تنوع فازی و تفاوت‌های رفتاری در جدایه واجد ژن SSS برای تایید اینکه واریانت‌های فازی

و ۱ درصد مطابق روش رشید و کورنبرگ (Rashid & Kornberg 2000) انجام شد. محیط SA با غلظت ۰/۳٪ آگار برای آزمون شناوری (swimming)، محیط KB با غلظت ۰/۵٪ آگار به منظور بررسی حرکت توده‌ای (swarming) و با غلظت ۰/۱٪ آگار برای بررسی توانایی حرکت ناگهانی (twitching) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور انجام آزمون‌های شناوری و ناگهانی با خلال دندان سترون مقداری از کلونی تازه باکتری برداشته شده و به حالت فرو بردن (stab inoculation) در تشتک‌های پتری مایه‌زنی شدند، در آزمون حرکت توده‌ای یک لوپ پراز باکتری در سطح محیط مایه زنی شد. تشتک‌های پتری با پارافیلیم مسدود شدند؛ تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ °C نگهداری و قطر کلونی پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت اندازه‌گیری شد. آزمایش در سه تکرار انجام گردید.

بررسی تشکیل بیوفیلم:

کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته از هر جدایه در محیط کشت NB آماده گردید و سوسپانسیونی از آن با جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ nm با افزودن محیط کشت NB استریل تهیه شد. از این سوسپانسیون میزان ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک میکروپلیت انتقال داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول مواد غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهک‌ها خارج شد و پس از سه مرتبه شست و شوی چاهک‌ها با ۳۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۹ درصد (وزنی/حجمی) NaCl سترون و با اتانول ۹۶ درصد، رنگ‌آمیزی با ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۰/۲٪ (حل شده در آب مقطر) به مدت پنج دقیقه انجام شد. بعد از شستن رنگ‌های اضافی با قرار دادن پلیت‌ها در مسیر جریان آب لوله شهری، پلیت‌ها در دمای آزمایشگاه خشک شدند. بیوفیلم‌ها به صورت حلقه‌های ارغوانی رنگی بر



شکل ۱: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت غربال ژن سنتز کننده آنتی‌بیوتیک DAPG، تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۲۹ جفت باز مربوط به ژن

phlD (A) و ژن تنظیم کننده پدیده تنوع فازی، تکثیر قطعه‌ای به طول ۹۹۴ جفت باز مربوط به ژن *sss* در جدایه B1 (B)

Fig1: Polymerase chain reaction (PCR) tests for detection of the gene involved in DAPG production, amplification of 629-bp portion of *phlD* gene (A) and the gene regulating phase variation, amplification of 994-bp portion of *sss* gene in B1 isolate (B)

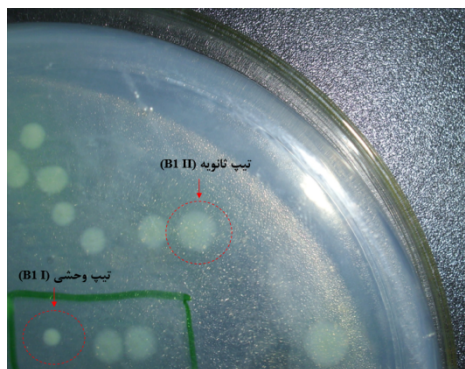
نتایج و بحث

جدایه‌های سودوموناس تولید کننده ترکیب ۲ و ۴-دی‌استیل‌فلوروگلوکوسینول (2,4-diacetylphloroglucinol) (DAPG)) از مهم‌ترین عوامل کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی محسوب می‌شوند. ژن *phlD*، یکی از ژن‌های مورد نیاز برای تولید DAPG می‌باشد و به دلیل حفاظت شدگی بسیار زیاد، به عنوان یک مارکر شناسایی سودومونادهای فلورسنت به کار رفته و در تحقیقات فیلوژنتیکی نیز کاربرد دارد (McSpadden Gardener *et al.* 2001). از بین نه جدایه *P. fluorescens* مورد استفاده، هفت جدایه واجد ژن تولید کننده ۲ و ۴-دی‌استیل‌فلوروگلوکوسینول (DAPG) بودند که ردیابی ژن بیوسنتز این آنتی‌بیوتیک (*phlD*) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت (شکل 1A)؛ نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که در اکثر موارد، بین ردیابی ژن‌های سنتز کننده DAPG با تولید آنها که با روش‌های HPLC اندازه‌گیری می‌شوند، همبستگی مثبتی وجود دارد (Mavrodi *et al.* 2001). دو جدایه 8B و 34B نیز تولید کننده آنتی‌بیوتیک فنازین می‌باشند که ردیابی ژن تولید کننده و همچنین میزان تولید آن توسط شیرزاد و همکاران بررسی شده است (Shirzad *et al.* 2012). مشخصات این جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است.

مشاهده شده متعلق به یک جدایه هستند، انگشت نگاری DNA با استفاده از نشانگر مولکولی BOX-PCR مطابق برنامه پیشنهادی مک‌اسپادن‌گادنر و همکاران (McSpadden Gardener *et al.* 2000) با کمی تغییر انجام گرفت. توالی آغازگر مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. برنامه دمایی برای BOX-PCR به صورت یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای 95°C به مدت ۷ دقیقه و سپس ۳۰ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در 94°C ، ۱ دقیقه در 47°C و ۸ دقیقه در 65°C و یک مرحله انتهایی در دمای 65°C به مدت ۱۶ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۱۴۰ ولت در بافر TAE 0.5X الکتروفورز شدند و نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentation بررسی شد (McSpadden Gardener *et al.* 2001).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (V 16.0) انجام گرفت. به منظور مقایسه میانگین داده‌ها بعد از آزمون نرمال بودن داده‌ها و آزمون همگنی واریانس از آزمون تی مستقل استفاده شد.



شکل ۲: ظهور دو نوع کلونی متفاوت در جدایه *P. fluorescens*

B1

Fig 2: Appearance two different colonies in *P. fluorescens* B1

هیدرولیز توئین ۸۰ را داشتند. آزمایشات وندن بروک و همکاران (۲۰۰۳) نشان داده است که واریانت‌های فنوتیپی پنج جدایه سودوموناس PCL 1159، PCL 1161، PCL 1166، PCL 1173 و PCL 1175 توانایی تولید آنزیم لیپاز را دارند.

توانایی حل کردن فسفات معدنی: هر دو واریانت (B1 I و B1 II) توانایی حل کردن فسفات معدنی را داشتند.

تولید سیانید هیدروژن: تولید HCN در واریانت B1 II به مقدار قابل توجهی کاهش پیدا نموده بود، در حالیکه تیپ وحشی (B1 I) توانایی بالایی در تولید HCN داشت. در آزمایش‌های سانچز و همکاران (Sanchez-Contreras *et al.* 2002) نیز واریانت F که تیپ ثانویه محسوب می‌شود، توانایی تولید HCN را از دست داده بود.

تولید سیدروفور: هر دو واریانت B1 I و B1 II سیدروفور تولید کردند، اما مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد (جدول ۳) که سیدروفور تولید شده به وسیله دو واریانت فنوتیپی با هم اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ داشتند (sig. = 0.025). در روش اسپکتروفتومتری، مقدار تولید سیدروفور نوع پایوردین به صورت اختصاصی،

ردیابی جدایه یا جدایه‌های واجد ژن *sss*

نتایج PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی *sss*-UP و *sss*-LOW که قطعه‌ای به طول ۹۹۴ جفت باز را تکثیر می‌کنند (Mavrodi *et al.* 2006)، نشان داد که از بین نه جدایه بیوکنترلی *P. fluorescens* مورد استفاده، جدایه *P. fluorescens* B1 واجد ژن *sss* می‌باشد (شکل 1, B). این جدایه مورد بررسی بیشتر قرار گرفت.

بررسی تنوع فازی در *P. fluorescens* B1 شرایط آزمایشگاه

متعاقب تولید فازهای فنوتیپی، دو نوع کلونی که از نظر ویژگی‌های مورفولوژیکی با هم تفاوت داشتند، مشاهده شد؛ کلونی‌های تیپ وحشی (B1 I) کوچک‌تر و کدرتر بوده و شدت فلورسانس کمتری نسبت به کلونی‌های فاز ثانویه (B1 II) داشتند (شکل ۲)، برعکس کلونی‌های فاز ثانویه بزرگ‌تر و شفاف‌تر بوده و شدت فلورسانس بیشتری داشتند. واریانت‌ها (تیپ وحشی و تیپ ثانویه) هر کدام جداگانه تکثیر و مطابق روش ذکر شده نگهداری گردیدند.

توانایی تولید برخی متابولیت‌های ضدقارچی توسط فازهای مختلف

تولید پروتئاز: هر دو واریانت B1 I و B1 II به یک اندازه توانایی تولید آنزیم پروتئاز را داشتند. این مورد با نتایج آزمایشات وندن بروک و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد که نشان دادند واریانت‌های فنوتیپی *Pseudomonas* شامل جدایه‌های PCL 1173، PCL 1161، PCL 1152 و PCL 1175 که از ریزسفر ذرت جداسازی شده بودند، به لحاظ توانایی تولید پروتئاز هیچ تفاوتی با هم نداشتند.

تولید لیپاز: واریانت‌های B1 I و B1 II توانایی

جدول ۳: آزمون تی مستقل مربوط به تولید سیدروفور و اکسین، تشکیل بیوفیلم، میزان تحرک واریانت‌های فنوتیپی *P. fluorescens* B1 و میزان بازدارندگی آنها از رشد چهار قارچ بیماری‌زای گیاهی در شرایط *in vitro*

Table 3: T independent test for siderophore and auxin production, biofilm formation, motility by phenotypic variants of *P. fluorescens* B1 and their growth inhibition against four phytopathogenic fungi *in vitro* condition

Type of variable	t-test for Equality of Means				
	t	df	Sig.	Mean Difference	Std. Error Difference
Diameter of the orange halo (mm) in CAS medium (after 72h)	-3.5*	4	0.025	-2.33	0.66
Pyoverdin production (Absorbance in 400nm)	-3.395*	4	0.027	-.576	0.169
IAA production	-2.505*	4	0.066	-2.72	1.08
Biofilm formation	-8.313 ^{ns}	4	0.001	-0.693	0.083
Diameter of the bacterial colony in 0.3% agar (Swimming test)	-11.667**	4	0	-11	0.942
Diameter of the bacterial colony in 0.5% agar (swarming test)	-12.5**	4	0	-8.33	0.66
Diameter of the bacterial colony in 1% agar (twitching test)	-4.95**	4	0.008	-2.33	0.471
Dual culture assay- against <i>F. oxysporum</i>	5.196**	4	0.007	3	0.557
Dual culture assay-against <i>F. culmoum</i>	5.5**	4	0.005	3.66	0.66
Dual culture assay-against <i>B. sorokiniana</i>	3.464*	4	0.026	2	0.557
Dual culture assay- against <i>P. drechsleri</i>	2.324 ^{ns}	4	0.081	3	1.29

علامت *, **, و ns به ترتیب بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و عدم تفاوت معنی‌دار می‌باشد.

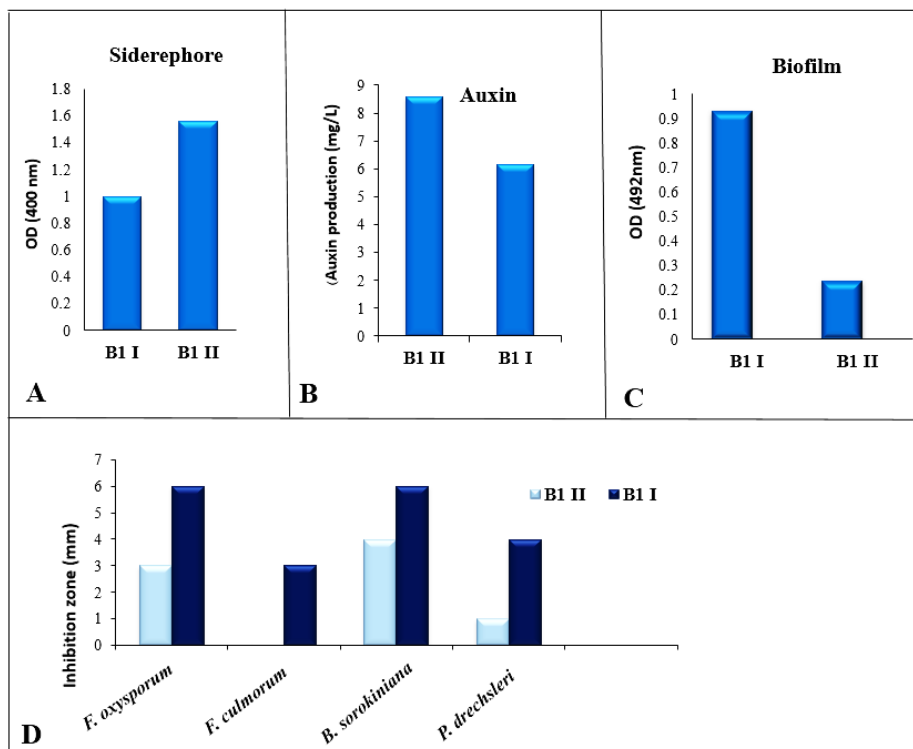
*, ** and ns represent significant at 1%, 5% and non-significant difference respectively.

است که جدایه‌هایی که اکسین بیشتری تولید می‌کنند، به مراتب تاثیر زیادی در مورفولوژی ریشه و نیز در میزان رشد گیاه نسبت به جدایه‌هایی که اکسین تولید نمی‌کنند یا اکسین کمتری تولید می‌کنند، دارند (Achouak et al. 2004).

میزان تحرک: حرکت شناوری (swimming)، حرکت توده‌ای (swarming) و حرکت ناگهانی (twitching) در سودوموناس‌ها توصیف شده است (Henrichsen 1972). حرکت شناوری و توده‌ای، وابسته به تاژک و حرکت ناگهانی وابسته به پیلی نوع چهار می‌باشد (Harshey 1994). در این پژوهش، تفاوت معنی‌داری در سطح ۱٪ بین واریانت‌های فنوتیپی جدایه B1 از نظر تحرک دیده نشان داد (جدول ۳)، سلول‌های تیپ ثانویه (B1 II)، میزان تحرک بیشتری در هر سه نوع حرکت نسبت به تیپ وحشی داشتند. این رفتار در استرین F113 مشاهده شد و تیپ ثانویه تحرک بیشتری داشت، رفتار پر تحرکی در این استرین مربوط به افزایش تولید پروتئین فلاژلین کدشده به

اندازه‌گیری شد. میانگین میزان جذب نوری سیدروفور تولید شده به وسیله دو واریانت فنوتیپی تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ بین آنها داشت (جدول ۳) و میزان سیدروفور پایووردین تولید شده به وسیله تیپ ثانویه (B1 II) بیشتر از تیپ وحشی (B1 I) می‌باشد. در توصیف کلونی‌های B1 II هم ذکر شد که این فنوتیپ اندازه بزرگتر و شدت فلورسانس بالاتری نسبت به تیپ وحشی دارد. در آزمایش‌های سانچز و همکاران (۲۰۰۲) در مورد واریانت‌های فنوتیپی *P. fluorescens* F113 هم مشاهده گردید که واریانت C (تیپ وحشی)، پایووردین کمتری نسبت به واریانت F (تیپ ثانویه) تولید می‌کند (Sanchez-Contreras et al. 2002).

تولید اکسین: نتایج حاصل از مقایسه میانگین میزان اکسین تولید شده (جدول ۳) نشان داد که میزان اکسین تولیدی دو واریانت از نظر آماری تفاوتی با هم ندارند هرچند میزان اکسین تولید شده به وسیله تیپ ثانویه بیشتر از تیپ اولیه می‌باشد (شکل ۳، B). مطالعات نشان داده



شکل ۳: مقایسه میزان جذب نوری سیدروفور تولید شده (A)، میزان اکسین تولیدشده (B) و بیوفیلم تشکیل شده (C) به وسیله واریانت‌های فنوتیپی. مقایسه فاصله بازدارندگی واریانت‌های فنوتیپی *P. fluorescens* B1 از رشد قارچ‌های بیماری‌زا (D)

Fig 3: Comparison of produced siderophore absorbance (A), amount of produced auxin (B) and biofilm formation (C) by phenotypic variants of *P. fluorescens* B1. Comparison of inhibitory zone of pathogenic fungi by phenotypic variants (D)

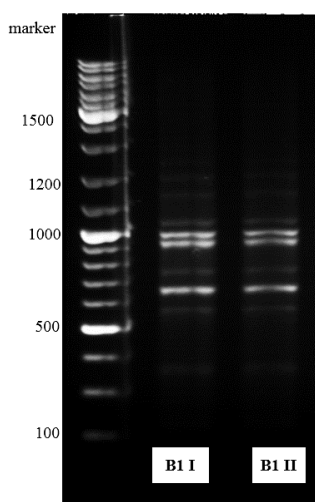
حفاظت در مقابل شرایط محیطی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها، قابلیت استفاده از مواد غذایی و همکاری متابولیکی برای باکتری دارد (Morris & Monier, 2003). در بررسی حاضر، واریانت‌های فنوتیپی جدایه B1 از نظر میزان تشکیل بیوفیلم تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ با هم داشتند (جدول ۳). تیپ وحشی (B1 I) میزان چسبندگی بیشتری به سطح میکروپلیت نسبت به تیپ ثانویه داشت (شکل ۳، C) (این رتبه بندی بر اساس میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر می‌باشد).

مقایسه میزان بازدارندگی از رشد چند قارچ بیماری‌زای گیاهی به وسیله واریانت‌های فنوتیپی:

قدرت بازدارندگی هریک از واریانت‌های فنوتیپی،

وسیله ژن *fliC* (یکی از ژن‌های دخیل در سنتز تاژک) بود؛ اندازه تاژک واریانت ثانویه بیش از دو برابر اندازه تاژک تیپ وحشی بوده است (Sanchez-Contreras et al. 2002). آنالیز پروتئین‌های سطحی واریانت‌های فنوتیپی *P. brassicacearum* NFM 421 نشان داده است که میزان تولید فلاژلین در سلول‌های تیپ ثانویه این جدایه که تحرک بیشتری داشتند، بسیار بیشتر از سلول‌های تیپ اولیه می‌باشد (Achouak et al. 2004).

تشکیل بیوفیلم: شرایط درون بیوفیلم بسیار متفاوت از شرایط محیط پیرامون یا دور از آن است و سلول‌های باکتریایی را به انجام فعالیت‌هایی که در خارج از بیوفیلم امکان‌پذیر نمی‌باشند، قادر می‌سازند و فوایدی از قبیل



شکل ۴: اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی به دست آمده از تیپ وحشی (B1 I) و تیپ ثانویه (B1 II) حاصل از BOX-PCR، الکتروفورز شده در آگارز ۱/۵ درصد و رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید

Fig 4: Genomic fingerprints of wild type (B1 I) and second type (B1 II) generated from BOX-PCR, electrophoresed in 1.5% agarose and stained with ethidium bromide

واجد ژن SSS بود، مشاهده گردید. واریانت جدید ظاهراً پایدار بود، زیرا در تمام مراحل انجام این بررسی برگشت آن به تیپ وحشی رخ نداد. بررسی‌های هوفته و همکاران (Hofte *et al.* 1994) نشان داده است که محصول ژن SSS نقش اساسی در ایجاد واریانت‌ها در *P. fluorescens* F113 دارد و عدم بیان آن منجر به کاهش شدید تنوع فازی می‌شود.

در بررسی اخیر مشخص گردید که واریانت جدید (B1 II) مقدار بیشتری سیدروفور در مقایسه با تیپ وحشی خود (B1 I) تولید کرد، در صورتی که قدرت تولید سیانید هیدروژن آن کاهش پیدا کرده بود. مشابه چنین نتایجی در مورد واریانت F جدایه F113 در تحقیق سانچز و همکاران (Sanchez-Contreras *et al.* 2002) هم مشاهده شده است، بررسی‌ها نشان داد که تغییرات بوجود آمده در تولید

بر اساس فاصله‌ای که بین حاشیه پرگنه باکتریایی و قارچ ایجاد شده بود اندازه‌گیری شد. به جز در مورد *P. drechsleri*، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان بازدارندگی بین تیپ وحشی و تیپ ثانویه در گروه‌بندی آماری با استفاده از آزمون تی وجود داشت (جدول ۳). قدرت بازدارندگی تیپ ثانویه در مقایسه با تیپ وحشی در شرایط آزمایشگاهی به طور قابل توجهی کاهش پیدا نموده بود (شکل ۳، D) کاهش قدرت بازدارندگی تیپ ثانویه در بررسی‌های متعددی مشاهده شده است (Dekkers *et al.* 1998, Chin-Awoeng *et al.* 2000 & van den Broek 2003).

انگشت نگاری DNA با استفاده از BOX-PCR :

در انگشت‌نگاری ژنومی BOX-PCR فراوانی و اندازه باندهای تکثیرشده در دو واریانت مثل هم بوده، الگوی تکثیر باندها یکسان بوده است (شکل ۴).

نتیجه‌گیری

یکی از مکانیسم‌های تغییر ژنوم باکتریایی که به سهولت برگشت‌پذیر می‌باشد، پدیده تنوع فازی است که سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی را ایجاد کرده و به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا در زیستگاه‌های خود که دائماً در حال تغییر است، بقا یابند. مزیتی که تنوع فازی برگشت‌پذیر نسبت به موتاسیون‌های معمولی (برگشت‌ناپذیر) دارد اینست که تنوع فازی جمعیت را قادر می‌سازد که از سیستم ایمنی میزبان (بیمارگرهای جانوری) و یا از شرایط نامساعد محیطی فرار کرده، با حفظ ویژگی‌های ژنتیکی بالقوه با مساعد شدن شرایط به حالت اولیه برمی‌گردند (Wisniewski-Dye & Vial 2008).

در این تحقیق، وقوع تنوع فنوتیپی در جدایه B1 که

دادند؛ قدرت بیوکنترلی یک باکتری آنتاگونیست به عوامل متعددی از قبیل تولید آنزیم‌های مختلف و متابولیت‌های متعدد بستگی دارد، در این تحقیق ملاحظه شد که تولید سیانید هیدروژن کاهش پیدا نموده است. این موضوع می‌تواند یکی از دلایل کاهش قدرت بیوکنترلی واریانت‌ها باشد، البته بایستی نقش سایر عوامل موثر نیز بررسی شود. واریانت‌های ثانویه قدرت بیوکنترلی کمتر ولی تحرک بیشتری نسبت به تیپ وحشی دارند، در واقع واریانت بی‌آزار بیشتر برای بقاء در خاک، بقایای گیاهی یا شرایط کمبود مواد غذایی سازگار شده است و افزایش تحرک می‌تواند به کلینزاسیون نیچ‌های جدید توسط آن کمک کند (Poussier et al. 2003). با توجه به تفاوت‌های رفتاری مشاهده شده بین دو واریانت، از نشانگر مولکولی BOX-PCR جهت تایید اینکه واریانت‌های مذکور متعلق به یک جدایه هستند و این تفاوت رفتاری به دلیل وقوع تنوع فازی می‌باشد، استفاده شد و یکسان بودن نقوش قطعات تکثیر شده این امر را اثبات کرد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری و مساعدت پرسنل محترم گروه بیوتکنولوژی دانشگاه تربیت معلم آذربایجان به ویژه جناب آقای دکتر پژوهنده و جناب آقای دکتر احمدآبادی که امکانات انجام این پژوهش را فراهم نمودند، صمیمانه تشکر می‌شود.

متابولیت‌های این واریانت مربوط به جهش نقطه‌ای بوجود آمده در ژن *gacA* آن می‌باشد که تحت تاثیر نوترکیبی ناشی از رکامیناز آن ایجاد می‌شود. این ویژگی‌ها تاثیر بسزایی در بقا باکتری در ریشه دارد چرا که تولید متابولیت‌های وابسته به *gacA* (سیانید هیدروژن) که انرژی باکتری را هدر می‌دهد، متوقف می‌شود و به جای آن تولید سیدروفور افزایش می‌یابد که در رقابت آن نقش مهمی دارد (Sanchez-Contreras et al. 2002). نتایج این بررسی همچنین نشان داد که تشکیل بیوفیلم نیز تحت تاثیر تنوع فازی قرار گرفته است، یکی از عوامل تاثیرگذار در میزان تشکیل بیوفیلم، میزان تولید اگزوپلی ساکارید خارج سلولی (EPS) می‌باشد، مشاهده شده است واریانت‌هایی از باکتری *Azospirillum brasilense Sp7* که EPS بیشتری تولید می‌کردند، از نظر تشکیل بیوفیلم موفق‌تر از سایر واریانت‌ها بودند (Volfson et al. 2013). مقایسه تیپ وحشی و ثانویه از نظر تحرک نشان داد که واریانت جدید بسیار متحرک‌تر از تیپ وحشی می‌باشد، با توجه به نقشی که تاژک در حرکت باکتری دارد، می‌توان این موضوع را به افزایش اندازه تاژک یا بیان بیشتر ژن‌های دخیل در سنتز تاژک نسبت داد. در تحقیقات انجام شده توسط سانچز و همکاران (Sanchez-Contreras et al. 2002) و آکواک و همکاران (Achouak et al. 2004) این امر به اثبات رسیده ولی در مورد این جدایه نیاز به بررسی‌های بیشتر دارد. واریانت‌های به دست آمده قدرت بیوکنترلی به نسبت کمتری در مقایسه با تیپ وحشی نشان

منابع

- Abraham, J. M., Freitag, C. S., Clements, J. R., and Eisenstein, B. I. 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli* Proceedings of the National Academy of Sciences. 82:5724-5727.
- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V. and Heulin, T. 2004. Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum*

- as a plant root-colonization strategy. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 17: 872–879.
- Alexander, D. B. and Zuberer, D. A. 1991. Use of chrome azurol S reagent evaluates siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12: 39-45.
- Alstrom, S. and Burns, R. G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*. 7: 232-238.
- Buchenaer, H. 1998. Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. *Z. Pflanzenkrankh Pflanzenschutz*. 105: 329-348.
- Castaneda, G. C., Munoz, T. J. J. and Videa, J. R. P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Microchemistry Journal* 81: 35-40.
- Chin-A-woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V., Mulders, I. H. M., Dekkers, L. C. and Lugtenberg, B. J. J. 2000. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13:1340-1345.
- Dekkers, L. C., Mulders, I. H., Phoelich, C. C., Chin-A-woeng, T. F. C., Wijffes, A. H. and Lugtenberg, B. J. J. 2000. The *sss* colonization gene of the tomato-*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS365 can improve root colonization of other wild-type *Pseudomonas* spp. bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 13: 1177-1183.
- Dekkers, L. C., Phoelich, C. C., Van der fits, L. and Lugtenberg, B. J. J. 1998. A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 7051–7056.
- Dunlap, C., Moëne-locco, Y., Mccarthy, J., Higgins, P., Powell, J., Dowling, D. N. and O'gara, F. 1998. Combining proteolytic and phloroglucinol-producing bacteria for improved biocontrol of *Pythium*-mediated damping-off of sugar beet. *Plant Pathology* 47:299-307.
- Dybvig, K. 1993. DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Molecular Microbiology* 10:465-471.
- Ershad, Dj. 1992. *Phytophthora* species in Iran (isolation, purification, identification). Agriculture Research Organization. pp. 217.
- Fletcher, M. 1977. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.* 23: 1–6.
- Hagedorn, C., Gould, W. D. and Bardinelli, T. R. 1998. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied Environmental Microbiology* 55:2793-2797.
- Harshey, R. M. 1994. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology* 13:389–394.
- Henderson, I. R., Owen, P. and Nataro, J. P. 1999. Molecular switches—the ON and OFF of bacterial phase variation. *Molecular Microbiology* 33:919-932.
- Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriology Review* 36:478–503.
- Höfte, M., Dong, Q., Kourambas, S., Krishnapillai, V., Sherratt, D. and Mergeay, M. 1994. The *sss* gene product, which affects pyoverdinin production in *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2, is a site-specific recombinase. *Molecular Microbiology* 14:1011–1020.
- Martinez-Granero, F., Capdevila, S., Sanchez-Contreras, M., Martin, M. and Rivilla, R. 2005. Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151:975–983.
- Maurhofer, M., Keel, C. and Defago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology* 44: 40-50.
- Mavrodi, O. V., Mavrodi, D. V., Weller, D. M. and Thomashow, L. S. 2006. Role of *ptsP*, *orfT*, and *sss* recombinase genes in root colonization by *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96. *Applied Environmental Microbiology* 72: 7111–7122.
- Mcspadden Gardener, B. B., Schroeder, K. L., Kalloger, S. E., Raaijmakers, J. M., Thomashow, L. S. and WELLER, D. M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD* containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Applied Environmental Microbiology* 66:1939-1946.

- Meyer, T. F., Gibbs, C. P. and Haas, R. 1990. Variation and control of protein expression in *Neisseria*. Annual Review Microbiology 44:451-477.
- Mills, J. A., Venkatesan, M. M., Baron, L. S. and Buysse, J. M. 1992. Spontaneous insertion of an IS1-like element into the virF gene is responsible for avirulence in opaque colonial variants of *Shigella flexneri* 2a. Infection and Immunity 60:175-182.
- Morris, C. E., and Monier, J. M. 2003. The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review Phytopathology 41:429-453.
- Patten, C. L. and Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. Applied Environmental Microbiology 68: 3795- 3801.
- Poussier, S., Thoquet, P., Trigalet-demery, D., Barthet, S., Meyer, D., Arlat, M. and Trigalet, A. 2003. Host plant-dependent phenotypic reversion of *Ralstonia solanacearum* from non-pathogenic to pathogenic forms via alterations in the *phcA* gene. Molecular Microbiology 49: 991-1003.
- Rainey, P. B., and Travisano, M. 1998. Adaptive radiation in heterogeneous environment. Nature 394:69-72.
- Rashid, M. H. and Kornberg, A. 2000. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97:4885-4890.
- Sanchez-contreras, M., Martin, M., Villacieros, M., O'gara, F., Bonilla, I., and Rivilla, R. 2002. Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. Journal of Bacteriology 184: 1587-1596.
- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS Press, MN, 373 pp.
- Scher, F. M., and Baker, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. Phytopathology 72:1567-1573.
- Shirzad, A., Fallahzadeh-mamaghani, V. and Pazhouhandeh, M. 2012. Antagonistic potential of fluorescent Pseudomonads and control of crown and root rot of cucumber caused by *Phytophthora drechsleri*. Plant Pathology Journal 28: 1-9.
- Sperber J. I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organism in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research 9: 781-778.
- Stanghellini, M. E., and Miller, R. M. 1997. Biosurfactants. Their identity and potential efficacy in the biological control of zoosporic plant pathogens. Plant Disease 81:4-12.
- Trejo, E. S. R., Paszczynski, A. and Crawford, D. L. 1998. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. J. Indian Microbiol Biotechnology 21:81-90.
- van den Broek, D., Chin-A-woeng, T. F. C., Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J. J. 2005. Role of RpoS and MutS in phase variation of *Pseudomonas* sp. PCL1171. Microbiology 151: 1403-1408.
- van den Broek, D., Chin-A-woeng, T. F. C., Eijkemans, K., Mulders, I. H. M., Bloemberg, G. V. and Lugtenberg, B. J. J. 2003. Biocontrol traits of *Pseudomonas* spp. are regulated by phase variation. Molecular Plant-Microbe Interaction 16: 1003-1012.
- Vial, L., Groleau, M.C., Lamarche, M., Filion, G. Castonguay-vanier, J., Dekimpe, V., France daigle, F., Steve j charette, S. and De'ziel, E. 2010. Phase variation has a role in *Burkholderia ambifaria* niche adaptation. ISME Journal 4: 49-60.
- Volfson, V., Fibach-paldi, S., Paulucci, N. S., Dardanelli, M. S., Matan, O., Burdman, S. and Okon, Y. 2013. Phenotypic variation in *Azospirillum brasilense* Sp7 does not influence plant growth promotion effects. Soil Boilogy Biochemistry 67: 255-262.
- Waite, R. D., Struthers, J. K. and Dowson, C. G. 2001. Spontaneous sequence duplication within an open reading frame of the pneumococcal type capsule locus causes high-frequency phase variation. Molecular Microbiology 42: 1223-1232.
- Waite, R.D., Penfold, D.W., Struthers, J.K., and Dowson, C.G. 2003. Spontaneous sequence duplications within capsule genes *cap8E* and *tts* control phase variation in *Streptococcus pneumoniae* serotypes 8 and 37. Microbiology 149: 497-504.
- Wang, C., Ramette, A., Punjasamarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moenne-locco, Y. and Defago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. FEMS Microbiol Ecology 37:105-116.

- Wisniewski-dye', F. and Vial, L. 2008. Phase and antigenic variation mediated by genome Modifications. *Antonie van Leeuwenhoek*. 94:493–515.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Gotz, F., Meyer, P., Wilms, K. and Straube, E. 1997. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and Immunity* 65:890–896.

