

بررسی تراکم جمعیت و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران

میرحسین رسولی صدقیانی، حشمت‌اله رحیمیان، کاظم خاوازی، محمدجعفر ملکوتی
و هادی اسدی رحمانی^{*۱}

چکیده

در میان باکتری‌های ریزوسفری، توجه زیادی به گروه ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) شده است، بطوریکه امروزه در بیشتر نقاط دنیا مایه تلقیح‌های آنها تهیه و استفاده می‌شود. گروه سودوموناس‌های فلورسنت از جمله مهمترین باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه می‌باشند که بخش عمده‌ای از این مطالعات را بخود اختصاص داده‌اند. در این تحقیق به منظور شناسایی و بررسی جمعیت سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم، از نقاط مختلف گندم‌خیز کشور تعداد ۵۲ نمونه خاک ریزوسفری تهیه شد. سپس تعداد ۲۰۱ جدایه منسوب به سودوموناس‌های فلورسنت با استفاده از محیط KingB جداسازی وخالص گردید. تراکم جمعیت این باکتریها از $10^5 \times 1/51$ تا 6×10^8 سلول در هر گرم خاک ریزوسفری متغیر بود. به منظور بررسی پلی‌مورفیسم الگوی پروتئینهای سلولی، سویه‌های جداشده توسط الکتروفورز پروتئین‌های محلول بر روی ژل پلی‌اکریل آمید با یکدیگر مقایسه شدند. بر این اساس در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده، ۱۶ گروه الکتروفورزی تشخیص داده شدند. همچنین نتایج آزمایش‌های میکروسکوپی، آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نشان داد که ۳ و ۴۴/۲۷ درصد از جدایه‌ها به ترتیب متعلق به گونه‌های *P. putida*، *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* بودند. بنابراین با توجه به کلونیزاسیون موثر گونه‌های پوتیدا و فلورسنتس در ریزوسفر گندم، این سویه‌ها می‌توانند از نمونه‌های مفید برای ادامه بررسی به منظور تولید مایه تلقیح PGPR باشند.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس‌های فلورسنت، PGPR، تراکم جمعیت، ریزوسفر و گندم

مقدمه

یعنی تحریک رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مانند تولید هورمون‌های رشد، حل‌کنندگی فسفات، تسریع فرآیند معدنی‌شدن و یا "غیرمستقیم" یعنی کنترل عوامل بیماری‌زا از طریق تولید ترکیبات مختلف مانند سیانید، سیدروفور، متابولیت‌های ضدقارچ و آنتی‌بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند. تحریک رشد گیاه توسط سویه‌های زیادی از باکتری‌های جنس *Bacillus*، *Arthrobacter*، *Azotobacter*، *Hydrogenophaga*، *Enterobacter*، *Clostridium*، *Pseudomonas* و *Azospirillum Serratia* گزارش شده است

ریزوسفر به لایه نازکی (معمولا یک الی سه میلی‌متر) از خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه (نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای) قرار دارند (Boven و Rovira، ۱۹۹۹). در این ناحیه گروه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شوند که ممکن است برای گیاه میزبان، مفید، مضر و یا بی‌ضرر باشند (Benizri و همکاران، ۲۰۰۱). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) به انواع باکتری‌های مفید مستقر در این ناحیه اطلاق می‌شود. (Kloepper و Schroth، ۱۹۷۸). این باکتری‌ها به دو صورت "مستقیم"

۱- برتریب دانشجوی دکتری خاکشناسی دانشگاه تربیت مدرس، استاد دانشگاه مازندران، استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، استاد دانشگاه تربیت مدرس و استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب

برای افتراق گونه‌های فلورسنت پاتوژن گیاهی از سایر فلورسنت‌ها، از آزمون آرژینین‌دی‌هیدرولاز استفاده می‌شود. پاتوژن‌های گیاهی از نظر آزمون آرژینین‌دی‌هیدرولاز، منفی می‌باشند (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰۴). آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ۴۱ و ۴ درجه سانتی‌گراد از مهمترین شاخص‌های تفکیک گونه‌های *P. aeruginosa*، *P. putida*، *P. fluorescens* می‌باشند. سویه‌های گونه *P. putida* از نظر آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ۴۱ و ۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب منفی، منفی، منفی و مثبت هستند. گونه *putida* شامل دو بیووار^۴ A و B و بیش از یک تاژک است (Bossis و همکاران، ۲۰۰۰، Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰۴). سویه‌های گونه *P. fluorescens* از نظر آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ۴۱ و ۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب مثبت، مثبت، منفی و مثبت می‌باشند (Bossis و همکاران، ۲۰۰۰). این گونه دارای پنج بیووار (از I تا V) است که همگی بیش از یک تاژک دارند (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰۴). بیووار I بعنوان سودوموناس فلورسنس تیپیک محسوب می‌گردد. بیووار II علاوه بر سویه‌های *marginalis*، سایر انواع ساپروفیت را نیز شامل می‌شود. بیووار III حداقل شامل دو زیرگروه می‌باشد که از نظر توانایی استفاده از اسیدهای دی‌کربوکسیلیک با هم تفاوت دارند. بیووار IV شامل سویه تیپ *lemonnieri* است. بیووار V شامل سویه‌های متفرقه سودوموناس فلورسنس و از لحاظ خصوصیات تغذیه‌ای بیووار بسیار ناهمگونی است و سویه‌هایی را شامل می‌شود که یک یا چند خصوصیت مهم متمایزکننده بیووارهای شناخته شده را از دست داده‌اند (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱). گونه *P. aeruginosa* از نظر آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ۴۱ و ۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب مثبت، منفی، مثبت و منفی است. این گونه، به‌عنوان گونه تیپیک جنس سودوموناس بوده که توانی ژنوم آن تعیین گردیده و برای انسان بعنوان پاتوژن محسوب می‌شود (Bossis و همکاران، ۲۰۰۰، Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰۴). سودوموناس آئروژینوزا دارای یک تاژک و قادر به تولید چند نوع رنگدانه است که مهمترین آنها پیوسیانین^۵

(Benizri و همکاران، ۲۰۰۱). باکتری‌های *Pseudomonas* و بالاخص سودوموناس‌های فلورسنت از مهمترین اعضای جامعه میکروارگانیسم‌های ریزوسفری می‌باشند که مطالعات بسیار زیادی در خصوص اثرات مثبت ناشی از تلقیح آنها بر رشد گیاهان و بویژه گندم شده‌است (Walley و Germida، ۱۹۹۶، همکاران، ۱۹۹۶، DeFreitas و Germida، ۱۹۹۲ و Mozafar و همکاران، ۱۹۹۲). باکتری‌های جنس سودوموناس، باکتری‌هایی هستند از خانواده Pseudomonadaceae که به شکل میله‌ای راست یا کمی خمیده، دارای تاژک قطبی، بدون اسپور و گرم منفی می‌باشند.

این باکتری‌ها هوازی و از نظر منبع انرژی و کربن کموارگانوتروف هستند. از نظر نیازهای غذایی گونه‌های سودوموناس نیاز غذایی بسیار ساده‌ای دارند. در شرایط آزمایشگاهی در محیط‌های حاوی مقداری ماده آلی و در pH خنثی بخوبی رشد می‌کنند.

از مهمترین این محیطها King'B است. متابولیسم گونه‌های سودوموناس تنفسی بوده و حالت تخمیری ندارند. این باکتریها قادرند از ۱۵۰ ترکیب آلی بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده نمایند (Todar، ۲۰۰۴). Palleroni و همکاران (۱۹۸۶) باکتری‌های جنس سودوموناس را بر اساس مطالعات همسانی rRNA/DNA به پنج گروه تقسیم‌بندی کردند. از پنج گروه مذکور اخیراً فقط گروه I در جنس سودوموناس ابقا شده و بقیه در جنسهای جدید ویا موجود قبلی جای گرفته‌اند. گروه I بعنوان بزرگترین گروه، انواع فلورسنت را در خود جای داده است (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱). وجه تمایز سودوموناس‌های فلورسنت از سایر سودوموناس‌ها، تولید پیگمانهایی است که در برابر نور فرابنفش (۲۵۴ نانومتر) بویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت فلورسنت و محلول در آب از گروه سیدروفورها^۱ هستند که برای سودوموناس‌های فلورسنت انواع اختصاصی از آنها مانند پیووردین^۲ یا سودوباکتین^۳ شناسایی شده‌اند (Boopathi و Rao، ۱۹۹۹). از مهمترین گونه‌های فلورسنت می‌توان به *P. aeruginosa*، *P. putida*، *P. fluorescens* و همچنین پاتوژن‌های گیاهی نظیر *P. syringae* و *P. cichorii* اشاره نمود (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰۴).

^۱ - Siderophore

^۲ - Pyoverdinin

^۳ - Pseudobactin

^۴ - Biovar

^۵ - Pyocyanin

از^۱ باکتری در گرم ماده خشک ریشه) استقرار یافته بودند در حالیکه تعداد سایر باکتری‌ها کمتر از^۴ ۱۰ سلول در گرم ماده خشک ریشه بود. در آزمایش دیگری Lalande و همکاران (۱۹۸۹) ضمن جداسازی و شناسایی باکتریهای ریزوسفر ذرت (اکتوریزوسفر، ریزوپلسن و اندوریزوسفر) و بررسی پتانسیل محرک رشد بودن آنها نشان دادند گونه‌های سودوموناس بیشترین جمعیت (۶۳٪) را در ریزوسفر داشتند و بیشتر در سطوح ریشه^۲ متمرکز شده بودند. در اندوریزوسفر جمعیت سودوموناس‌ها کمتر (۱۱٪) بود در حالیکه گونه‌های باسیلوس بالاترین فراوانی (۸۸٪) را در این منطقه داشتند. در مورد ریزوسفر برنج نیز سودوموناس‌های فلورسنت در سطح ریشه‌ها پیدا شده‌اند. در قسمتهای داخلی ریشه تعداد باکتریها اندک بوده و سودوموناس‌های فلورسنت در این منطقه حضور نداشته‌اند (Vlassak و همکاران، ۱۹۹۲). در تحقیق دیگری Gardner و همکاران (۱۹۸۴) ضمن بررسی جمعیت سودوموناسهای فلورسنت در ریزوسفر مرکبات نشان دادند که بیش از ۶۲ درصد سویه‌های فلورسنت ریزوسفر لیمو از گونه پوتیدا بودند و تعداد محدودی از گونه آئروژینوزا شناسایی شدند. همچنین پتانسیل تحریک رشد گیاه، در سویه‌های پوتیدا و فلورسنت مشاهده گردید.

این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر گندم مناطق مختلف کشور انجام گردید. این در حالی است که اطلاع دقیقی از فراوانی، گونه‌های غالب و وضعیت استقرار آنها بر روی ریشه گندم وجود ندارد. بنابراین هدف این تحقیق جداسازی و مطالعه سویه‌های سودوموناس‌های فلورسنت از نظر تعداد و تنوع گونه‌ها بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی سویه‌های سودوموناس

به منظور جداسازی و ارزیابی جمعیت باکتری‌های سودوموناس، تعداد ۵۲ نمونه مرکب خاک ریزوسفری در مرحله پنجاهمی گندم از مزارع استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، زنجان، همدان، کرمانشاه، فارس، تهران، خراسان، کردستان و یزد تهیه گردید. نمونه‌ها قبل و بعد از انتقال به آزمایشگاه، در دمای ۴°C نگهداری و بلافاصله مراحل جداسازی انجام شد. ارقام گندم نمونه‌های موردنظر شامل شهریار، نوید، الموت، الوند، مرو دشت، زرین، قیاسی، فلات، شیراز، آتیلا، مهدوی، سرداری، کراس آزادی، طوس، کاسپارو، فلات ۳، آذر ۲، سبلان، گاسکوژن، تریکاله

می‌باشد. این رنگدانه یک مشخصه متمایزکننده این گونه از سایر گونه‌ها است (Hoft و همکاران، ۱۹۹۱، Todar، ۲۰۰۴). استفاده از روشهای سریع و قابل تکرار نظیر الکتروفورز پروتئین‌های سلولی (SDS-PAGE)،^۱ شناسایی و بررسی تنوع جدایه‌ها را در یک زمان کوتاه تسهیل می‌نماید. کارایی این روش در بررسی تنوع طبیعی جمعیت باکتریها توسط محققان زیادی تایید شده است (Moore و همکاران، ۱۹۸۰؛ Kersters و De Ley، ۱۹۷۵؛ Lambert و همکاران، ۱۹۹۰). Vlassak و همکاران (۱۹۹۲) ضمن جداسازی باکتریهای سودوموناس، به منظور شناسایی و بررسی تنوع طبیعی جمعیت آنها، ۸۹ جدایه را بر روی ژل پلی‌آکریل‌امید الکتروفورز نموده و از روی نتایج الکتروفورز، جدایه‌ها را در ۱۲ گروه پلی‌مورفیک پروتئینی^۲ (PPT) گروه‌بندی کردند. همچنین با انجام آزمونهای بیوشیمیایی، این جدایه‌ها را به ۵ کلاستر تفکیک نمودند. از این کلاسترها، ۳ کلاستر عمده شامل گونه‌های سودوموناس فلورسنت و پوتیدا بودند و بقیه کلاسترهای کوچک، سایر سودوموناس‌های فلورسنت را شامل شدند. نتایج همبستگی ضعیفی بین گروه‌بندی الکتروفورز و آزمونهای بیوشیمیایی نشان داد. Sorensen و همکاران (۱۹۹۱) نیز پروتئینهای کل سلول را با استفاده از روش SDS-PAGE و هضم آنزیمی با پروتئیناز K مورد ارزیابی قرار دادند و با تجزیه و تحلیل تنها چهار باند الکتروفورزی ویژه و متمایزکننده توانستند در زمان کوتاهی گونه‌های *P. fluorescens*، *P. putida* و *P. aeruginosa* را در یک سطح اختصاصی شناسایی نمایند.

ریحانسی‌تسبار (۱۳۷۹) با بررسی فراوانی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم و ارزیابی توان آنها بعنوان عوامل محرک رشد گیاه، از بین ۱۰۰ جدایه متناسب به سودوموناس‌های فلورسنت، ۴۰ جدایه که بیشترین قرابت را با گونه *P. fluorescens* داشتند جداسازی نمود. بر اساس نتایج این تحقیق تعداد سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم 5×10^3 تا $1/26 \times 10^6$ باکتری در گرم خاک بود. همچنین نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان دادند که پاسخ گندم به تلقیح با سویه‌های سودوموناس فلورسنت در بیشتر شاخص‌های رشد مثبت بود. Alexander و Zoerberer (۱۹۹۱) ضمن مطالعه تراکم جمعیت باکتری‌های ریزوسفری در ریشه یولاف نشان دادند که از بین باکتری‌های ریزوسفری، گونه‌های سودوموناس بر روی ریشه یولاف در جمعیت بالایی (بیش

^۱-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacryl-Amid Gel Electrophoresis

^۲- Protein-Polymorphic type

میلی لیتر)، اسیداستیک (۱۰ میلی لیتر) آب مقطر (۵۰ میلی لیتر) و کومازی بلو (۰/۱۲ گرم) به مدت ۳ الی ۱۲ ساعت انجام گرفت و به منظور رنگبری، ژل‌ها در همان محلول به استثنای کومازی بلو به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند (Rahimian, ۱۹۸۹). بعد از بررسی تعداد باندها، ۱۰ باند متمایزکننده انتخاب گردید. وجود و یا عدم وجود هریک از این باندها در مورد جدایه‌ها به ترتیب با ۱ و ۰ مشخص گردیدند. نتایج مربوط به ۴۲ جدایه مختلف بوسیله نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل و گروه‌بندی جدایه‌ها انجام شد.

آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی

به منظور شناسایی گونه جدایه‌ها، از آزمایش‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مندرج در کتاب Bergey استفاده شد. برای این منظور بر روی کلیه جدایه‌ها آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، تحرک در محیط نیمه جامد، آزمون ذوب ژلاتین، رشد در دمای ۱۰°C، آزمون هیدرولیز آرژینین، توانایی تشکیل لوان از ساکارز، آزمون سیترات و استفاده از قندهای ترهالوز، مزواینوزیتول و گلوکز انجام گرفت (Gardner و همکاران، ۱۹۸۴ و Vlassak و همکاران، ۱۹۹۲). برای آزمون کاتالاز، از روش اضافه کردن محلول H₂O₂ سه درصد بر روی کلونی‌ها و ظهور حباب‌های اکسیژن بعنوان کاتالاز مثبت استفاده شد. جهت انجام آزمون اکسیداز، چند قطره از معرف اکسیداز (محلول یک درصد دی‌متیل پارافنیلن دی‌آمین هیدروکلراید) بر روی کلونی‌ها ریخته شد و تغییر رنگ به سمت قرمز تیره یا سیاه بعنوان اکسیداز مثبت در نظر گرفته شد (Schaad, ۲۰۰۱). برای بررسی تحرک سویه‌ها از محیط نیمه جامد شامل عصاره گوشت^۱ (۳ گرم در لیتر) پیتون (۱۰ گرم در لیتر) NaCl (۵ گرم در لیتر) و آگار (۰/۴ درصد) استفاده شد. بدین منظور سوزن پلاتینی آغشته به باکتری بطور عمودی در وسط لوله‌های حاوی محیط کشت فرو برده شد و رشد باکتری بصورت رشته‌ای در اطراف خط کشت بعنوان تحرک در نظر گرفته شد. آزمون هیدرولیز یا ذوب ژلاتین در لوله‌های حاوی محیط نوترینت ژلاتین (عصاره گوشت ۳ گرم در لیتر، پیتون ۵ گرم در لیتر و ژلاتین ۱۲۰ گرم در لیتر) انجام شد. آنگاه جدایه‌های مورد نظر بر روی محیط مذکور کشت و برای مدت ۲ هفته در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. در این آزمایش از لوله‌های تلقیح نشده بعنوان شاهد استفاده شد. پس از سپری شدن مدت مذکور کلیه لوله‌ها برای مدت ۲ ساعت در دمای ۴°C قرار داده شدند. پس از آن لوله‌ها از یخچال خارج و هر لوله در

و چند رقم محلی آذربایجان بودند. تعیین جمعیت باکتری‌های سودوموناس با استفاده از روش شمارش کلنی انجام شد. برای تهیه رقت‌های ده‌تایی از محلول بافر فسفات (PBS) با pH=۷/۲ و برای شمارش باکتری از محیط کشت KingB استفاده گردید. پس از ۲۴ الی ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۸°C پلیت‌ها با استفاده از لامپ UV از نظر وجود کلونی‌های با خاصیت پرتوافشان (فلورسنت) بررسی و کلونی‌های مورد نظر شمارش شدند. پس از تخمین جمعیت باکتری‌های سودوموناس، جدایه‌های مورد نظر با استفاده از همان محیط کشت خالص‌سازی شدند. آنگاه به منظور اطمینان بیشتر، جدایه‌های مذکور از نظر شکل ظاهری، تحرک در محیط نیمه جامد و آزمون گرام مورد بررسی قرار گرفتند (Schaad, ۲۰۰۱) که نتایج حاکی از جداسازی سودوموناس‌های فلورسنت بود. بدین ترتیب تعداد ۲۱۲ جدایه انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی روی محیط شیدار حاوی محیط کشت KingB و همچنین آب مقطر استریل نگهداری شدند.

بررسی الگوی پروتئین‌های محلول جدایه‌ها

نظر به بالا بودن تعداد جدایه‌ها در مراحل اولیه و به منظور بررسی تنوع طبیعی سویه‌ها از نظر پلی‌مورفیسم الگوی پروتئین‌ها، این جدایه‌ها توسط الکتروفورز پروتئین‌های محلول بر روی ژل پلی‌اکریل آمید (SDS-AGE) با یکدیگر مقایسه شده و گروه‌های پلی‌مورفیک پروتئینی (PPT) تعیین گردیدند. بدین منظور ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت آگار مغذی رشد داده شدند. سپس یک کلونی از هر جدایه مورد نظر به یک لوله آزمایش حاوی ۳ میلی لیتر آب مقطر تلقیح گردید. در مرحله بعد یک میلی لیتر بافر تریس کلراید (Tris-HCl 0.06M, pH=8) اضافه و مخلوط شد. سپس معادل حجم محتویات لوله، بافر نمونه شامل گلیسرول ۲۰٪، مرکاپتواتانول ۲/۹٪، SDS (سدیم دودسیل سولفات) ۳/۵٪ و تریس ۰/۱۲۵ مولار و با pH=۸ به هر کدام از لوله‌ها اضافه و بهم زده شد. نمونه‌ها به مدت دو دقیقه در دمای ۱۰۰°C نگهداری و بعد در دمای آزمایشگاه سرد شدند. سوسپانسیون شفاف حاصله به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور، سانتریفوژ گردید. سپس فاز رویی شامل محلول‌های پروتئینی، توسط میکروپیپت برداشته شده و در لوله‌های جداگانه تا زمان استفاده در دمای ۲۰°C نگهداری شدند. الکتروفورز با استفاده از سیستم ناپیوسته لاملی (Laemmli, ۱۹۷۰) روی ژل جداکننده ۱۰٪ و لایه فشرده کننده ۵٪ پنی‌اکریل آمید به ابعاد ۱۵۰×۱۲۰×۱ میلی متر در شدت جریان ثابت ۱۸ میلی آمپر انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل حاصل با استفاده از محلول رنگی حاوی متانول (۵۰

بدین ترتیب با استفاده از نتایج آزمایشهای میکروسکوپی و آزمونهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شناسایی سویه‌ها تا حد گونه انجام گرفت (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Bossis و همکاران، ۲۰۰۰).

نتایج و بحث

از کل ۵۲ نمونه خاک ریزوسفری ارقام مختلف گندم در مناطق یاد شده، ۲۰۱ جدایه متناسب به گروه سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی گردیدند. سویه‌های جدا شده در برابر اشعه UV، خاصیت پرتوافشانی (فلورسانس) از خود نشان داده و به رنگ‌های سبز، آبی و زرد و با شدت‌های مختلف پرتوافشانی مشاهده گردیدند. جمعیت باکتری‌های گروه سودوموناس‌های فلورسنت در نمونه‌های مختلف از $1/51 \times 10^9$ تا $6/4 \times 10^8$ سلول باکتری به ازاء هر گرم نمونه (خاک ریزوسفری) متغیر بود (جدول ۱). تراکم جمعیت باکتری‌های سودوموناس در نمونه خاکهای ریزوسفری ارقام قیاسی، سرداری، الوند، آذر، طوس، مروذشت، سیلان، کاسپارو، گاسکوژن و نوید پایین‌تر از میانگین کل جمعیت سودوموناس‌ها ($9/61 \times 10^7$) و در ریزوسفر ارقام شیراز، آتیلا، زرین، فلات، آذر، شهریار، سیلان، تریتیکاله، کراس آزادی و ارقام بومی جمعیت میکروبی بالاتر از میانگین فوق بود. Vlassak و همکاران (۱۹۹۲) نشان دادند که در ریزوسفر گیاهان مختلف جمعیت سودوموناس‌ها متغیر است و بالا بودن تعداد سودوموناس‌ها در مورد ارقام اخیر گندم می‌تواند نشان‌دهنده کلونیزاسیون موثر آنها در ریزوسفر باشد. ترشحات ریشه‌ای و فیتوسیدروفورها از طریق تأمین نیازهای غذایی میکروارگانیسم‌ها در کلونیزاسیون آنها موثر هستند. البته میکروارگانیسم‌هایی که می‌توانند در نقاط داخلی ریشه، میکروکلونی‌هایی (تجمع سلولی) تشکیل دهند، از آنهایی که بطور انفرادی بر روی ریشه استقرار می‌یابند، دسترسی بیشتری به ترشحات ریشه‌ای دارند (Marschner و همکاران، ۱۹۹۷). همچنین نتایج نشان داد که تراکم جمعیت سودوموناس‌ها در نمونه خاک استان‌های آذربایجان غربی و فارس بالاتر از میانگین جمعیت و در نمونه‌های سایر استانها تراکم جمعیت پایین‌تر از میانگین بود. در بررسی تنوع جمعیت میکروارگانیسم‌ها مقایسه انواع پروتئین‌های با نقش یکسان، یکی از روشهایی است که به منظور ارزیابی شباهت‌ها و تفاوت‌ها بکار برده شده است (Powell و Gill، ۱۹۶۸). در این میان استفاده از روش‌های سریع و قابل تجدید برای تشخیص سویه‌ها نظیر الکتروفورز پروتئین‌های کل (SDS-PAGE)، مطالعه تنوع جمعیت‌های طبیعی باکتری‌ها را تسهیل کرده است. این روش امکان تشخیص و مقایسه تعداد زیادی از ایزوله‌ها را در یک زمان

صورت جاری شدن محیط آن به‌هنگام کج کردن، بعنوان لوله مثبت در نظر گرفته شد (Schaad، ۲۰۰۱). برای بررسی رشد در دمای 41°C جدایه‌ها در لوله‌های حاوی محیط غذایی مایع کشت داده شدند و رشد باکتری بعد از ۳ روز از روی کدورت محیط و مقایسه با شاهد تلقیح نشده مشخص گردید (Gardner و همکاران، ۱۹۸۴). هیدرولیز آرزینین با استفاده از روش Thornley (۱۹۶۰) انجام گرفت. محیط کشت این آزمون شامل پیتون (۱ گرم در لیتر)، NaCl (۲/۵ گرم در لیتر)، K_2HPO_4 (۰/۳ گرم در لیتر)، فنلرد (۰/۱۱ گرم در لیتر) و آرزینین هیدروکلراید (۱۰ گرم در لیتر) در $\text{pH} = 7/2$ بود. پنج میلی‌لیتر از محیط مذکور را در لوله‌های آزمایش ریخته و بعد از استریل شدن، توسط باکتری تلقیح شد. سطح محیط در لوله‌ها به اندازه ۱ سانتی‌متر با پارافین استریل پوشانده شد. هیدرولیز آرزینین و تولید آمونیاک در شرایط بی‌هوازی سبب تغییر رنگ معرف (فنلرد) گردیده و از روی این تغییر رنگ به سمت قرمز پررنگ سویه‌های مثبت مشخص گردیدند. لوان، ساده‌ترین پلی ساکارید برون سلولی است که برای آزمون تولید آن از محیط کشت آگار مغذی حاوی ۵ درصد ساکارز استفاده شد (Schaad، ۲۰۰۱). سویه‌ها بصورت لکه ای روی آن کشت و در دمای 28°C نگهداری شدند. تشکیل کلونی‌های لعابی یا موکوئیدی سفید پس از ۳ تا ۵ روز نشان دهنده واکنش مثبت آزمون بود. آزمون سیترات با استفاده از محیط کشت سیمون سیترات شامل $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (۰/۲ گرم در لیتر)، $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (۱ گرم در لیتر)، K_2HPO_4 (۱ گرم در لیتر)، سیترات سدیم (۲ گرم در لیتر)، NaCl (۵ گرم در لیتر)، برم تیمول بلو (۰/۰۸ گرم در لیتر) به همراه آگار (۲۰-۱۵ گرم) در $\text{pH} = 6/9$ انجام شد. در این آزمون سویه‌های مثبت از روی تغییر رنگ محیط از سبز به آبی مشخص شدند (Schaad، ۲۰۰۱). برای بررسی توانایی استفاده از قندهای ترهالوز، مزواینوزیتول و گلوکز از محیط پایه Ayer استفاده شد. این محیط شامل فسفات آمونیم (۱ گرم در لیتر)، کلرور پتاسیم (۰/۲ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۰/۲ گرم در لیتر)، برم تیمول بلو (۱ میلی‌لیتر ۱/۶٪) و آگاروز (۱۲ گرم) بود. قندها بطور جداگانه در غلظت ۰/۲ درصد بوسیله فیلتر کردن با کاغذ صافی (به قطر ۰/۴۵ میکرون) استریل و سپس به محیط اصلی اضافه شدند. در این آزمون محیط کشت ابتدا به رنگ سبز است که در صورت استفاده باکتری از قند بدلیل تغییر pH به رنگ زرد در می‌آید و بدینوسیله سویه‌های مثبت مشخص شدند. در کلیه آزمون‌های توانایی استفاده باکتری از قند، از محیط فاقد قند بعنوان شاهد استفاده شد (Gardner و همکاران، ۱۹۸۴ و Schaad، ۲۰۰۱).

آنروژینوزا توانایی استفاده از تری‌هالوز و مزواینوزیتول را داشتند. ذوب ژلاتین تنها در سویه‌های پوتیدا منفی بود. تنها سویه‌های آنروژینوزا توانستند در دمای ۴۱ درجه رشد نمایند. ترتیب افزایش تعداد گونه‌های مختلف سودوموناس بصورت زیر بود:

P. putida > *P. fluorescens* >> *P. aeruginosa*

بنابراین غالب سودوموناس‌های ریزوسفر گندم از گونه پوتیدا بودند (شکل ۳). این غالبیت می‌تواند بدلیل توان رقابتی بالا و کلونیزاسیون موثر این گونه در ریزوسفر گندم در مقایسه با سایر گونه‌ها باشد. Gardner و همکاران (۱۹۸۴) نیز نتایج مشابهی را ارائه نمودند و نشان دادند که بیش از ۶۲ درصد سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر لیمو از گونه پوتیدا بودند.

البته در مورد چندین سویه نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی متناقض بود، بطوریکه یک سویه که ذوب ژلاتین آن منفی بود قادر به استفاده از تری‌هالوز نیز بود. این تناقض به ویژه در گونه‌های *putida* و *fluorescens* مشهود بود و سبب ایجاد سویه‌های بینابینی یا حدواسط^۱ گردید. Gardner و همکاران (۱۹۸۴) نیز ضمن مطالعه سودوموناس‌های فلورسنت به خواص نامتجانسی در برخی از سویه‌ها برخورد نمودند.

این محققان نشان دادند سویه‌ای که بر اساس سایر آزمون‌ها در گونه *putida* قرار گرفته، در دمای ۴۱ درجه قادر به رشد بود. همچنین در گروه سویه‌های *P. fluorescens* که توانایی استفاده از تری‌هالوز و اینوزیتول را داشتند، فعالیت ژلاتیناز منفی بود. برای رفع این ناهمگونی‌ها، در تشخیص و شناسایی گونه‌های مذکور گروهی بعنوان حدواسط *P. fluorescens/P. putida* در نظر گرفته شده است (Bossis و همکاران، ۲۰۰۰).

سودوموناس‌ها به ویژه گونه‌های پوتیدا و فلورسنتس با استقرار در ریشه گیاهان از راه‌های مختلفی رشد آنها را تحریک می‌نمایند. مطالعه بیشتر این گونه‌ها از نظر تولید مواد تحریک کننده رشد گیاهی، دورنمای روشنی را در افزایش رشد گیاهان به ویژه غلات نوید می‌دهد. افزایش عملکرد در غلات با تلقیح بذری و خاکی سویه‌های فلورسنت سودوموناس توسط محققین زیادی گزارش شده است (Hoft و همکاران، ۱۹۹۱، Khaliq و همکاران ۱۹۹۶، Germida و Walley، ۱۹۹۶، DeFreitas، ۱۹۹۶ و Germida، ۱۹۹۲). این باکتری‌ها با مکانیسم‌های مختلفی نظیر تولید هورمون‌های گیاهی و سیدروفورها، کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد و ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان

نسبتاً کوتاه مهیا می‌نماید (De Ley و Keresters، ۱۹۷۵؛ Moore و همکاران، ۱۹۸۰). به همین منظور جدایه‌های جمع‌آوری شده از نظر الگوی پروتئین‌ها با یکدیگر مقایسه شدند. تفاوت‌ها و شباهت‌های مشاهده شده در جمعیت سودوموناس‌ها قابل توجه بود. تفاوت‌ها از نظر تعداد باندهای مورد مقایسه محسوس بود (شکل ۱).

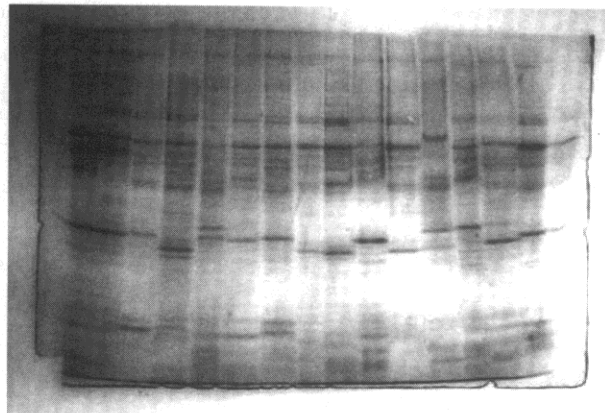
نتایج گروه‌بندی خوشه‌ای (Clustering Analysis) حاصل از الکتروفورز پروتئین‌ها تفاوت‌ها و شباهت‌های محسوسی را نشان داد (شکل ۲). کلاستر حاصله در سطح ۹۰ درصد تشابه جدایه‌ها با یکدیگر، وجود ۱۶ گروه الکتروفورزی یا ۱۶ تپ پلی‌مورفیک پروتئینی را نشان داد. گروه‌ها از ۱ تا ۱۶ نامگذاری شدند. تعداد جدایه در گروه‌های مختلف متغیر و گروه الکتروفورزی ۵ بزرگترین گروه را تشکیل داد که ۱۶/۶۶ درصد جدایه‌های بررسی شده را در خود جا داد.

Vlassak و همکاران (۱۹۹۲) با الکتروفورز پروتئین‌های محلول ۸۹ جدایه از گروه سودوموناس‌های فلورسنت، آنها را به ۱۲ گروه پروتئینی تفکیک نمودند. همچنین با آزمون‌های بیوشیمیایی، این جدایه‌ها را به ۵ گروه تفکیک نمودند. از این ۵ گروه، ۳ گروه عمده، شامل گونه‌های سودوموناس فلورسنتس و پوتیدا بودند و بقیه گروه‌های کوچک، سایر سودوموناس‌های فلورسنت را شامل شدند. از نظر قرار گرفتن گونه‌ها در داخل گروه‌ها، بین گروه‌بندی الکتروفورز و گروه‌های حاصل از آزمون‌های بیوشیمیایی همبستگی ضعیفی مشاهده شد. در تحقیق حاضر نیز همبستگی معنی‌داری بین نتایج گروه‌بندی الکتروفورز و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی مشاهده نگردید و الکتروفورز پروتئین‌های محلول نتوانست سودوموناس‌های فلورسنت را تا حد گونه تفکیک نماید. در نتیجه جدایه‌های مربوط به یک گونه، در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. با اینحال وجود اختلاف در الگوی پروتئینی می‌تواند نشان‌دهنده تنوع طبیعی وسیع بین جدایه‌های مورد بررسی باشد.

شناسایی سویه‌ها از نظر قرار گرفتن آنها در گونه‌های فلورسنت جنس سودوموناس با استفاده از نتایج آزمون‌های میکروسکوپی، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی انجام گرفت و جدایه‌های متعلق به گونه‌های *P. fluorescens*، *P. putida* و *P. aeruginosa* مشخص گردیدند. در مرحله اول با استفاده از لامپ UV دستی، ۲۱۲ نمونه جداسازی گردیده بود که ۲۰۱ جدایه در داخل گونه‌های فوق قرار گرفتند. نتایج آزمون‌های اکسیداز، کاتالاز، آرژینین‌دی‌هیدرولاز، سترات و گلوکز در هر سه گونه مثبت بود. سویه‌های فلورسنتس برخلاف پوتیدا و

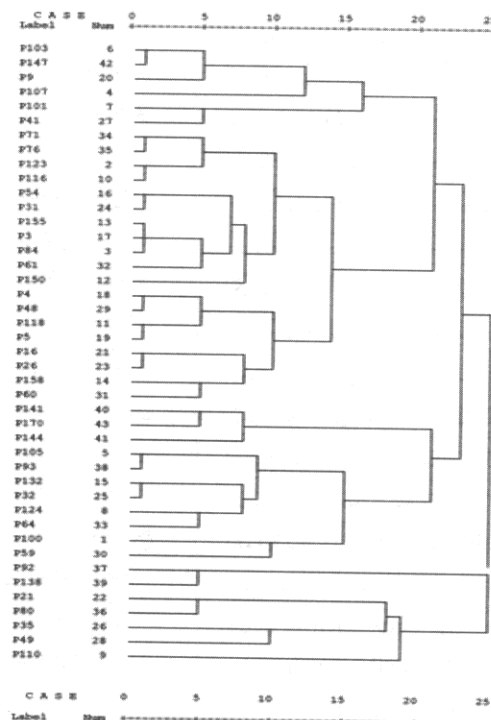
آنتی‌بیوتیک‌ها ادامه دارد روزی شاهد تولید مایه تلقیح موثری از این سویه‌ها باشیم، درچنین صورتی می‌توان تولیدگیاهان را بهبود بخشیده و آنها را در برابر عوامل بیماری‌زا ایمن نمود.

سبب تحریک و تقویت رشد گیاه می‌شوند. Iswandi و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند که اثر بازدارندگی ناشی از تولید سیدروفور در سویه سودوموناس 7NSK₂، نقش مهمی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا دارد. امید است با مطالعه و بررسی که بر روی این باکتری‌ها از نظر تولید سیدروفور، هورمون اکسین، ACC دامیناز، فنازین و سایر

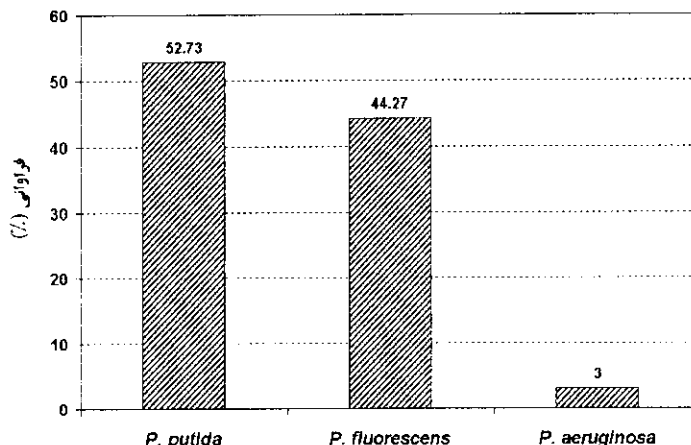


شکل ۱- مقایسه نقوش الکتروفورتیک ایزوله‌های *Pseudomonas* جدا شده از ریزوسفر گندم بر روی ژل آکریل‌آمید، جدایه‌ها به ترتیب از چپ بر است:

1-P59, 2-P60, 3-P61, 4-P64, 5-P71, 6-P76, 7-P80, 8-P124, 9-P92, 10-P93, 11-P138, 12-P141, 13-P144, 14-P147, 15-P170



شکل ۲- گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌های *Pseudomonas* جدا شده از ریزوسفر گندم بر اساس نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی



شکل ۳- فرآوانی گونه‌های سودوموناس جدا شده از ریزوسفر گندم

فهرست منابع:

۱. ریحانی تبار، ع. ۱۳۷۹. بررسی جمعیت پseudوموناسهای فلورسنت در ریزوسفر گندم کشت شده در خاکهای زراعی استان تهران و تعیین پتانسیل آنها برای افزایش رشد گیاهان. پایان نامه کارشناسی ارشد گروه خاکشناسی، دانشگاه تهران.
2. Alexander, D. B., and D. A. Zuberer. 1993. Responses by iron-efficient and inefficient oat cultivars to inoculation with siderophore-producing bacteria in a calcareous soil. *Biology and Fertility of Soils*. 16: 118-124.
3. Benizri, E., E. Baudoin, and A. Guckert. 2001. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology* 11: 557-574.
4. Boopathi, E., and K. S. Rao. 1999. A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1435: 30-40.
5. Bossis, E., P. Lemanceau, X. Latour, and L. Gardan. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. *Agronomie*. 20: 51-63.
6. Boven, G. D., and A. D. Rovira. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66:1-102.
7. De Freitas, J. R., and J. J. Germida. 1992. Growth promotion of winter wheat by fluorescent Pseudomonads under field condition. *Soil Biol. Biochem.* 24: 1137-1146.
8. Gardner, J. M., J. L. Chandler, and A. W. Feldman. 1984. Growth promotion and inhibition by antibiotic-producing fluorescent pseudomonads on citrus roots. *Plant and Soil*. 77:103-113.
9. Germida, J. J., and F. L. Walley. 1996. Plant growth promoting rhizobacteria affect rooting pattern and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field grown spring wheat. *Biology and Fertility of Soils*. 23: 113-120.
10. Gill, H. S., and D. Powell. 1968. Polyacrylamide gel electrophoresis of physiologic races A-1 to A-8 of *Phytophthora fragariae*. *Phytopathol.* 58: 721-723.
11. Bacteriology. 2nd Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
12. Hofte, M., K. Y. Seong, E. Jurkevitch, and W. Verstraete. 1991. Pyoverdinin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7SNK₂: Ecological significance in soil. *Plant and Soil*. 130: 249-257.

13. Iswandi, A., P. Bossier, J. Vandenaabeele, and W. Verstraete. 1989. Effects of seed inoculation with the rhizopseudomonas strain 7SNK₂ on the root microbiota of maize and barley. *Biol. Fertil. Soils*. 3: 153-158.
14. Kersters, K., and J. De Ley. 1975. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 87:333-342.
15. Khaliq, A., M. Arshad, A. Khalid, and Z. A. Zahir. 1996. Potential of *Azotobacter* and *Pseudomonas* for enhancing wheat (*Triticum aestivum* L.) yield. 7th International Symposium on BNF with Non-Legumes. Faisalabad, Pakistan. (Abst.) p. 170.
16. Kloepper, J. W., and M. N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. *Proceeding of the international Conference on Plant Pathogenic Bacteria 2*: 879-882
17. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685.
18. Lalande, R., N. Bissonnette, D. Coutlee and H. Antoun. 1989. Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil*. 1989. 115: 7-11.
19. Lambert, B., P. Meire, H. Joos, P. Lens and J. Swings. 1990. Fast growing, aerobic, heterotrophic bacteria from the rhizosphere of young sugar beet plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(11): 3375-3381.
20. Marschner, P., D. E. Crowley, and B. Sattelmacher. 1997. Root colonization and iron nutritional status of a *Pseudomonas fluorescens* in different plant species. *Plant and Soil*. 196: 311-316.
21. Moore, W. E., D. E. Hask, L. V. Holdeman, and E. P. Cato. 1980. Polyacrylamide slab gel electrophoresis of soluble proteins for studies of bacterial floras. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:900-907.
22. Mozafar, A., F. Duss, and J. J. Oertli. 1992. Effects of *Pseudomonas fluorescens* on the root exudates of two tomato mutants differently sensitive to Fe chlorosis. *Plant and Soil*. 144: 167-176.
23. Palleroni, N. J. 1986. I: pseudomonaceae. pp. 141-199. *In* Bacteriology. D. Hendricks, P. H. A. Sneath and J. G. Holt. (Eds.). Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
24. Rahimian. H. 1989. Occurrence of aggregate sheath spot of rice in Iran. *J. Phytopathol.* 125: 41-46.
25. Schaad, N. W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd Ed. APS Press.
26. Sorensen, J., J. Skouv, O. Nybroe. 1991. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida* by SDS-PAGE analysis of whole cell protein patterns. *FEMS Microbial Ecology*. 101: 41-50.
27. Thornley, M. J. 1960. The identification of Pseudomonads from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Applied Bacteriology*. 13: 37-52.
28. Todar, K. 2004. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-Madison. Department of Bacteriology, Wisconsin, USA. www.textbookofbacteriology.net
29. Vlassak, K., L. V. Holm, L. Duchateau, J. Vanderleyden and R. De Mot. 1992. Isolation and characterization of fluorescent *Pseudomonas* associated with the roots of rice and banana growth in Sri Lanka. *Plant and Soil*. 145: 51-63.

Population Density and Identification of Fluorescent Pseudomonads Associated with Rhizosphere of Wheat

M. H. Rasouli Sadaghiani, H. Rahimian, K. Khavazi,
M. J. Malakouti and H. A. Rahmani¹

Abstract

During the last decade, much research has been directed towards the potential use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Among the non-symbiotic rhizobacteria, much attention has been given to fluorescent pseudomonas spp., from which many effective inoculants have been prepared. Fluorescent *pseudomonads* with respect to their ability to produce siderophores and other plant growth promoting characteristics are of first priority for researchers. In order to isolate and identify native pseudomonas strains, 52 soil samples were collected from different locations representing rhizosphere of wheat and were assessed in terms of pseudomonas bacteria. Two hundred and one strains were isolated with King'B medium as fluorescent pseudomonads. The populations of these bacteria ranged between 1.51×10^5 to 6×10^8 cfu (colony forming unit) per gram soil. To evaluate protein pattern, the isolates were compared by electrophoresis of soluble proteins on polyacrylamide gel. The isolates were classified into 16 electrophoretic protein-polymorphic types based on their protein patterns in SDS-PAGE. The results of physiological and biochemical tests showed that *Pseudomonas putida* making up 52.73% of the total strains was the dominant genus in the wheat rhizosphere while 44.27 and 3 % of isolates consisted of *P. fluorescens* and *P. aeruginosa*, respectively. Therefore, owing to effective colonization of *putida* and *fluorescens* strains on wheat rhizosphere, the isolates may be good candidates for making PGPR inoculants.

Keywords: Plant growth-promoting Rhizobacteria (PGPR), Population density, Fl.

1- PhD student of Soil Science at Tarbiat Modares Univ., Prof. at Mazandaran Univ., Prof. at Tarbiat Modares Univ. and Members of Scientific Staff at Soil and Water Research Institute, respectively.