Archive of SID

ارزیابی توان تولید سیدروفور در سویه های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران

حسینعلی علیخانی، ناهید صالح راستین و هانی آنتون[1]*

چکیده

این بررسی با هدف مقایسهٔ پتانسیل تولید سیدروفور ریزوبیوم های بومی وانتخاب سویه های برتر، به منظور استفاده از آنها به عنوان ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) درکشت گیاهان زراعی لگوم وغیر لگوم، انجام شده است. به این منظور، ٤٤٧ جدایه از گروههای مختلف ریزوبیومی که از لگوم های مهم زراعی، کشت شده درخاکهای مناطق مختلف ایران، جداسازی وبراساس روش های استاندارد، شناسایی شده بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. بعلاوه، از ۲۹ سویهٔ پسودوموناس فلورسنس به عنوان شاهد مثبت (Sid^+) استفاده شد. توان تولید سیدروفور این سویه ها، با استفاده از محیط جامد حاوی کرم آزورلS(CAS- آگار)، مورد سنجش قرار گرفت. به دلیل حضور ماده دترژان HDTMA دراین محیط که برای رشد بسیاری از گونه های میکربی حالت بازدارندگی دارد، روش کشت مستقیم بر روی CAS- آگار با دو روش پلیت نیمانیم و محیط دولایه مقایسه گردید. محیط های کشت به روش قطره گذاری با ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه هر باکتری با جمعیت تنظیم شده در محدودهٔ 5×10^8 cfu ml^{-1} ، مایه زنی شدند وبرای هر سویه سه تکرار منظور گردید. درفواصل ۷، ١٤ و۲۱ روز انکوباسیون، قطر کلنی حاصل از رشد هر سویه وقطر هالهٔ نارنجی رنگ تشکیل شده در پیرامون آن، اندازه گیری شدند. حداکثر قطر هاله، نسبت قطر هاله به قطر کلنی وسرعت تغییر رنگ محیط برحسب میلی متر در روز، به عنوان معیارهایی برای مقایسهٔ توان تولید سیدروفور سویه های مورد آزمایش، درنظرگرفته شدند. نتایج نشان داد که اکثر سویه های ریزوبیومی، قادر به رشد مستقیم بر روی محیط CAS- آگار نبودند. سویه های مزوریزوبیوم سیسری، بیشترین (۷۷/۳٪) وسویه های سینوریزوبیوم ملیلوتی کمترین (۷٪) تعداد CAS^+ را داشتند. درمقایسهٔ سه روش کشت، روش پلیت نیمانیم کمترین حالت بازدارندگی را برای رشد این باکتریها داشت. با استفاده از این روش، حدود ٨٦ درصد از کل سویه های ریزوبیومی دارای توان تولید سیدروفور بودند. معهذا، براساس معیارهای مورد سنجش، این توان در بین آنها بسیار متفاوت بود. بهترین سویه ها شامل R_{305} از ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار فازئولی، R_{237} از گونه های جنس برادی ریزوبیوم (.Bsp) و R_7 و R_{38} از سینوریزوبیوم ملیلوتی بودند که حتی درمقایسه با تمام سویه های شاهد، توان تولید سیدروفور بالاتری را نشان دادند.

واژه های کلیدی: سیدروفور، سویه های ریزوبیومی،ریزوباکتریهای محرک‌رشد گیاه، معرف‌کرم آزورلS، آزمونCAS-آگار.

مقدمه

توان تولید سیدروفور Siderophore ازجمله ویژگیهایی کاست که براساس آن، ریزوبیوم ها را درگروه باکتریهای ریزسفری محرک رشد گیاه Plant growth Promoting Rhizobacteria -(PGPR) قرارداده اند. درسالهای اخیر توانایی تولید سیدروفور در سویه های متعددی از گونه های مختلف این باکتریها، به اثبات رسیده است (Arora و همکاران، ۲۰۰۱؛ Carson وهمکاران،۲۰۰۰؛ Fabiano و همکاران، ۱۹۹٤، Guerinot، ۱۹۹۱؛ Van Rossum و همکاران، ۱۹۹٤).

[1]- به ترتیب، دانشجوی دوره دکتری، دانشیار گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران و استاد دانشگاه لاوال کانادا

*- وصول:۸۱/۱۲/۲۷ و تصویب:۸۲/٦/۹

www.SID.ir

Archive of SID

سیدروفورها ترکیبهای آلی با وزن مولکولی کم (۵۰۰ تا ۲۰۰۰ دالتون) و لیگاندهای شیمیایی با میل ترکیبی شدید واختصاصی برای پیوند شدن با آهن III هستند (Guerinot، ۱۹۹۱؛ Marschner، ۱۹۹۵؛ Milagres و همکاران، ۱۹۹۹). این مواد توسط سلولهای میکربی، به منظور مقابله با تنش کمبود فرم قابل جذب آهن (<۲۰μM) ترشح و این عنصر را به فرم کلات محلول در می آورند که دراین حالت برای سلولهایی که دارای پذیرنده‌های غشایی اختصاصی باشند، قابل دسترس می گردد (Guerinot، ۱۹۹۱؛ Payne، ۱۹۹٤). گرچه توان تولید سیدروفور، درتمام باکتریهای هوازی، بیهوازی اختیاری وهمینطور در قارچها وجود دارد (Alexander وZuberer، ۱۹۹۱) ولی پتانسیل تولید این مواد درگونه‌های مختلف میکربی وحتی در سویه های متعدد داخل هرگونه، بسیار متفاوت است. این پتانسیل از سطح ناچیز وغیر قابل تشخیص با روش های متداول، تا مقادیر زیاد درحد چند صد میکرومول تغییر می کند وتنها انواعی که دارای توان تولید بالاتری هستند، می توانند برقابلیت دسترسی آهن درمحیط رشد خود اثر بگذارند. در دهه های گذشته، توجه به این ویژگی بر پسودوموناس های فلورسنت[1] معطوف بود ومحققین با تعیین مشخصات ساختمانی سیدروفورهای تولید شده توسط این باکتریها واستفاده از انواع خالص شده ویا از سویه های توانمند در تولید این مواد، نقش این باکتریها را درکنترل میزان آهن در محیط اطراف ریشه ها، محروم ساختن عوامل بیماریزا از جذب آهن ودرنتیجه، کنترل بیماریهای ریشه ای گیاهان مختلف، به اثبات رساندند (Ames- Gottfred و همکاران، ۱۹۸۹؛ Buyer و همکاران، ۱۹۸۹؛ Persmark و همکاران، ۱۹۹۰). درسالهای اخیر، بررسی بر روی تولید سیدروفورهای میکربی درخاک، توسعه بیشتری یافته و سایرمیکروارگانیسم های ریزسفری به ویژه ریزوبیوم ها وهمینطور، نقش این موجودات درافزایش قابلیت تحرک آهن درخاک ریزسفری ودرنتیجه، امکان افزایش قابلیت جذب این عنصر برای گیاه درشرایط تنش کمبود، مورد توجه قرار گرفته‌اند (Bar-Ness و همکاران، a,b ۱۹۹۲؛ Johnson و همکاران، ۲۰۰۲؛ Van Russen و همکاران، ۱۹۹٤). اهمیت ویژه سیدروفورها دربین انواع متابولیت های میکربی که در ریزوسفر آزاد می شوند، ازیک سو به دلیل نقش کلیدی آهن در فرآیندهای متابولیک حیاتی درگیاهان مانند تنفس، سنتز کلروفیل، سنتز پروتئین های همی[2] (سیتوکرم ها، کاتالاز و پراکسیدازها

[1] -Fluorescent Pseudomonads
[2] -Heme Proteins

...)، پروتئین های غیر همی[3] (مانند ماده ناقل الکترون فریدوکسین)[4] و... است (Marschner، ۱۹۹۵). از سوی دیگر، این توجه به ویژگیهای خاص عنصرآهن درخاک، ارتباط پیدا می کند. آهن با مقداری حدود ۵ درصد درلیتوسفر، چهارمین عنصر فراوان در پوسته زمین محسوب می شود. اکثر خاکها نیز حاوی مقدار فراوانی از این عنصر هستند که درشرایط تهویه مناسب و در pH حدود خنثی تا قلیایی اصولاً در وضعیت سه ظرفیتی وبه شکل اکسی هیدروکسیدهای[5] نامحلول است (Schwyn و Neilands، ۱۹۸۷). به عبارت دیگر، غلظت یون های Fe^{2+} و Fe^{3+} که می توانند توسط گیاهان ومیکروارگانیسم ها جذب شوند، درسیستم های تهویه شدهٔ واقع درمحدودهٔ pH فیزیولوژیک،کمتر از 10^{-15}M است (Marschner، ۱۹۹۵)، درحالیکه بطور معمول حد بحرانی آهن قابل جذب برای گیاهان زراعی، حدود ۲ تا ٤ میلی گرم در کیلوگرم خاک درنظر گرفته می شود. معهذا دراین شرایط بحرانی نیز همهٔ گیاهان با اتکاء به استراتژی خاص خود، که به لحاظ پاسخ فیزیولوژیک نسبت به تنش کمبود آهن (صرفنظر از موارد استثنایی گزارش شده درسالهای اخیر) به دو تیپ کلی استراتژی I و II تفکیک شده، کمابیش قادر به جذب مقداری آهن هستند. استراتژی I که عمدتاً درگیاهان دولپه ای وتک لپه ای (غیر گرامینه) مشاهده شده، با حداقل دو پاسخ فیزیولوژیک مشخص به کمبود آهن همراه است: ۱ـ افزایش فعالیت ردوکتاز مرتبط با غشاء پلاسمایی سلولهای پوست ریشه که موجب افزایش احیای آهن فریک درپلاسمالمای ریشه ها می شود.۲ـ تشدید ترشح یون H^+ از ریشه ها دراثر فعال شدن آنزیم‌های ATP آز که این جریان پروتون موجب کاهش pH آپوپلاسم سلولهای ریشه وهمچنین pH ریزسفر شده ودرنتیجه، قابلیت جذب آهن را افزایش می دهد (Jolley و همکاران، ۱۹۹٦). هر واحد کاهش pH از ۷ =pH به سمت ٤=pH، سبب هزار بار افزایش حلالیت آهن فریک می‌شود (Jolley و همکاران، ۱۹۹٦) .معهذا درخاکهای آهکی که ظرفیت بافری بالا دارند وبخصوص در صورت تراکم یون بیکربنات، این سیستم پاسخ، خنثی و بی اثر می‌گردد.گیاهان استراتژی I دربرخی موارد ترکیبهای احیاکننده و/یا کلات کننده، عمدتاً از نوع ترکیبهای فنولی مانند اسید کافئیک[6] نیز ترشح می کنند که در احیای Fe III و یا کلات کردن آهن

[3] - Non – heme Proteins (Iron – sulfur Proteins)
[4] - Ferredoxin
[5] -Oxyhydroxides
[6] -Caffeic acid

www.SID.ir

Archive of SID

مؤثرهستند(Marschner، ۱۹۹۵). استراتژی II که عمدتاً در گیاهان تک لپه ای تیره گندمیان[1] مشاهده شده، تولید فیتوسیدروفور یا مواد آلی کلات کننده آهن است که معمولاً از منطقه نوک ریشه[2] ترشح وکلات های آهن تشکیل شده را از مکان های جذبی اختصاصی واقع درهمان منطقه، برای گیاه قابل جذب می‌کند. فیتوسیدروفورها عمدتاً از اسیدهای آمینه غیرپروتئینی مانند اسید موجنئیک[3] هستند که با Fe III کمپلکس های پایداری تشکیل می دهند. این کلات های آهن سپس از طریق سیستم های انتقالی کاملاً اختصاصی موجود درغشاء پلاسمایی سلولهای ریشه، به سیتوپلاسم گیاه منتقل می شوند. چنین سیستم انتقالی، معمولاً درگیاهان استراتژی I وجود ندارد و بطوریکه آزمایش درمورد سویا نشان داده است، هنگامی که کلات آهن به این گیاهان داده می شود، احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} برای جذب شدن آهن توسط گیاه، ضرورت پیدا می کند(Jolley و همکاران، ۱۹۹٦). به رغم امکان استفاده گیاهان از دو استراتژی یاد شده، بطور معمول درنواحی خشک وخاکهای آهکی، کمبود آهن پدیده‌ای رایج دربین محصولات زراعی است که منجر به کاهش معنی دار بازده محصول می گردد (Carson و همکاران، ۲۰۰۰؛ Jolley و همکاران، ۱۹۹٦).

جبران این کمبود با استفاده از کودهای شیمیایی رایج (کلاتهای آهن) جز درمورد درختان میوه سودآور، برای سایر محصولات زراعی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیست. تولید ژنوتیپ های مقاوم به کمبود Fe که به لحاظ فیزیولوژیک درجذب آهن مؤثر باشند[4] و یا انتخاب کولتیوارهای مقاوم در شرایط مزرعه ای نیز به دلیل غیر یکنواخت بودن خاکها وشرایط محیطی، بسیار پیچیده است وبرنامه های اصلاح نباتات دراین مورد پیشرفت بسیار کند داشته و به حالت رکود رسیده‌اند (Jolley و همکاران، ۱۹۹٦).

به دلیل وجود این قبیل مشکلات، امکان استفاده از پتانسیل گروههای میکربی تولید کنندهٔ سیدروفور، مورد توجه بیشتری قرارگرفته است. بسیاری از میکروارگانیسم های ریزسفری و از جمله ریزوبیوم ها دارای سویه های متعددی هستند که سیدروفورها را به مقداری بیش از نیاز خود ترشح می کنند (Guerinot، ۱۹۹۱) .گرچه این امکان وجود دارد که غشاء پلاسمایی سلولهای ریشه‌ای گیاه فاقد پذیرنده های اختصاصی برای جذب این قبیل کمپلکس های آهن ـ سیدروفور باشند ولی بهر حال با تولید این کلات‌های محلول، قابلیت تحرک آهن در ریزسفرافزایش می یابد و می تواند همراه با جریان توده ای مواد درتماس کامل با سیستم ریشه ای قرار گیرد واز طریق مکانیسم های اختصاصی گیاه، جذب گردد. بعلاوه، با مطالعهٔ ساختمان شیمیایی سیدروفورهای میکربی خالص شده، تنوع بسیار زیادی حتی درانواع تولید شده توسط سویه های مختلف یک گونه، به اثبات رسیده است (Persmark و همکاران، ۱۹۹۰) که براین اساس، امکان استفاده مستقیم گیاه از برخی از این کلاتها، محتمل به نظر می رسد.

بنابه دلایل یاد شده، استفاده از توان بالقوهٔ سویه های توانمند در تولید سیدروفور، اهمیت پیدا می کند. اولین گام در راه شناسایی این سویه ها، یافتن روشی ساده وعملی است که غربالگری[5] تعداد زیادی از سویه های هر گونه را به سهولت مقدور سازد. روش هایی که درابتدا برای شناسایی سیدروفورهای میکربی مورد استفاده قرار می گرفتند، برمبنای تفکیک این مواد به دو گروه عمدهٔ هیدروکساماتها[6] ومواد فنولی ـ کاتکولی[7] بودند که هر گروه براساس عوامل فعال[8] مربوط به ساختمان شیمیایی اختصاصی خود، از طریق آزمون های رنگ سنجی[9] شناسایی می شدند.

به تدریج سیدروفورهایی با ساختمان جدید ومتفاوت با دو گروه فوق مانند ریزوباکتین[10] جدا شده از سویهٔ DM4 سینوریزوبیوم ملیلوتی، پیدا شدند که فاقد اجزاء اختصاصی مناسب برای این قبیل آزمون های شیمیایی بودند وکمپلکس های آنها با آهن، رنگ ضعیفی را در منطقه قابل رؤیت طیف نوری ایجاد می کردند. این انواع تنها با آزمون های بیولوژیک[11] غیر سریع و وقت گیر قابل بازیابی بودند. (Schwyn و Neilands، ۱۹۸۷) روشی جدید با حساسیت زیاد وقابل تعمیم برای انواع مختلف سیدروفورها ارائه کردند. این روش که به عنوان جامع ترین آزمون برای تشخیص واندازه گیری سیدروفورهای میکربی شناخته شده است (Payve، ۱۹۹٤) براساس میل ترکیبی شدید سیدروفورها با FeIII و مستقل از ساختمان شیمیایی این مواد می‌باشد(Schwyn و Neilands، ۱۹۸۷). ماده رنگی معرفی شده برای این

[1] -Graminae
[2] -Apical root zone
[3] -Mugineic acid
[4] -Physiologically Fe - efficient

[5] -Screening
[6] -Hydroxamates
[7] -Phenolates - Catecholates
[8] -Functional groups
[9] -Colorimetric
[10] -Rhizobactin
[11] -Bioassay

www.SID.ir

Archive of SID

روش کرم آزورل S (CAS)[1] است که کمپلکس آن با آهن، در حضور مادهٔ HDTMA[2] که یک دترژان کاتیونی است ومانع رسوب این کمپلکس می شود، رنگ آبی تیرهٔ مشخصی تولید می کند. سیدروفورها به دلیل میل ترکیبی بیشتری که برای تشکیل کمپلکس با Fe III نسبت به ماده رنگی CAS دارند، در صورت اضافه شدن به این کمپلکس سه گانه (Fe-CAS-HDTMA) دریک محیط بافر شده با pH برابر ٦/٨، آهن را از کمپلکس رنگی فوق جدا می کنند. آزاد شدن آهن از رنگ وتشکیل کمپلکس آن با سیدروفور، موجب تغییر رنگ محیط می شود که به وضوح قابل مشاهده می باشد. این روش بسیار حساس است بطوریکه فقط ۱۰ µM از FeIII، رنگ محیط را کاملاً آبی می‌کند و درنتیجه، مقدار بسیار جزئی از سیدروفور میکربی می تواند منجر به تغییر رنگ محیط گردد (Schwyn و Neilands، ۱۹۸۷). محققین مختلف، اصول این روش را در محیط جامد حاوی ماده رنگی CAS[3]، با استفاده از روش های مختلف مایه زنی محیط جامد، بکار گرفته اند. هریک از این روش ها دارای مزایا و معایبی هستند که متعاقباً مورد بحث قرار خواهند گرفت.

این بررسی به منظور ارزیابی توان تولید سیدروفور درسویه های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران و با هدف استفاده کاربردی از سویه های برتر به عنوان عوامل محرک رشد گیاهان زراعی (PGPR)، انجام شده است. اهمیت این تحقیق درجستجو وانتخاب سویه های توانمند در تولید سیدروفور، با توجه به نقش مضاعف آهن درسیستم همزیستی لگوم ـ ریزوبیوم، به وضوح مشخص می گردد. بررسی ها نشان داده اند که سویه هایی از ریزوبیوم که قادر به تولید مقدار کافی سیدروفور باشند، درحالت زندگی آزاد در خاکهای دچار تنش کمبود آهن، توان رشد وتکثیر ومانـدگاری بیشتری دارند و در نتیجهٔ کلنیزاسیون بهتر ریشه‌ها، موجب افزایش گره بندی در گیاهان لگوم می شوند. Van Rossum وهمکاران (۱۹۹٤) درمطالعه روی ١٦ سویه ریزوبیومی همزیست با بادام زمینی، به این نتیجه دست یافتند که دو سویه که دارای بیشترین توان تولید سیدروفور بودند، بالاترین مقدار گره را (براساس وزن خشک) تولید کردند، درحالیکه دو سویهٔ دارای کمترین توان تولید سیدروفور، از نظر تولید گره نیز درپایین ترین سطح قرار داشتند. توان تولید سیدروفور می‌تواند نتایج رقابت بین سویه ها برای اشغال سیستم ریشه ای گیاه میزبان را نیز تحت تأثیر قرار دهد. علاوه بر بهبود گره بندی، برای کارآیی سیستم همزیستی درانجام فرآیند تثبیت نیتروژن نیز، فراهمی عنصر آهن کاملاً ضرورت دارد. آهن یکی از اجزاء اصلی سیستم آنزیمی نیتروژناز است که حدود ۱۰ تا ۱۲ درصد کل پروتئین سلول باکتری را تشکیل می دهد (Guerinot، ۱۹۹۱). همینطور بخش Heme مادهٔ لگ ـ هموگلوبین که حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد پروتئین محلول موجود درسلولهای گره حاوی ریزوبیوم ها را تشکیل می دهد، توسط باکتری سنتز می شود و بدون حضور این ماده، تثبیت نیتروژن ممکن نخواهد بود (Guerinot، ۱۹۹۱). نقش سویه های توانمند در تولید سیدروفور، در کنترل عوامل بیماریزای گیاهی نیز به اثبات رسیده است، Arora وهمکاران (۲۰۰۱) در بررسی ۱۲ سویهٔ سینوریزوبیوم ملیلوتی به این نتیجه رسیدندکه تنها دو سویهٔ تولیدکنندهٔ سیدروفور از این باکتریها، قادر به کنترل بیماری رایج پوسیدگی زغالی[4] ریشه های بادام زمینی هستند.

با استناد به دلایل یاد شده، اهمیت و ضرورت انتخاب سویه های توانمند درتولید سیدروفور،به منظور تولید انبوه مایه تلقیح‌های ریزوبیومی، روشن می‌گردد.

مواد و روشها

تهیه کشت خالص جدایه‌های ریزوبیومی

دراین تحقیق، ٤٤٧ جدایه از گونه‌های مختلف ریزوبیومی متعلق به انواع «گروههای هم تلقیح»[5]، به منظور ارزیابی توان آنها درتولید سیدروفور، مورد سنجش قرارگرفته‌اند. این باکتریها از گیاهان لگوم میزبان شامل یونجه، شبدر، نخود، باقلا، لوبیا، عدس، سویا و بادام زمینی، جداسازی شده‌اند وجز چند سویه از باکتری همزیست با سویا، همه از انواع بومی خاکهای مناطق مختلف ایران هستند. حدود ۸۰ درصد از این جدایه ها از کلکسیون میکربی مؤسسهٔ تحقیقات خاک وآب گرفته شده اند ومابقی متعلق به آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشکده کشاورزی می باشد. برای جدا سازی وتهیه کشت خالص جدایه ها از محیط کشت YMA[6] حاوی معرف قرمزکنگو و برای تشخیص ریزوبیوم ها از روش های میکرسپکی، کشت و آزمون توان ایجاد گره در ریشه گیاه میزبان[7] درشرایط کشت سترون، براساس روش های استاندارد (Beck و همکاران، ۱۹۹۳؛ Somasegaran و Hoben، ۱۹۹٤) استفاده گردید. کشت خالص هر جدایه درسه لوله آزمایش در پیچ

[1] -Chrome Azurol S
[2] -Hexadecyltrimethylammoniumbromide
[3] -CAS – agar Plates
[4] -Charcoal rot
[5] -Croos – inoculation groups
[6] -Yeast Mannitol Agar + Congo Rod
[7] -Plant infection test

www.SID.ir

Archive of SID

دارحاوی محیط کشت YMA مورب، تهیه وتا هنگام استفاده در حرارت حدود 4^0C نگهداری شدند. بعلاوه، ۲۹ جدایه از باکتری پسودوموناس فلورسنس[1] تولید کنندهٔ سیدروفور که طی تحقیق قبلی از خاکهای زیرکشت گندم جداسازی و شناسایی شده بودند، از کلکسیون باکتریهای مفید خاکزی آزمایشگاه بیولوژی خاک، به عنوان شاهد مثبت (Sid^+)، برای مقایسه با جدایه های ریزوبیومی، مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه سوسپانسیون باکتری

به منظور آماده سازی کشت تازهٔ هر جدایه و انجام آزمایش با تعداد مشخص ویکنواختی از هر باکتری، یک کلنی از کشت تازهٔ هر جدایه درشرایط سترون به ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط کشت مایع ریزوبیوم (YMB) مایه زنی شد. ارلن ها دردمای حدود 27^0C به مدت کافی برحسب تند رشد یا کند رشد بودن باکتری، بر روی دستگاه بهم زن دورانی (۱۰۰rpm) تا رسیدن به انتهای مرحله رشد لگاریتمی، قرار داده شدند. پس از این دورهٔ تکثیر، دانسیته نوری[2] سوسپانسیون هر جدایه به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر درطول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از منحنی های استاندارد که قبلاً برای گونه های مختلف ریزوبیومی تهیه شده بودند، جمعیت باکتری در هر میلی لیتر از سوسپانسیون، براساس دانسیته نوری آن تعیین و با استفاده از محلول رقیق کننده (NaCl 0.5%)، تعداد باکتری برای سوسپانسیون همهٔ جدایه ها در حدود 5×10^8 cfu ml^{-1} تنظیم گردید.

تهیه محیط جامد کرم آزورل S (CAS-Agar)

برای آماده سازی این محیط، چهار محلول زیر بطور جداگانه تهیه، سترون و سپس با هم مخلوط می شوند:

(۱) محلول معرف رنگی : ۱۰ میلی لیتر از محلول حاوی آهن (۱ میلی مول $FeCl_3.6H_2O$ در۱۰ میلی مول HCl) با ۵۰ میلی لیتر ازمحلول CAS (۱/۲۱ میلی گرم درمیلی لیترآب) به آرامی مخلوط می شود. این مخلوط که به رنگ ارغوانی تیره است، به آهستگی ودرحال بهم زدن مداوم به ۴۰ میلی لیتر از محلول HDTMA (۱/۸۲ میلی گرم درمیلی لیتر آب) اضافه می شود. محلول حاصل با رنگ آبی تیره وپایدار، بطور مجزا اتوکلاو و تا دمای حدود 50^0C سرد می شود.

تمام محلول های لازم برای تهیه این معرف رنگی باید برای هر سری کشت، بطور تازه تهیه شوند.

(۲) محلول بافر : برای تهیه این محلول ۳۰/۲۴ گرم از بافر Pipes[3] در۷۵۰ میلی لیتر از یک محلول حاوی ۰/۳ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم NaCl و ۱گرم NH_4Cl حل می شود. pH محیط با استفاده از محلول ۵۰ درصد KOH در ۶/۸ تنظیم می گردد وحجم بافر با اضافه کردن آب به ۸۰۰ میلی لیتر رسانده می شود. پس از اضافه کرن ۱۵ گرم آگار به این محیط بافر و سترون کردن آن دراتوکلاو، دمای آن به حدود 50^0C رسانده می شود.

(۳) محلول غذایی : این محلول حاوی ۲ گرم گلوکز، ۲گرم منیتل، ۴۹۳ میلی گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱۱ میلی گرم $CaCl_2$، ۱/۱۷ میلی گرم $MnSO_4.H_2O$، ۱/۴ میلی گرم H_3BO_3، ۰/۰۴ میلی گرمH_2O۵ و$CuSO_4$ ، ۱/۲ میلی گرم $ZnSO_4.7H_2O$ و ۱/۰ میلی گرم $Na_2MoO_4.2H_2O$ در۷۰ میلی لیتر آب است که پس از اتوکلاو ، به دمای 50^0C رسانده می شود.

(۴) محلول کازامینواسید : ۳۰ میلی لیتر از محلول کازامینواسید (۱۰ درصد) ، با استفاده از روش صاف کردن روی صافی غشایی با قطر منافذ $0/45m\mu$ ، سترون می شود. پس از آماده شدن چهار محلول فوق، محلول های غذایی (Arora و همکاران، ۲۰۰۱؛ Bar-Ness و همکاران. A ۱۹۹۲) به محلول بافر(شماره ۲) اضافه می‌شوند و ضمن بهم زدن آرام ومداوم مخلوط آنها، در مرحلهٔ آخر محلول معرف رنگی به آهستگی به آنها اضافه می‌گردد. مخلوط چهار محلول، پس از یکنواخت شدن، برحسب نحوهٔ کشت در ظروف سترون توزیع می گردد.

روش‌های کشت روی محیط CAS-Agar

برای تشخیص تولید سیدروفور توسط سویه‌های ریزوبیومی روی محیط جامد، سه روش کشت مورد استفاده قرار گرفتند:

(۱) **روش کشت مستقیم**[4]: محیط CAS ـ آگار به مقدار ۲۵ میلی لیتر در ظروف پتری سترون به قطر ۹ سانتیمتر توزیع گردید.

پس از انجماد کامل محیط، هرظرف پتری به چهار قسمت مساوی علامت گذاری شد. مرکز هر قسمت با مقدار ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه باکتری با جمعیت تنظیم شده (5×10^8 cfu ml^{-1}) ، با روش قطره گذاری[5]، مایه زنی گردید.

پس از انکوباسیون ظروف کشت شده در دمای 28^0C، جدایه‌هایی که قادر به رشد روی محیط CAS ـ آگار و تولید سیدروفور بودند، با ایجاد هالهٔ نارنجی رنگ

[1] -Pseudomonas fluorescens
[2] -Optical density

[3] -1,4- Piperazinediethanesulfonic acid (pipes)
[4] -Direct Plate method
[5] -Drop Plate Method

www.SID.ir

Archive of SID

در پیرامون کلنی رشد یافته، مشخص گردیدند. قطر کلنی باکتری وقطر هالهٔ اطراف آن درفواصل زمانی ۷ ، ۱٤ و۲۱ روز اندازه گیری شدند.

(۲) روش کشت نیمانیم[1]: دراین روش ابتدا محیط YMA بعنوان محیط غذایی مناسب برای رشد ریزوبیوم ها به مقدار ۲۵ میلی لیتر در ظروف پتری سترون به قطر ۹ سانتیمتر توزیع شد. پس از انجماد کامل این محیط، نیمی از آن با رعایت شرایط سترون برش داده شد و از ظرف خارج گردید. سپس نیمهٔ خالی شده با ۱۲/۵ میلی لیتر از محیط CAS- آگار پر گردید.

سوسپانسیون تازه هر جدایه با تراکم جمعیت 5×10^{8} cuf ml^{-1} به مقدار ۷ μl درچهار نقطه از هر ظرف پتری به روش قطره‌گذاری، قرارداده شد. دو نقطه تلقیح در روی محیط YMAو نزدیک به خط تماس بین دو محیط، یک نقطه نزدیک به مرکز محیط YMA و یک نقطه در مرکز محیط CAS- آگاردرنظرگرفته شدند تا براساس میزان رشد باکتری در مکان‌های مایه زنی شده، درجه بازدارندگی محیط CAS- آگار برای هر جدایه مشخص گردد. قطر هاله نارنجی رنگ ایجاد شده بر روی محیط CAS- آگارو قطر کلنی باکتری، درفواصل ۷، ۱٤ و۲۱ روز اندازه گیری و شاخص های مربوط به حداکثر قطر هاله، نسبت قطر هاله به قطر کلنی، سرعت توسعه هاله برحسب میلی متر در روز ونیز درجه بازدارندگی محیط CAS- آگار برای هر جدایه، تعیین شدند.

(۳) روش لایه‌گذاری یا محیط دو لایه[2] : این روش با هدف جلوگیری از اثر بازدارندهٔ رشد محیط CAS- آگار نسبت به باکتریهای ریزوبیومی می باشد برای اولین بار و توسط نگارندگان این مقاله ابداع و معرفی گردیده است. در این روش، ابتدا درهر ظرف پتری به قطر ۹ سانتیمتر مقدار ۲۵ میلی لیتر از محیط CAS- آگار ریخته شد. پس از انجماد این محیط، مقدار ٦/۵ میلی لیتر از محیط غذایی مناسب برای رشد ریزوبیوم ها (محیط YMA) به هر ظرف پتری اضافه گردید، بطوریکه یک لایهٔ نازک به قطر حدود ۱ میلی متر بر روی سطح محیط CAS- آگار تشکیل دهد. هرظرف به سه قسمت مساوی تفکیک ومرکز هر قسمت با مقدار ۷ μl از سوسپانسیون کشت تازه هر جدایه (با جمعیت 5×10^{8} cfu ml^{-1}) مایه زنی گردید. رشد باکتری بر روی محیط کشت YMA، درصورتیکه با تولید سیدروفور همراه می بود، منجر به ایجاد هاله نارنجی در لایهٔ زیرین محیط CAS) می‌گردید. در مورد جدایه های Sid^{+}، قطر کلنی باکتری وقطر هاله اطراف کلنی در فواصل زمانی ۷، ۱٤ و۲۱ روز اندازه‌گیری شدند.

نتایج و بحث

۱ـ مقایسه روش ها

مشکل اصلی محیط CAS- آگار ، حالت بازدارندگی آن برای رشد تعداد زیادی از گونه ها و سویه های میکربی است. ابداع کنندگان این روش، خود به مشکل عدم رشد باکتریهای گرم مثبت وبرخی از انواع گرم منفی، روی این محیط اذعان داشته اند (Schwyn و Neilands، ۱۹۸۷) این اثر بازدارندهٔ رشد به دلیل حضور دترژان کاتیونی HDTMA در کمپلکس رنگی است که در غلظت مورد استفاده، برای بسیاری از میکرواگانیسم ها حالت سمی دارد و در عین حال کاهش غلظت آن، به این دلیل که موجب رسوب رنگ می شود، مقدور نیست (Alexander و Zuberer، ۱۹۹۱).

(Alexander و Zuberer، ۱۹۹۱) ضمن بررسی جمعیت باکتریهای تولید کننده سیدروفور دربین انواع کلنیزه کنندهٔ ریشه های دوگونه گیاه علفی از گرامینه ها که به لحاظ حساسیت به کمبود آهن با هم تفاوت داشتند، محیط CAS- آگار را برای مطالعات اکولوژیک مناسب ندانستند. طبق گزارش این محققین حدود ۷۱ تا ۷۹ درصد از جمعیت باکتریهای ریزسفری که در محیط غذایی غیر انتخابی مانند TSA[3] رشد کرده بودند، قادر به رشد روی محیط CAS- آگار نبودند. همینطور با اضافه کردن HDTMA به محیط TSA به مقداری معادل با محیط CAS- آگار، جمعیت باکتریها حدود ۹۰ درصد کاهش نشان داد. نتایج این تحقیق بر روی ریزوبیوم ها نشان داد که بسیاری از سویه های ریزوبیومی نیز قادر به رشد مستقیم روی محیط CAS- آگار نیستند (جدول ۱). نسبت سویه های رشد یافته بر روی این محیط (CAS^{+}) نیز در گونه های مختلف تفاوت داشت. سویه های سینوریزوبیوم ملیلوتی، کمترین (۷٪) و سویه های مزوریزوبیوم سیسری بیشترین (۷۷/۳٪) نسبت سویه‌های CAS^{+} را داشتند.

Ames-Gottfredو همکاران (۱۹۸۹) استفاده از خصوصیت رشد ویا عدم رشد روی محیط CAS- آگار را به عنوان یک روش ایده‌آل و مکمل روش سرولوژیک برای مقایسه توان رقابتی بین سویه های ریزوبیومی همزیست با گیاه شبدر در تشکیل گره های ریشه ای معرفی کردند. Carson وهمکاران (۲۰۰۰) درمطالعه روی ٦۰ سویه از باکتریهای تولید کنندهٔ گره در انواع لگوم های علوفه ای وحبوبات، شامل ٤۰ سویه از مایه تلقیح‌های تجارتی رایج

[1] -Half Plate Method
[2] -Double Layer Method
[3] -Tryptic soy Agar

www.SID.ir

Archive of SID

در استرالیا، گزارش کردند که هیچیک از ۲۲ سویه برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم مورد بررسی، CAS^+ نبودند). در حالیکه Van Rossum و همکاران (۱۹۹٤)، در مطالعه روی ۱٦ سویه برادی ریزوبیوم همزیست با بادام زمینی (Peanut) *radyrhizobiun* sp. اعلام داشتند که تنها ۲ سویه از این باکتریها CAS^+ نبودند. نتایج این تحقیق نیز نشان می دهند که سویه های برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم نسبت به سایر گونه های برادی ریزوبیوم (Bsp)، به محیط CAS- آگار حساستر هستند، بطوریکه درصد انواع CAS^+ در بین آنها به ترتیب ۸/۷ و۲۳ درصد تعیین گردید.

لازم به توضیح است که اگر باکتری ریزوبیومی قادر به رشد بر روی محیط CAS باشد، توان یا عدم توان تولید سیدروفور را بوضوح نشان می دهد، بطوریکه در این بررسی در مورد هیچ سویه ای مشاهده نشد که در رشد مستقیم بر روی محیط CAS حالت Sid^- و در دو محیط دیگر حالت Sid^+ داشته باشد. تنها مشکل این محیط حالت سمی آن برای بسیاری از سویه های باکتری است که برای اجتناب از این اثر سمی، دو روش کشت دیگر شامل (Milagres و همکاران، ۱۹۹۹) و کشت دو لایه نیز در این تحقیق مورد مقایسه قرار گرفتند. در این روش‌ها به دلیل اینکه باکتری روی محیط غذایی مناسب کشت می شود، حالت بازدارندگی محیط رنگی CAS که از طریق نفوذ HDTMA در نیمهٔ دیگر ظرف کشت ویا درلایهٔ فوقانی آن ایجاد می شود، به حداقل می رسد. نتایج مربوط به تعداد سویه های رشد یافته بر روی هریک از محیط ها و نیز تعداد کل سویه‌های مورد آزمایش مربوط به گونه های مختلف ریزوبیومی درجدول ۱ ارائه شده است.

همچنین جدول تجزیهٔ واریانس و نیز نمودار مقایسهٔ میانگین توان رشد باکتریهای ریزوبیومی با استفاده از روشهای مختلف کشت بر روی محیط CAS- آگار به ترتیب درجدول ۳ و شکل۱ نشان داده شده است .براساس نتایج حاصل، اولاً اختلاف کاملاً معنی داری (درسطح ۱ درصد) بین روشهای مختلف کشت مشاهده می شود ثانیاً روش پلیت نیمانیم، حداقل بازدارندگی را نشان می دهد، بطوریکه در مورد اکثر گونه ها و حتی در مورد گونهٔ برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم، تمام سویه‌های مورد آزمایش (۱۰۰٪)، در این شرایط قادر به رشد بودند. معهذا یکی از مشکلات این روش، تعیین فاصلهٔ مناسب برای قراردادن مایهٔ باکتری، نسبت به خط مرزی بین دو محیط است. این بررسی نشان داد که برخی از جدایه ها در صورت قرار گرفتن درمجاورت خیلی نزدیک خط مرزی، به دلیل نفوذ HDTMA دراین ناحیه رشد نمی کنند و یا رشد بسیار ضعیفی دارند و در فاصلهٔ دورتر، بخصوص در مورد انواع کند رشد و جدایه هایی که مقدار کافی سیدروفور برای نفوذ درنیمه دیگر ظرف تولید نمی کنند، هالهٔ تغییر رنگ روی محیط CAS مشاهده نمی شود. بعلاوه، تمام سطح ظرف قابل کشت نیست و از نیمهٔ آن هم تنها برای سویه های خالص شده می توان استفاده کرد. بنابراین برای مطالعات اکولوژیک که به منظور تشخیص و شمارش انواع تولید کنندهٔ سیدروفور، سوسپانسیون های رقیق شدهٔ خاک بایستی بر روی محیط کشت گسترده شوند، بهیچوجه کارآیی نخواهد داشت. درعین حال برای ارزیابی توان تولید سیدروفور کشت های خالص، روش مناسبی است و بدلیل حداقل بازدارندگی برای رشد گونه های ریزوبیومی، نتایج این تحقیق براساس این روش ارائه شده است.

جدول ۱ـ مقایسه میزان بازدارندگی محیط CAS- آگار بر رشد سویه‌های ریزوبیومی در سه روش کشت مستقیم، پلیت نیمانیم و محیط دو لایه

گروههای باکتری	Sm	Mc	Rlp	R_{lv}	Rlt	Bj	Bsp	Pf
			(تعداد سویه‌های رشد یافته به تعدادکل سویه‌ها)					
رشد مستقیم بر CAS- آگار	۱٦۸/۱۲	۸٤/٦٥	۵۷/۳۸	٦۰/٤٦	۸/۵	۵۷/۵	۱۳/۳	۲۹/۲۱
رشد در پلیت نیمانیم	/۱٦٥ ۱٦۸	۸٤/۸۳	۵۷/۵۷	٦۰/٦۰	۸/۸	۵۷/۵۷	۱۳/۱۲	۲۹/۲۹
رشد برمحیط دولایه	/۱۱٤ ۱٦۸	۸٤/۷۹	۵۷/۵٦	٦۰/۵۹	۸/۸	۵۷/۲۲	۱۳/۸	۲۹/۲٦

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲ـ مقایسه شاخص‌های توان تولید سیدروفور در گونه‌های مختلف ریزوبیومی و درجه بازدارندگی محیط CAS آگار برای سویه‌های هر گونه

گروههای باکتری (تعداد سویه)										
شاخص‌های‌اندازه‌گیری‌شده	دامنه نتایج	Sm	Mc	Rlp	Rlv	Rlt	Bj	Bsp	Total	Pf
توان تولید سیدروفور	Sid^+	۱۶۱	۷۷	۵۶	۵۱	۸	۲۲	۹	۳۸۴	۲۹
	Sid^-	۷	۷	۱	۹	۰	۳۵	٤	۶۳	۰
حداکثر قطر هاله (d = mm)	d<1>۰	۱	۱۱	۳	۲	۰	۱	۰	۱۸	۰
	d<5>۱	۹۲	۶۳	٤۶	۳۶	۷	۲۰	۱	۲۶۵	۱۰
	D<10>۵	۶۶	۳	٤	۱۲	۱	۱	۵	۹۲	۱۷
	D>10	۲	۰	۳	۱	۰	۰	۳	۹	۲
نسبت قطرهاله به قطر کلنی	R<1.5>۰	۲۸	۷۰	٤۰	۲۱	۵	۱۰	۱	۱۷۵	۳
	R<2.0>۱,۵	٤۷	۶	۹	۱۷	۱	۷	۲	۸۹	۶
	R<2.5>۲	۶٤	۱	۳	۹	۲	٤	۲	۸۵	۱۶
	R>2.5	۲۲	۰	٤	٤	۰	۱	٤	۳۵	٤
سرعت تشکیل هاله‌ها (V= mm day-$^{-1}$)	V<0.05>۰	۱	۱۲	۳	۲	۰	۱	۰	۱۹	۰
	V<0.15>۰,۰۵	۵۸	۶۰	٤۲	۳۰	۶	۱۱	۱	۲۰۸	۱
	V<0.25>۰,۱۵	۶۶	۰	۲	٤	۰	۵	۲	۷۹	۰
	V>0.25	۳۶	۵	۹	۱۵	۲	۵	۶	۷۸	۲۸
درجه بازدارندگی (I)	بدون بازدارندگی (I_1)	۱۲	۶۵	۳۸	٤۶	۵	۵	۳	۱۷٤	۲۱
	بازدارندگی‌ضعیف I_2))	۱۰۳	۱٤	۱۸	۱۳	۳	۱۷	۵	۱۷۲	۵
	بازدارندگی‌متوسط I_3))	۳٤	٤	۰	۱	۰	۲۶	۲	۶۷	۳
	بازدارندگی شدید(I_4))	۲۰	۱	۱	۰	۰	۹	۳	۳٤	۰

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس توان رشد باکتری های ریزوبومی با استفاده از روشهای مختلف کشت$^+$ بر روی محیط CAS-Agar

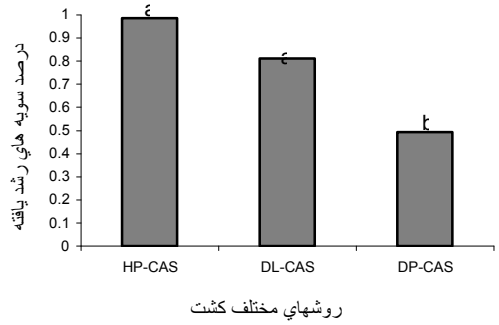
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات
روش کشت	۲	**۰/۵۰۰
خطا	۲۱	/۰٤۹

+ روشهای کشت نیمانیم, دو لایه و مستقیم

www.SID.ir

Archive of SID

** معنی دار در سطح یک درصد



شکل ۱- مقایسه میانگین توان رشد باکتری های ریزوبیومی با استفاده از روشهای مختلف کشت بر روی محیط CAS Agar

HP-CAS= Half Plate Method DL-CAS=Double Layer Method DP-CAS=Direct Plate Method

www.SID.ir

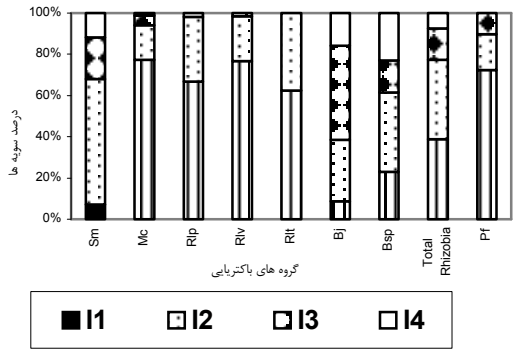
Archive of SID

روش لایه گذاری بر روی محیط CAS یا محیط دولایه، درمقایسه با روش پلیت نیمانیم، کمی بیشترحالت بازدارندگی نشان داده است ولی این اختلاف از نظر آماری معنی دار نمی باشد (شکل۱) از طرف دیگر مشکلات یاد شده برای پلیت نیمانیم را نیزندارد. تمام سطح محیط قابل استفاده است و می‌توان تعداد بیشتری جدایهٔ خالص ویا سوسپانسیون خاک را بر روی آن مورد آزمایش قرار داد. سیدروفور تولید شده به راحتی در لایهٔ زیرین نفوذ می کند و هالهٔ تغییر رنگ در این لایه، به وضوح قابل مشاهده است. در ضمن احتمال می رود که با اندک افزایشی در لایهٔ فوقانی بتوان درصد بازدارندگی را بهبود بخشید.

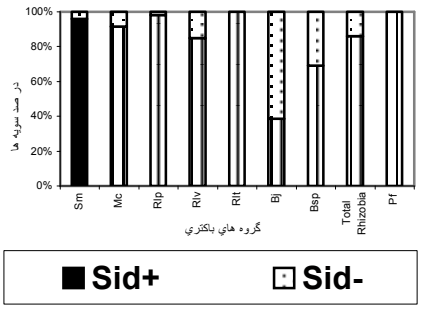
ضمن مقایسهٔ سه روش (کشت مستقیم، پلیت نیمانیم و محیط دو لایه) اثر بازدارندگی Inhibition effect - (I) محیط CAS برای باکتریهای ریزوبیومی از I_1 (بدون بازدارندگی، بصورت رشد مناسب روی این محیط) تا I_4 (بازدارندگی کامل به صورت عدم رشد درتمام محیط های فوق)، درجه بندی گردید. I_3،I_2 برای سویه های ناتوان از رشد مستقیم روی محیط CAS ولی به ترتیب قادر به رشد بر روی محیط دو لایه و پلیت نیمانیم، تنها قادر به رشد بر روی پلیت نیمانیم و رشد بسیار ضعیف بر روی پلیت نیمانیم، درنظرگرفته شدند که نسبت این درجات بازدارندگی در شکل ۲ برای گونه های مختلف ریزوبیومی ارائه شده است.

۲ـ سنجش نیمه کمی تولید سیدروفور

بررسی توان تولید سیدروفور توسط ٤٤٧ جدایه ریزوبیومی نشان داد که اکثر جدایه ها (۸۵/۹٪) قادر به تولید سیدروفور درحد قابل اندازه‌گیری هستند و تنها نسبت کمی از آنها (۱٤/۰۹٪) چنین ویژگی را نشان ندادند. جدایه های برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم کمترین (٦۱/٤٪) تعداد تولید کنندهٔ سیدروفور را داشتند. تمام سویه های پسودوموناس فلورسنس مورد استفاده به عنوان شاهد، Sid^+ بودند (شکل۳).



شکل ۲ - سطوح بازدارندگی محیط CAS-آگار برای گروه های مختلف ریزوبیومی و شاهد



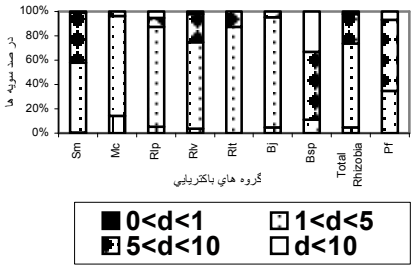
شکل ۳ - درصد سویه های بدون توان و دارای توان تولید سیدروفور در گروه های مختلف ریزوبیومی و شاهد

www.SID.ir

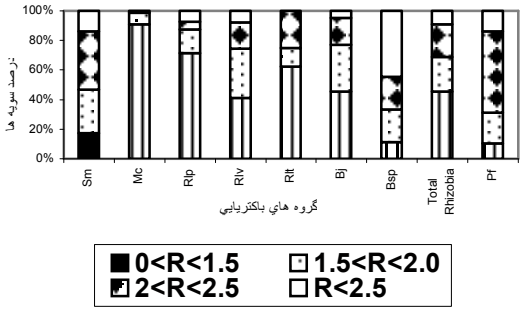
Archive of SID

برای بیشتر سویه ها، حداکثر قطر هالهٔ تغییر رنگ بین ۱ تا ۵ میلی متر بود و تنها در۹ مورد (شامل R_7 وR_{38} از سینوریزوبیوم ملیلوتی) این قطر به بیش از ۱۰ میلی متر رسید (جدول ۲). حداکثر قطر هالهٔ اندازه‌گیری شده برابر ۳۰ میلی متر و متعلق به سویه R_{305} از بیووار فازئولی بود ودو سویه R_{237} و R_{229} از برادی ریزوبیوم بادام زمینی به ترتیب با ۲۵ و ۱۶/۵ میلی متر، در مرتبه های بعدی قرار داشتند. گسترش قطر هاله می‌تواند نشانه‌ای از میزان تولید سیدروفور باشد که برای مقایسه گونه های مختلف ریزوبیومی تغییرات دامنهٔ آن برای هر گونه، در شکل ٤ ارائه شده است.

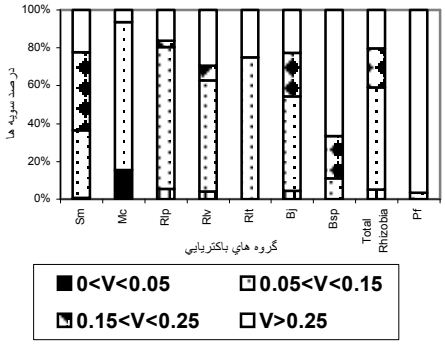
نسبت قطر هاله به کلنی می‌تواند معیار دقیقتری برای مقایسهٔ تولید سیدروفور به حساب آید، زیرا با وجود یکسان بودن مقدار مایهٔ اولیهٔ باکتری (μl ۷)، سرعت رشد سویه ها و در نتیجه، قطر کلنی تشکیل شده بر روی محیط، با هم تفاوت پیدا می کند و در نتیجه بر روی قطر هاله نیز اثر می گذارد. محدودهٔ شاخص قطر هاله به کلنی از صفر تا ۷ متغیر بود که هر چند بالاترین ارقام آن به ٤ سویه شامل R_{305} از بیووار فازئولی، R_{237} و R_{229} از برادی ریزوبیوم بادام زمینی و R_{490} از بیووار ویسیه تعلق داشت، معهذا در مجموع، اکثر سویه هایی که دربالاترین حد این محدوده (2.5<) قرار داشتند، متعلق به گونهٔ سینوریزوبیوم ملیلوتی بودند (شکل۵).



شکل ٤ – توزیع سویه های ریزوبیومی و شاهد در سطوح مختلف مربوط به حداکثرقطر هاله (d بر حسب میلی متر)



شکل ۵– توزیع سویه های ریزوبیومی و شاهد در سطوح مختلف قطر هاله به قطر کلنی(R)



www.SID.ir

Archive of SID

شکل٦- توزیع سویه های ریزوبیومی وشاهد درسطوح مختلف سرعت تشکیل هاله (V بر حسب میلی متر در روز)

سرعت تشکیل هاله از ۰ تا ۲/۹۳ میلی متردر روز بود و اکثر سویه ها از این لحاظ در محدودهٔ متوسط (۰/۰۵ تا ۰/۱٤) جای داشتند (جدول۲ و شکل ٦). بالاترین سرعت واکنش مربوط به سویه های R_{237} از برادی ریزوبیوم بادام زمینی، R_{305} از بیووار فازئولی، R_7 و R_{38} از سینوریزوبیوم ملیلوتی بود که از این لحاظ برتمام سویه های ریزوبیومی و حتی بر سویه های شاهد، برتری نشان دادند. Van Rossum و همکاران (۱۹۹٤) در بررسی تولید سیدروفور توسط سویه های برادی ریزوبیوم همزیست با بادام زمینی به برتری سویهٔ سینوریزوبیوم ملیلوتی استفاده شده به عنوان شاهد، اشاره داشته و متذکر شده اند که این باکتری هاله ای وسیعتر و پر رنگ تر از گونه های برادی ریزوبیوم داشته است. بطور مقایسه سطح هاله به کلنی درمورد این گونه برابر ٥/٦ بود، درحالیکه برای گونهٔ برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم حداکثر به ۲/۸ و در مورد ١٦ سویه همزیست با بادام زمینی، تنها دریک مورد به ٤/۹ رسید. دلیل این امر را کندی رشد برادی ریزوبیوم ها، نیاز کمتر به آهن و در نتیجه تولید کمتر سیدروفور دانسته اند. بعلاوه، به این نکته اشاره داشته اند که سیدروفور تولید شده توسط بسیاری از برادی ریزوبیوم‌ها به صورت سیترات است که میل ترکیبی ضعیف تری با FeIII دارد و در نتیجه هالهٔ ضعیفتری ایجاد می‌کند بنابراین باید دو سویهٔ بومی R_{237} و R_{229} متعلق به برادی ریزوبیوم بادام زمینی را از این نظر مستثنی دانست، زیرا همانطور که در بالا اشاره شد، این دو سویه از نظر حداکثر قطر هاله و نیز نسبت قطر هاله به کلنی، بربهترین سویه های سینوریزوبیوم ملیلوتی (R_7 و R_{38}) برتری نشان داده اند وحتی سویهٔ R_{237} بالاترین سرعت انجام واکنش را در بین تمام سویه ها، به خود اختصاص داده است. Plessner و همکاران (۱۹۹۳) در مطالعه روی دو سویهٔ برادی ریزوبیوم ژاپنیکوم گزارش کردند که این باکتری در شرایط تنش کمبود آهن، قادر به مصرف سیدروفورهای میکربی مانند فری کرم، رودوترولیت و پسودوباکتین St3 است که این توان استفاده از سیدروفورسایرگروههای میکربی می تواند یک امتیاز رقابتی برای این باکتریها در ریزسفر محسوب گردد Fabiano و همکاران (۱۹۹٤) در بررسی ٦۷ سویه از کلکسیون ریزوبیومی اوروگوئه، به این نتیجه رسیدند که اکثر ریزوبیوم ها قادر به تولید سیدروفور هستند و بالاترین توان تولید را در سویه های همزیست با یونجه و شبدر، اعلام داشتند، درحالیکه در مورد ریزوبیوم های همزیست با گونه های لوتوس[1]، تولید سیدروفور منفی و یا درسطح بسیار ضعیفی مثبت بود. رنگ هالهٔ اطراف کلنی همهٔ سویه های ریزوبیومی مورد استفاده در این تحقیق، نارنجی مایل به قرمز بود. Milagres و همکاران (۱۹۹۹) به این نکته اشاره داشته اند که درمحیط CAS_ آگار، سیدروفورهای تیپ منو هیدروکسامات وتری هیدروکسامات، به ترتیب رنگ نارنجی مایل به قرمز ونارنجی ایجاد می کنند، درحالیکه کمپلکس های کاتکولی موجب تغییر رنگ محیط از آبی به ارغوانی تا قرمز مایل به ارغوانی می گردند با استناد به این گزارش، می‌توان احتمال داد که اکثر سیدروفورهای تولید شده توسط جدایه های ریزوبیومی مورد بررسی، از تیپ هیدروکسامات‌ها بوده‌اند. در تأیید این نظر، Carson و همکاران (۲۰۰۰)، سیدروفورهای تولید شده توسط ۱۷ سویه ریزوبیومی را از تیپ دی‌وتری هیدروکسامات گزارش کرده اند. هرچند تولید سیدروفورهای دیگری مانند انواع مشابه تیپ کاتکولی[2] توسط برخی از سویه های برادی ریزوبیوم همزیست با بادام زمینی و لوبیا چشم بلبلی، انواعی با ساختمان شیمیایی اختصاصی مثل ریزوباکتین و یا تولید اسید آنترانیلیک Anthranilic acid توسط یک سویه از ریزوبیوم لگومینوزاروم نیزگزارش شده اند (Guerinot، ۱۹۹۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه باکتریهای توانمند در تولید سیدروفور، می توانند به عنوان عوامل محرک رشد گیاه مورد استفاده قرار گیرند و علاوه براین، وجود چنین ویژگی در ریزوبیوم ها موجب بهبود گره بندی و تثبیت نیتروژن در گیاهان همزیست با آنها می شود، انتخاب سویه های ریزوبیومی که توان بالایی در تولید سیدروفورها داشته باشند، اهمیت خاصی پیدا می کند.

برای تشخیص و انتخاب چنین سویه هایی، استفاده از محیط CAS ـ آگار و اعمال روشهای مناسب کشت، مانند محیط دو لایه و پلیت نیمانیم، قابل توصیه است. این روش بسیار حساس است و تولید مقدار بسیار جزئی سیدروفور را به وضوح قابل مشاهده می سازد. بعلاوه، به دلیل امکان اندازه گیری شاخص هایی مانند قطر هالهٔ تغییر رنگ محیط و تعیین سرعت توسعهٔ آن، مقایسهٔ بین سویه ها به صورت نیمه کمّی نیز میسر می گردد. در ضمن، به دلیل سرعت نسبی انجام آزمایش، امکان غربالگری تعداد بسیار زیادی از جدایه ها مقدورخواهد بود.

[1] - Lotus1.Van Rossum *et al*.
[2] -Catecho –like

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاری

این پژوهش از محل اعتبارات مربوط به طرح مطالعات و تحقیقات بین دانشگاهی (دانشگاه تهران ودانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان) به شماره طرح ۳۱۳۰۳۳۷۱ کد پروژه ۰۱۶ انجام پذیرفته است. لذا از مساعدت معاونت محترم پژوهشی دانشگاههای تهران و ولیعصر (عج) رفسنجان تشکر بعمل می آید. همچنین لازم است از همکاری استاد ارجمند جناب آقای دکتر محمدجعفر ملکوتی ریاست محترم مؤسسهٔ تحقیقات خاک وآب کشور ونیز همکاران بخش میکروبیولوژی خاک آن مؤسسه تشکر و قدردانی گردد.

فهرست منابع

1. Alexander, D.B. and D.A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate
2. Siderophore production by rhizosphere bacteria.Biol.Fertil. Soils 12:39-45
3. Ames – Gottfred, N.P., B.R.Christie and D.C.Jordan. 1989. Use of the chrom azurol S agar plate technique to differentiate strains and field isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii.Appl.Environ. Microbiol. 55: 707-710.
4. Arora, N.K., S.C.Kang and D.K.Maheshwari. 2001. Isolation of siderophore – producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. Current Science. 81: 673-677.
5. Bar-Ness, E., Y.Hadar, Y.Chen, A.Shanzer and J.Libman. 1992. Iron uptake by plants from microbial siderophores. Plant Physiol. 99:1329-1335.
6. Bar-Ness, E., Y.Hadar, Y.Chen, V.Romheld and H.Marschner .1992.Short-term effects of rhizosphere microorganisms on Fe uptake from microbial siderophores by maize and oat. Plant Physiol.100:451-456.
7. Beck, D.P., L.A.Materon and F.Afandi .1993.Practical *Rhizobium*-Legume Technology Manual.Technical Manual No.19, ICARDA, Syria.
8. Buyer, J.S., L.J.Sikora and R.L.Chaney. 1989. A new growth medium for the study of siderophore – mediated interactions. Biol. Fertil. Soils 8: 97-101.
9. Carson, K.C., Meyer, J., Dilworth, M. J. (2000) Hy drokamate Siderophores of root nodule bacteria. Soil Biol. Bioc hem. 32:11-21.
10. Fabiano, E., G.Gualtieri, C.Pritsch, G.Polla and A.Arias. 1994. Extent of high-affinity iron transport systems in field isolates of rhizobia. Plant Soil 164:177-185.
11. Guerinot, M.L.1991. Iron uptake and metabolism in the rhizobia / legume symbioses. Plant Soil 130: 199-209.
12. Johnson, G.V., A. Lopez and N.La Valle Foster.2002. Reduction and transport of Fe from siderophores. Plant Soil 241:27-33.
13. Jolley, V.D., K.A.Cook, N.C.Hansen and W.B.Stevens. 1996. Plant physiological responses for genotypic evaluation of iron efficiency in strategy I and strategy II plants – A riview. J.Plant Nutri.19:1241-1255.
14. Marschner, H. 1995 .Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press .London.
15. Milagres, A.M.F., A.Machuca and D.Napoleao .1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay .J.Microbiol.Methods .37:1-6.
16. Payne, S.M.1994.Detection, isolation and characterization of siderophores .Methods Enzymol. 235:329-344.
17. Persmark, M., T.Frejd and B.Mattiasson.1990.Purification, characterization, and structure of pseudobactin 589 A,a siderophore from a plant growth promothig *Pseudomonas*. Biochemistry 29:7348-7356.
18. Plessner, O., T.Klapatch and M.L.Guerinot.1993.Siderophore utilization by *Bradyrhizobium japonicum*. Appl.Environ.Microbiol.59:1688-1690.
19. Schwyn, B. and J.B.Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal. Biochem. 160:47-56.
20. Somasegaran, P. and H.J.Hoben. 1994. Handbook for Rhizobia: Methods in Legume – *Rhizobium* Technology. Springer – Verlag, New York.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Van Rossum, D., A.Muyotcha and H.W.van Verseveld. 1994. Siderophore production by *Bradyrhizobium* spp. strains nodulating groundnut. Plant Soil 163:177-187.

www.SID.ir