Archive of SID

مجله علوم خاک و آب / جلد ۱۹ / شماره ۲ / ۱۳۸٤

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

میرحسن 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 $۱/۵۱ \times ۱۰^{۵}$ تا ۶×۱۰^{۸} سلول در هرگرم خاک ریزوسفری متغیر بود. به منظور بررسی پلی‌مورفیسم الگوی پروتئینهای سلولی، سویه‌های جداشده توسط الکتروفورز پروتئین‌های محلول بر روی ژل‌پلی‌اکریل آمید با یکدیگر مقایسه شدند. بر این اساس در بین جدایه‌های جمع‌آوری شده، ۱۶گروه الکتروفورزی تشخیص داده شدند. همچنین نتایج آزمایش‌های میکروسکوپی، آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی نشان داد که ۵۲/۷۳، ۴۴/۲۷ و ۳ درصد از جدایه‌ها به‌ترتیب متعلق به گونه‌های *P. putida* *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* بودند. بنابراین با توجه به کلونیزاسیون موثر گونه‌های پوتیدا و فلورسنس در ریزوسفر گندم، این سویه‌ها می‌توانند از نمونه‌های مفید برای ادامه بررسی به‌منظور تولید مایه تلقیح PGPR باشند.

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

مقدمه

ریزوسفر به لایه نازکی (معمولا یک الی سه میلی‌متر) از خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمی وکیفی 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 ویا 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" 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 *Azotobacter*، *Arthrobacter*، *Bacillus*، *Clostridium*، *Enterobacter*، *Hydrogenophaga*، *Serratia*، *Azospirillum* و *Pseudomonas* گزارش شده است

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

۲- وصول: ۸۳/۱۰/۲۰ و تصویب: ۸٤/٦/۷

www.SID.ir

Archive of SID

(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 (Khaliq و همکاران ۱۹۹٦، Germida و Walley ۱۹۹٦، 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. درشرایط 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، ۲۰۰٤). Palleroni و همکاران (۱۹۸٦) باکتری‌های جنس سودوموناس را بر اساس مطالعات همسانی rRNA/DNA به پنج گروه تقسیم‌بندی کردند. از پنج گروه مذکور اخیرا 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 (۲٥٤ نانومتر) بویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت فلورسنس دارند. این پیگمان‌های با خاصیت فلورسنت و محلول در آب از گروه سیدروفورها[1] هستند که برای سودوموناس‌های فلورسنت انواع اختصاصی از آنها مانند پیووردین[2] یا سودوباکتین[3] شناسایی شده‌اند (Boopathi و Rao، ۱۹۹۹). از مهمترین گونه‌های فلورسنت می‌توان به *P.fluorescens*، *P.putida*، *P.aeruginosa* و همچنین پاتوژن‌های گیاهی نظیر *P.syringae* و *P.cichorii* اشاره نمود (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰٤).

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 ، ۲۰۰٤). آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ٤۱ و ٤ درجه سانتی‌گراد از مهمترین شاخص‌های تفکیک گونه‌های *P.fluorescens*، *P.putida* و *P.aeruginosa* می‌باشند. سویه‌های گونه *P.putida* از نظر آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ٤۱ و ٤ درجه سانتی‌گراد به ترتیب منفی، منفی، منفی و مثبت هستند. گونه *putida* شامل دو بیووار[4] A و B و بیش از یک تاژک است (Bossis و همکاران، ۲۰۰۰، Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰٤). سویه‌های گونه *P.fluorescens* از نظر آزمون‌های ذوب ژلاتین، استفاده از قند ترهالوز، رشد در دماهای ٤۱ و ٤ 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 ، ۲۰۰٤). بیوار I بعنوان سودوموناس فلورسنس تیپیک محسوب می‌گردد. بیووار II علاوه بر سویه های marginalis، سایر انواع ساپروفیت را نیز شامل می‌شود. بیووار III حداقل شامل دو زیرگروه می‌باشد که از نظر توانائی 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 ٤۱ و ٤ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب مثبت، منفی، مثبت و منفی است.این گونه، به‌عنوان گونه تیپیک جنس سودوموناس بوده که توالی ژنوم آن تعیین گردیده و برای انسان بعنوان پاتوژن محسوب می‌شود (Bossis و همکاران، ۲۰۰۰، Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱ و Todar، ۲۰۰٤). سودوموناس آئروژینوزا دارای یک تاژک و قادر به تولید چند نوع رنگدانه است که مهمترین آنها پیوسیانین[5]

[1] - Siderophore

[2] - Pyoverdin

[3] - Pseudobactin

[4] - Biovar

[5] - Pyocyanin

www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد. این رنگدانه یک مشخصه متمایزکننده این گونه از سایرگونه‌ها است(Hoft وهمکاران، ۱۹۹۱، Todar، ۲۰۰٤).

استفاده از روشهای سریع و قابل‌تکرار نظیر الکتروفورز پروتئین‌های سلولی(SDS-PAGE)[1]، 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 شده‌است (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 پلی‌آکریل‌آمید الکتروفورز نموده و از روی نتایج الکتروفورز، جدایه‌ها را در ۱۲ گروه پلی‌مورفیک پروتئینی[2] (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 فلورسنس 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 وتحلیل تنها چهار باند الکتروفورزی ویژه ومتمایزکننده توانستند در زمان کوتاهی گونه‌های *P. fluorescens* ، *P. putida* و *P. aeruginosa* را در یک سطح اختصاصی شناسایی نمایند.

ریحانی‌تبار (۱۳۷۹) با بررسی فراوانی سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم و ارزیابی توان آنها بعنوان عوامل محرک رشد گیاه، از بین ۱۰۰ جدایه منتسب به سودوموناس‌های فلورسنت، ٤۰ 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 $1/26\times10^{6}$ باکتری در گرم خاک بود. همچنین نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان دادند که پاسخ گندم به تلقیح با سویه‌های سودوموناس فلورسنس در بیشتر شاخص‌های رشد مثبت بود. Alexander و Zoberer (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 از 10^{6}باکتری در گرم ماده خشک ریشه) استقرار یافته بودند در حالیکه تعداد سایر باکتری‌ها کمتر از 10^{4} سلول در گرم ماده خشک ریشه بود. در آزمایش دیگری Lalande و همکاران (۱۹۸۹) ضمن جداسازی و شناسایی باکتریهای ریزوسفر ذرت (اکتوریزوسفر، ریزوپلن و اندوریزوسفر) و بررسی پتانسیل محرک رشد بودن آنها نشان دادند گونه‌های سودوموناس بیشترین جمعیت (٦۳ ٪) را در ریزوسفر داشتند و بیشتر در سطوح ریشه[3] متمرکز شده بودند. در اندوریزوسفر جمعیت سودوموناس‌ها کمتر (۱۱٪) بود درحالیکه 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 (۱۹۸٤) ضمن بررسی جمعیت سودوموناسهای فلورسنت در ریزوسفر مرکبات نشان دادند که بیش از ٦۲ درصد سویه‌های فلورسنت ریزوسفر لیمو از گونه پوتیدا بودند و تعداد محدودی از گونه آئروژینوزا شناسائی شدند. همچنین پتانسیل تحریک رشد گیاه، در سویه های پوتیدا و فلورسنس 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 پنجه‌دهی گندم از مزارع استان‌های آذربایجانشرقی، آذربایجانغربی، زنجان، همدان، کرمانشاه، فارس، تهران، خراسان، کردستان و یزد تهیه گردید. نمونه‌ها قبل و بعد از انتقال به آزمایشگاه، در دمای ٤C نگهداری و بلافاصله مراحل جداسازی انجام شد. ارقام گندم نمونه‌های موردنظر شامل شهریار، نوید، الموت، الوند، مرودشت، زرین، قیاسی، فلات، شیراز، آتیلا، مهدوی، سرداری، کراس‌آزادی، طوس، کاسپارو، فلات۳، آذر۲، سبلان، گاسکوژن، تریتیکاله

[1]-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacryl-Amid Gel Electrophoresis

[2] - Protein-Polymorphic type

[3] - Rhizoplane

www.SID.ir

کتابخانه منطقه‌ای علوم و تکنولوژی شیراز

Archive of SID

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 ۲٤ الی ٤۸ ساعت رشد در دمای ۲۸ĊC پلیت‌ها با استفاده از لامپ UV از نظر وجود کلونی‌های با خاصیت پرتوافشان (فلورسنس) بررسی و کلونی‌های مورد نظر شمارش شدند. پس از تخمین جمعیت باکتری‌های سودوموناس، جدایه‌های موردنظر با استفاده از همان محیط کشت خالص‌سازی شدند. آنگاه به‌منظور 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. بدین‌ترتیب تعداد ۲۱۲ جدایه انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی روی محیط شیبدار حاوی محیط کشت KingB و همچنین آب مقطراستریل 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 ژل‌پلی‌اکریل آمید (SDS-AGE) با یکدیگر مقایسه شده و گروههای پلی‌مورفیک پروتئینی (PPT) تعیین گردیدند. بدین‌منظور ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت آگار مغذی رشد داده شدند. سپس یک کلونی از هر جدایه مورد نظر به یک لوله آزمایش حاوی ۳ میلی‌لیتر آب مقطر تلقیح گردید. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر بافر تریس کلراید (Tris-HCl0.06M, 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 ۰/۰۱۲۵ مولار و با pH=۸ به هر کدام از لوله‌ها اضافه و بهم زده شد. نمونه‌ها به مدت دو دقیقه در دمای ۱۰۰ĊC 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 ۲۰Ċ- نگهداری شدند. الکتروفورز با استفاده از سیستم ناپیوسته لاملی (Laemmli، ۱۹۷۰) روی ژل جداکننده ۱۰٪ و لایه فشرده کننده ۵٪ پلی‌اکریل آمید به ابعاد ۱×۱۲۰×۱۵۰ میلی‌متر در شدت جریان ثابت ۱۸ میلی آمپر انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل حاصل با استفاده از محلول رنگی حاوی متانول (۵۰ میلی‌لیتر)، اسیداستیک (۱۰ میلی‌لیتر) آب مقطر (۵۰ میلی‌لیتر) و کومازی بلو (۰/۱۲ گرم) به مدت ۳ الی ۱۲ ساعت انجام گرفت و به‌منظور 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 به‌ترتیب با ۱ و ۰ مشخص گردیدند. نتایج مربوط به ٤۲ 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 ٤۱Ċ، آزمون هیدرولیز آرژینین، توانایی تشکیل لوان از ساکارز، آزمون سیترات و استفاده از قندهای ترهالوز، مزواینوزیتول و گلوکز انجام گرفت (Gardner و همکاران، ۱۹۸٤ و Vlassak و همکاران، ۱۹۹۲). برای آزمون کاتالاز، از روش اضافه‌کردن محلول H_2O_2 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[1] (۳ گرم در لیتر) پپتون (۱۰ گرم در لیتر) NaCl (۵ گرم در لیتر) و آگار (۰/٤ 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، پپتون ۵ گرم در لیترو ژلاتین ۱۲۰ گرم در لیتر) انجام شد. آنگاه جدایه‌های مورد نظر بر روی محیط مذکور کشت و برای مدت ۲ هفته در دمای ۲۵Ċ نگهداری شدند. در این آزمایش از لوله‌های تلقیح‌نشده بعنوان شاهد استفاده شد. پس از سپری‌شدن مدت مذکور کلیه لوله‌ها برای مدت ۲ ساعت در دمای ٤Ċ قرار داده شدند. پس از آن لوله‌ها از یخچال خارج و هر لوله در

1- Beef extract

www.SID.ir

Archive of SID

صورت جاری‌شدن محیط آن به‌هنگام کج‌کردن، بعنوان لوله مثبت در نظر گرفته شد (Schaad، ۲۰۰۱). برای بررسی رشد در دمای ٤١°C جدایه‌ها در لوله‌های حاوی محیط غذایی مایع کشت داده شدند و رشد باکتری بعد از ۳ روز از روی کدورت محیط ومقایسه با شاهد تلقیح نشده مشخص گردید (Gardner و همکاران، ۱۹۸٤). هیدرولیز آرژینین با استفاده از روش Thornley (۱۹٦۰) انجام گرفت. محیط کشت این آزمون شامل پپتون (۱گرم در لیتر)، NaCl (۲/۵ گرم در لیتر)، K_2HPO_4 (۰/۳ گرم در لیتر)، فنل‌رد (۰/۰۱ گرم در لیتر) و آژرینین هیدروکلراید (۱۰ گرم در لیتر) در pH= ۷/۲ 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 آژرینین 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). سویه ها بصورت لکه ای روی آن کشت و در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. تشکیل کلونی های 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 $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۲ گرم در لیتر)، $NH_4H_2PO_4$ (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 pH=٦/۹ انجام شد. در این آزمون سویه‌های مثبت از روی تغیر 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 درلیتر)، کلرور پتاسیم (۰/۲ گرم درلیتر)، سولفات منیزیم (۰/۲ گرم درلیتر)، برم‌تیمول‌بلو (۱ میلی‌لیتر ۱/٦٪) و آگاروز (۱۲ گرم) بود. قندها بطور جداگانه در غلظت ۰/۲ درصد بوسیله فیلتر کردن با کاغذ صافی (به قطر ۰/٤۵ 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، ۱۹۸٤و Schaad، ۲۰۰۱).

بدین‌ترتیب 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 منتسب 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 $۱/۵۱\times۱۰^{۵}$ تا $٦/٤\times۱۰^{۸}$ سلول باکتری به ازاء هر گرم نمونه (خاک ریزوسفری) متغیر بود (جدول۱). تراکم جمعیت باکتری‌های سودوموناس در نمونه خاکهای ریزوسفری ارقام قیاسی، سرداری، الوند، آذر، طوس، مرودشت، سبلان، کاسپارو، گاسکوژن و نوید پایین‌تر از میانگین کل جمعیت سودوموناس‌ها($۹/٦۱\times۱۰^{۷}$) و در ریزوسفر ارقام شیراز، آتیلا، زرین، فلات، آذر۲، شهریار، سبلان، تریتیکاله، کراس‌آزادی 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 آذربایجان‌غربی 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 برده‌شده است (Gill و Powell ، ۱۹٦۸). 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 تیپ 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 فلورسنس و پوتیدا بودند و بقیه گروه‌های کوچک، سایر سودوموناس‌های فلورسنت را شامل شدند. از نظر قرارگرفتن 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 قرارگرفتند. 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 گونه های فوق قرار گرفتند. نتایج آزمونهای اکسیداز، کاتالاز، آرژینین‌دی‌هیدرولاز، سیترات وگلوکز در هر سه گونه مثبت بود. سویه‌های فلورسنس برخلاف پوتیدا و 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 سودوموناس های 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 وسبب ایجاد سویه‌های بینابینی یا حدواسط[1] 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* قرارگرفته، 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).

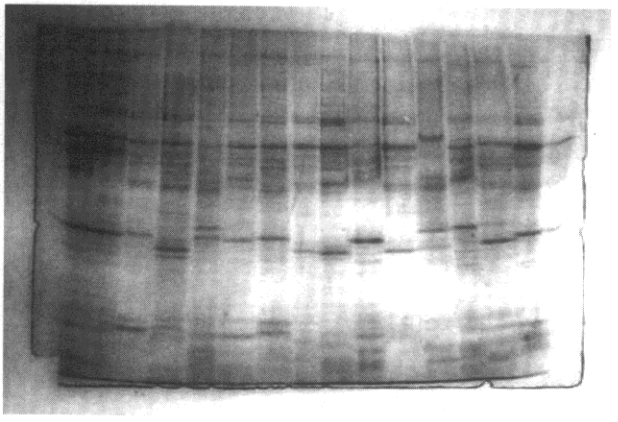
سودوموناس‌ها به ویژه گونه‌های پوتیدا و فلورسنس با استقرار در ریشه گیاهان از راه‌های مختلفی رشد آنها را تحریک می‌نمایند. مطالعه بیشتر این گونه‌ها از نظر تولید مواد تحریک کننده رشد گیاهی، دورنمای روشنی را در افزایش رشد گیاهان به ویژه غلات نوید می‌دهد. افزایش عملکرد در غلات با تلقیح بذری و خاکی سویه‌های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

1- Intermediate

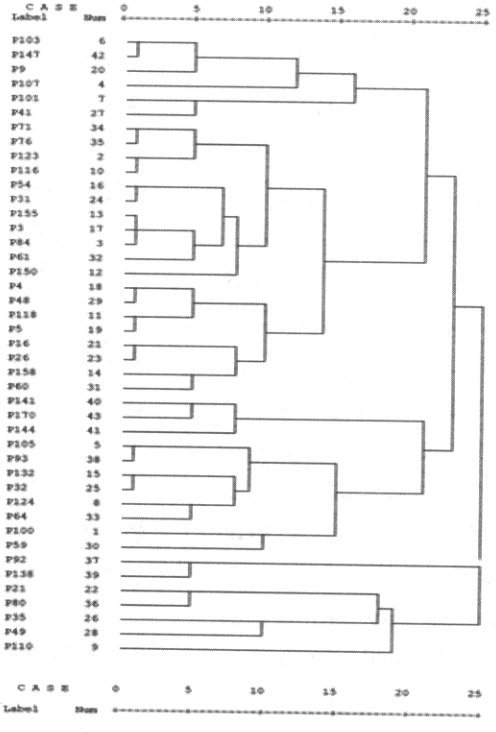
www.SID.ir

Archive of SID

سبب تحریک و تقویت رشد گیاه می‌شوند. Iswandi و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند که اثر بازدارندگی ناشی از تولید سیدروفور در سویه سودوموناس $7NSK_2$ ، 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 دآمیناز، فنازین و سایر 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.



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

www.SID.ir

Archive of SID

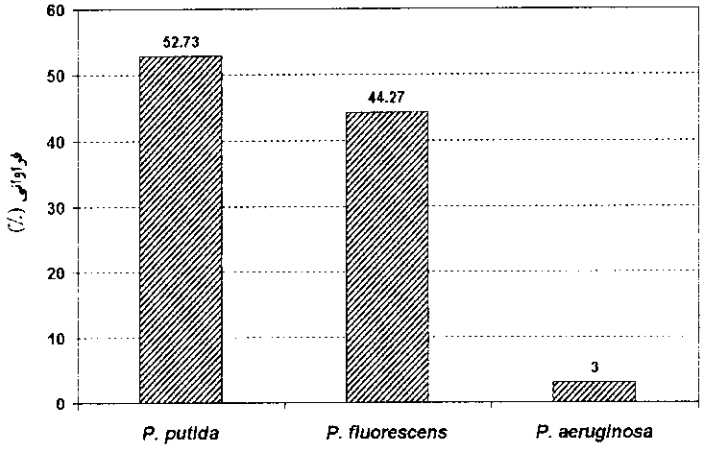
جدول ۱- تراکم جمعیت سودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر ارقام مختلف گندم (CFU/g soil)×

رقم گندم	استان									میانگین رقم
	آذربایجانشرقی	آذربایجانغربی	تهران	خراسان	کردستان	کرمانشاه	زنجان	همدان	یزد	فارس	
آنیلا	—	—	—	—	—	—	—	—	—	۱(۵/۵۱×۱۰^۸)	۵/۵۱×۱۰^۸
آذر۲	—	—	۱(۱/۲۸*۱۰^۶)	۱(۱/۳۴*۱۰^۸)	—	—	—	—	—	—	۶/۷۶*۱۰^۷
الوند	—	—	—	—	—	—	۱(۱/۲*۱۰^۸)	۳(۱/۳۵×۱۰^۷)	—	—	۴/۰۱*۱۰^۷
الموت	—	۱(۳/۴*۱۰^۸)	—	—	—	—	—	—	—	—	۳/۴*۱۰^۸
بومی	۱(۲/۲*۱۰^۷)	۵(۱/۸*۱۰^۸)	۱(۱/۱۷*۱۰^۸)	—	—	—	۲(۲/۵۷*۱۰^۷)	—	—	—	۱/۲۴*۱۰^۸
تریتیکاله	—	—	—	۱(۱/۳۷*۱۰^۷)	—	—	—	—	—	—	۱/۳۷*۱۰^۷
روشن	—	—	—	—	—	—	—	—	۱(۴/۲×۱۰^۷)	—	۴/۲*۱۰^۷
زرین	۱(۱/۱۵*۱۰^۸)	۳(۱/۴۸*۱۰^۸)	—	—	۱(۲/۲۹*۱۰^۷)	۵(۱/۱۸*۱۰^۸)	—	—	—	—	۱/۱۷*۱۰^۸
سیلان	—	—	—	۱(۲/۵۶*۱۰^۷)	—	—	—	—	—	—	۲/۵۶*۱۰^۷
شیراز	—	—	—	—	—	—	—	—	—	۱(۶*۱۰^۸)	۶*۱۰^۸
شهریار	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	۱/۴۴*۱۰^۸
طوس	—	—	—	۱(۲/۷*۱۰^۷)	—	—	—	—	—	—	۲/۷*۱۰^۷
فلات۳	—	—	—	۲(۷/۱۸*۱۰^۷)	—	—	—	—	—	—	۷/۱۸*۱۰^۷
قیاسی	—	—	—	—	—	۱(۱/۸*۱۰^۶)	—	—	—	—	۱/۸*۱۰^۶
کاسپارو	—	—	—	۱(۵/۷۱*۱۰^۶)	—	—	—	—	—	—	۵/۷۱*۱۰^۶
کراس‌آزادی	—	—	—	—	—	—	—	—	—	۱(۱/۱۲*۱۰^۸)	۱/۱۲*۱۰^۸
گاسکوژن	—	—	—	۱(۳/۸*۱۰^۶)	—	—	—	—	—	—	۳/۸*۱۰^۶
مرودشت	—	—	—	—	—	۶(۲/۳۸*۱۰^۷)	—	—	—	—	۲/۳۸*۱۰^۷
مهدوی	—	—	—	—	—	۱(۱/۴*۱۰^۸)	—	—	—	—	۱/۴*۱۰^۸
نوید	—	۱(۲/۸۳*۱۰^۸)	—	—	—	—	۱(۲×۱۰^۶)	۱(۴/۶۱*۱۰^۵)	—	—	۹/۵۱×۱۰^۷
میانگین استان	۶/۸۵*۱۰^۷	۱/۹۹*۱۰^۸	۵/۹۱*۱۰^۷	۴/۴۱*۱۰^۷	۲/۲۹*۱۰^۷	۷/۶۸*۱۰^۷	۲/۹۳*۱۰^۷	۱/۰۲*۱۰^۷	۴/۲*۱۰^۷	۴/۰۹*۱۰^۸	۹/۶۱*۱۰^۷

×- اعداد داخل پرانتز میانگین تراکم جمعیت سودوموناس‌های فلورسنت و عدد جلوی پرانتز نمایانگر تعداد نمونه‌هایی است که از ریزوسفر رقم مورد نظر تهیه شده است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- فراوانی گونه‌های سودوموناس جدا شده از ریزوسفر گندم

فهرست منابع:

۱. ریحانی‌تبار، ع. ۱۳۷۹. بررسی جمعیت پسودوموناسهای 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. Pyoverdin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain $7SNK_2$: Ecological significance in soil. Plant and Soil. 130: 249-257.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Iswandi, A., P. Bossier, J. Vandenabeele, and W. Verstraete. 1989. Effects of seed inoculation with the rhizopseudomonas strain $7SNK_2$ 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. Faislabad. 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 yonug 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 phathogenic 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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. Rahmani[1]

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.

www.SID.ir