مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۳، سال ۱۳۸۲ (۵۷۸-۵۷۱)

بررسی فراوانی و انتشار پسودوموناس‌های فلورسنت در مزارع گندم دراستان تهران و مطالعهٔ توان بازدارندگی جدایه ها از رشد قارچ عامل پاخوره گندم *Gaeumannomyces graminis var.tritici*

عادل ریحانی‌تبار[۱]، ناهید صالح راستین[۲]، مجتبی محمدی [۳] و حسینعلی علیخانی [٤]
۱، ۲، ۳، ٤، دانشجوی دوره دکتری، دانشیار، استادیار و مربی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۱۲/۱٤

چکیده

در این تحقیق فراوانی پسودوموناس‌های فلورسنت در فراریشه گندم و توان ٤۰ جدایه از گونهٔ *Pseudomonas fluorescens* بعنوان عوامل آنتاگونیست در برابر قارچ عامل بیماری پاخوره گندم *(G.g.tritici)* مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور نمونه‌های گیاه همراه با خاک فراریشه‌ای آن ازمزارع متعدد گندم در استان تهران، دشت قزوین و گرمسار جمع‌آوری شدند. شمارش این باکتریها با روش کشت رقت‌های خاک روی ظروف پتری حاوی محیط اختصاصی S_1 انجام گرفت. کشت خالص هر جدایه، پس از چند واکشت روی همان محیط تهیه گردید و جدایه‌ها براساس مطالعات میکروسکوپی و آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، تفکیک و شناسایی شدند. اثر بازدارندگی سویه‌ها بر روی قارچ عامل بیماری پاخورهٔ گندم، با استفاده از دو محیط PDA و NA بررسی شد. براساس نتایج حاصل، جمعیت قابل توجهی از پسودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم حضور داشتند که تعداد آنها در مزارع مورد مطالعــه در محدودهٔ cfu ۵×۱۰^{۳}-$۱/۲\times۱۰^{٦}$ در هر گرم خاک قرار داشت. اکثر سویه‌ها در روی هر دو محیط PDA و NA توانایی جلوگیری از رشد قارچ *G.g.tritici* را درشرایط آزمایشگاهی نشان دادند، اما این توانایی برای همهٔ سویه‌ها یکسان نبود ودرصد بازدارندگی از ۰ تا بیش از ۷۰ ٪ مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی : پسودوموناس فلورسنس، فراریشه ، بیماری پاخورهٔ گندم .

مقدمه

شناخت نقش مفید باکتری‌های خاکزی در افزایش رشد گیاهان ، بیش از یک قرن سابقه دارد. در چند دههٔ اخیر انواع متعددی از باکتریهای مفید ولی غیرهمزیست که بدلیل ویژگیهای فیزیولوژیک در فراریشه نسبت به خاک غیرفراریشه ای برتری دارند، به عنوان ریزوباکتریها یا باکتریهای فراریشه ای شناسایی و معرفی شده‌اند . این باکتریها بیشتر بدلیل تحریک رشد گیاه و نیز به لحاظ توان کنترل عوامل بیماریزای گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند. در بین انواع این گروه پسودوموناس‌های فلورسنت اهمیت ویژه‌ای دارند واستفاده از برخی گونه‌های‌آنها مانند *Pseudomonas fluorescens* برای کنترل بیماری پاخورهٔ گندم (۱۵، ۱۷، ۱۹) ، پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه نخود ایرانی (۷ ، ۱۴) و نخودفرنگی(۱۳) ، پنبه (۶)، بوته میری خیار (۹) و پوسیدگی سیاه ریشه توتون(۱۸) با موفقیت همراه بوده است. مکانیسم اثر بازدارندگی این باکتریها بر روی عوامل بیماریزا هنوز بدرستی مشخص نشده است اما در عین حال دلایلی همچون تولید آنتی بیوتیک‌ها، تولید سیدروفورها و تولید مواد ضد قارچی ارائه شده‌اند (۱۸). در سال ۱۹۷۹ برای اولین بار هاول و استیپانوویچ موفق شدند، نقش آنتی‌بیوتیک پایولوتئورین را در بازدارندگی رشدقارچهای *Pythium ultimum* و*Rhizoctonia solani* به اثبات برسانند(۱).کلوپروهمکاران درسال ۱۹۸۰ برای اولین بار به اهمیت سیدروفورهای تولید شده توسط این باکتریها، بعنوان یکی از مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک پی بردند (۳).

مکاتبه کننده: عادل ریحانی‌تبار

سیدروفورها لیگاندهای شیمیایی باوزن ملکولی نسبتا کم وازعوامل کلات‌کنندهٔ ویژه یون فریک هستند که می‌توانند آهن رسوب‌یافته را حل کرده و آنرا برای میکروارگانیسم تولید کنندهٔ سیدروفورقابل مصرف سازند. باکتری *Pseudomonas sp.B10* یا سیدروفور آن از پیشروی بیماری پژمردگی در گیاه جو ممانعت کرده، و با افزودن آهن ۳ ظرفیتی به خاک بازدارندهٔ بیماری، می‌توان همان خاک را به خاک مساعد برای بیماری تبدیل کرد (۳).

ونگ و بیکرموفق شدند بیماری پاخورهٔ گندم را با کمک پسودوموناس‌های فلورسنت یا ترکیب مصنوعی جاذب آهن بنام EDDA [اتیلن- دی‌آمین – دی استیک اسید] کنترل نمایند(۳). ولر و همکاران در سال ۱۹۸۸ گزارش دادندکه ۸۵٪ از سویه‌های فلورسنت جداسازی شده از ریشه‌های گندم کشت شده در یک بسترخاک محدودکننده بیماری پاخورهٔ گندم، هنگام رشد در محیط کشت مغذی KingB بطور بارزی از فعالیت قارچ *G.g.tritici* ممانعت کردند(۳).

باتوجه به اثرات مفید برخی از پسودوموناس‌های فلورسنت بویژه از نظر کنترل بیماری پاخوره گندم،در این تحقیق فراریشه گندم کشت شده در مزارع استان تهران، گرمسار و دشت قزوین از نظر وجود این باکتریهامورد بررسی قرار گرفت. پس از جداسازی و خالص کردن جدایه‌ها و انجام آزمایش‌های مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی ، ۴۰ سویه از گونهٔ *P.fluorescens* شناسایی شدند و اثر آنتاگونیستی این سویه‌ها نسبت به قارچ *G.g.tritici* در روی محیط‌های کشتPDA و NA بررسی شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در طول فصل رشد گندم از مزارع مختلف واقع در گرمسار، ورامین، شهریار، مشکین‌دشت، کرج، مزرعهٔ دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، پل کردان، آبیک و دشت قزوین اقدام به نمونه‌برداری گردید. برای تهیهٔ یک نمونه مرکب از هر مزرعه، از قسمت‌های مختلف آن بصورت زیگزاگ تعداد حداقل ۱۰ گیاه گندم با بیل از خاک بیرون آورده شد و کل سیستم ریشه گیاه همراه با خاک فراریشه ای درون کیسهٔ پلاستیک به آزمایشگاه منتقل گردید. بعد از نمونه‌برداری از هر مزرعه ، برای برداشت نمونه از مزرعهٔ بعدی وسایل نمونه‌برداری شستشو و سپس با الکل ۷۰ درجه بطور نسبی سترون می‌شدند. نمونه‌های خاک فراریشه ای پس از انتقال به آزمایشگاه در یخچال نگهداری و در کوتاهترین زمان ممکن، از نظر وجود پسودوموناس‌های فلورسنت مورد آزمایش قرار می‌گرفتند.

مقایسهٔ دو نع محیط کشت برای شمارش و جداسازی پسودوموناس‌های فلورسنت

ابتدا مقایسه‌ای بین محیط S_1 که توسط گولد و همکاران (۱۹۸۵) بعنوان محیط اختصاصی برای پسودوموناس‌های فلورسنت معرفی شده است، با محیط رایج King B انجام گرفت تا در آزمایش‌های بعدی از محیط مناسبتر استفاده شود. محیط کشت KB شامل پروتئوز پپتون۲۰ گرم، باکتوآگار۱۵ گرم ، گلیسرول۱۰ میلی‌لیتر، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) ۱/۵ گرم، منیزیم سولفات($MgSO_4.7H_2O$) ۱/۵ گرم و آب مقطر۱۰۰۰ میلی‌لیتر است وpH آن در ۷/۲ تنظیم می‌شود. محیط کشتS_1 در هر لیترشامل اجزاء زیر است:

باکتوآگار ۱۸ گرم، ساکارز ۱۰ گرم، گلیسرول۱۰ میلی‌لیتر، کازامینواسید۵ گرم، سدیم بی‌کربنات($NaHCO_3$) ۱ گرم، منیزیم سولفات ($MgSO_4.7H_2O$) ۱ گرم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات(K_2HPO_4) ۲/۳ گرم، سدیم لوریل سارکوزین (SLS) ۱/۲ گرم و۲۰ میلی‌گرم آنتی بیوتیک تری متو پریم و pH نهایی محیط ۷/۴ تا ۷/۶ است.اختصاصی بودن محیط S_1 بدلیل SLS وآنتی بیوتیک می باشد.SLS ازرشد باکتری‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و تری متوپریم مانع رشد پسودوموناس‌های غیرفلورسنت می‌شود. برای مقایسهٔ این دومحیط رقت‌های تهیه شده از چند نمونه خاک بر روی هر دو محیط KB و S_1 به روش پخش سطحی ، توزیع و پس از انکوباسیون در دمای مناسب، پرگنه‌های باکتری شمارش شدند.

تعیین جمعیت پسودوموناس‌های فلورسنت

در نمونه‌های گیاهی انتقال یافته به آزمایشگاه ابتدا قسمت هوایی هر گیاه قطع شد و سپس ریشهٔ هر نمونه با دست تکان داده شد تا خاک غیرفراریشه ای از ریشه‌ها جدا شود. سپس لایهٔ نازک (1-2mm) خاک چسبیده به ریشه را خاک فراریشه ای تلقی نموده و از مجموع نمونهٔ مرکب مربوط به هر مزرعه ،

حدود ۱۰ گرم خاک فراریشه ای به همراه ریشه به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۰ میلی‌لیتر محلول ۱٪ پپتون سترون منتقل گردید. مخلوط به مدت نیم ساعت روی دستگاه همزن با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از آن یک دقیقه، سوسپانسیون بحالت سکون گذاشته شده و از محلول رویی یک میلی‌لیتر به لولهٔ آزمایش حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول ۱٪ پپتون سترون اضافه گردید تا رقت 10^{-2} تهیه گردد. پس ازبهم زدن کامل سوسپانسیون اخیر برای تهیهٔ رقت 10^{-3} یک میلی‌لیتر از آن به لولهٔ حاوی ۹ میلی‌لیتر محلول پپتون ۱ درصد سترون اضافه شد و به همین ترتیب تا رقت 10^{-6} تهیه گردید. سپس محیط جامد S_1 با یک دهم میلی‌لیتر از هریک از رقت‌های تهیه شده و با در نظر گرفتن ۳ تکرار برای هر رقت کشت گردید. نحوهٔ کشت به روش پخش سطحی بود که با استفاده از یک میلهٔ شیشه‌ای سترون ، سوسپانسیون مربوط به هر رقت بطور یکنواخت روی سطح محیط توزیع گردید. ظروف کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای 25^0 C در داخل انکوباتور قرار داده شدند. پس از این مدت اقدام به شمارش پرگنه هایی گردید که در برابر اشعهٔ UVخاصیت فلورسنس نشان می‌دادند. برای ظروف کشت که تعداد پرگنه‌های ظاهر شده بر سطح آنها در حد مناسب بودند، متوسط تعداد آنها برای ۳ تکرار محاسبه شد وبا منظور داشتن درجهٔ رقت ، تعداد باکتری برای یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک فراریشه ای تعیین گردید. با برداشت نمونه از رقت10^{-1}و تعیین مقدار خاک خشک موجود در هر میلی‌لیتر، تعداد باکتری های مورد نظر برای یک گرم خاک خشک محاسبه شدند.

خالص‌سازی جدایه‌ها

برای خالص‌سازی جدایه‌ها از پدیدهٔ فلورسنس استفاده شد. بدین منظور با عبور دادن لامپ دستی UV در زیر ظروف پتری کشت شده ، پرگنه‌هایی که دارای پرتوافشانی واضح‌تری بودند انتخاب شدند. از هر پرگنه یک حلقه برداشت شد و بر روی محیط S_1 با روش کشت مخطط[1] توزیع گردید و با بازکشت پرگنه‌های ظاهر شده بر روی این محیط، کشت خالص باکتری‌های مورد نظر آماده شدند. جدایه‌های خالص شده در لوله‌های آزمایش درپیچ‌دار، بر روی سطح شیب‌دار آگار مغذی و در دمای 4^0C در یخچال نگهداری شدند.

آزمایش‌های میکروسکوپی ، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی

با استفاده از پرگنهٔ تازهٔ جدایه‌ها و تهیهٔ سوسپانسیون آن بر روی لام سترون، تحرک باکتری بوسیلهٔ میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت.همچنین با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم شکل ظاهری و ابعاد باکتری بررسی شد. برای شناسایی جدایه‌ها ی خالص سازی شده تا سطح گونه، آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز ، تحرک، ذوب ژلاتین ،مصرف سیترات، احیای نیترات، هیدرولیز آرژینین، اکسایش یا تخمیر گلوکز (O/F) و آزمون رشد باکتری در دمای 42^0C طبق روش‌های استاندارد انجام گرفتند(۲، ۴).

بررســی اثــر آنتاگونیستی سویه‌های پسودوموناس فلورسنس نسبت به قارچ*G.g.tritici*

قارچ عامل بیماری پاخورهٔ گندم از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تهران تهیه شد. این قارچ تولید ریسه های رونده می‌کند که بطور سطحی بر روی ریشه‌ها رشد می‌کنند. برای مطالعهٔ توانایی سویه‌های باکتری در محدود کردن رشد قارچهای بیماریزا روش‌های مختلف آزمایشگاهی وجود دارد که از اصول یکسانی برخوردار هستند. در این روش‌ها معمولا قارچ و باکتری بطور مجزا در یک ظرف پتری که حاوی محیط غذایی باکتری یا قارچ می‌باشد کشت شده ودر دمای مناسب رشد قرار داده می‌شوند. پس از چند روز چنانچه باکتری توانایی کنترل قارچ را داشته باشد، یک هالهٔ روشن در اطراف مسیر کشت آن پدید می‌آید که در این هاله بدلیل ترشح مواد ضد قارچی ، این قارچها قادر به رشد نیستند. هر قدر قطر این هاله بیشتر ویا قطر پرگنهٔ قارچ درحضور باکتری نسبت به قطر آن در محیط بدون باکتری کمترباشد ، نشانهٔ این است که باکتری توانایی بیشتری در محدود کردن رشد قارچ دارد. بایستی توجه داشت که قطر هاله بازدارندگی در محیط‌های کشت مختلف متفاوت است و بایستی حداقل از دو نوع محیط کشت استفاده شود. در این تحقیق از محیط‌های PDA وNA استفاده شد. در مرحلهٔاول در هر دو محیط به منظور غربال کردن[2] جدایه ها، درچهارگوشهٔ ظرف پتری چهار جدایهٔ باکتری کشت شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای25^0C ،

1 . Streak Plate

2 . screening

حلقه‌ای از قارچ در وسط ظرف پتری قرار داده شد. پس از یک هفته انکوباسیون سویه‌هایی که توان بازدارندگی از خود نشان داده بودند انتخاب شدند و به روش کشت متقابل[3] اقدام به بررسی اثر آنتاگونیستی هر یک از سویه‌ها نسبت به قارچ گردید. در این روش در هر دومحیط PDA وNA ، باکتری در وسط ظرف پتری مایه زنی گردید و پس از ۲۴ ساعت ، قارچ در طرفین سویهٔ باکتری قرار داده شد و انکوباسیون در دمای ^0C ۲۵ انجام گرفت. در این روش هم بعلت تولید مواد ضد قارچی توسط باکتری،قارچ نتوانست تمام سطح ظرف پتری را بپوشاند و فاصلهٔ مشخصی مابین قارچ و باکتری ایجاد گردید. با اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ در ظرف شاهد (بدون باکتری) و قطر آن روی محیط دارای باکتری، درصد بازدارندگی از فرمول زیر محاسبه شد :

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{(قطر کلنی قارچ در ظرف پتری حاوی باکتری)} - \text{(قطر کلنی قارچ در ظرف پتری‌شاهد)}}{\text{((قطر کلنی قارچ در ظرف پتری شاهد)}} \times ۱۰۰$$

تولید آنتی‌بیوتیک

برای اثبات تولید آنتی‌بیوتیک توسط باکتری از روش کراوس و لوپر استفاده شد(۹) . در این روش باکتریهایی که توانسته بودند اثر بازدارندگی از خود نشان دهند به مدت ۴ روز روی محیط آگار مغذی حاوی ۲ درصد گلوکز کشت شدند. سپس پرگنه‌های رشد یافته از سطح محیط جمع‌آوری شدند. برای اطمینان از عدم رشد بقایای کلنی از روش قرار دادن پنبهٔ آغشته به فرمالین ۴۰٪ درون ظرف پتری وارونه به مدت نیم ساعت استفاده شد. عدم رشد قارچ روی این محیط و مقایسه آن با محیط شاهد که باکتری در آن کشت نشده بود، نشانهٔ وجود آنتی‌بیوتیک درون محیط غذایی تلقی گردید.

نتایج و بحث

نتایج جدول ۱ حاکی از این است که همهٔ خاکهای مورد مطالعه دارای تعداد قابل توجهی از پسودوموناس‌های فلورسنت هستند و این باکتری‌ها را می‌توان در اکثر موارد از باکتری‌های غالب در فاریشه گندم محسوب نمود. گرچه مطالعهٔ جمعیت این باکتری‌ها در فاریشه ارقام مختلف گندم و همچنین تغییرات جمعیت آنها در طول فصل رشد که خود می‌تواند موضوع تحقیقی مفصل باشد ، جزء اهداف این بررسی نبود ولی در عین حال نتایج بدست آمده از فاریشه ۳ رقم گندم کشت شده در ایستگاه تحقیقات کشاورزی ورامین ، تفاوت‌هایی را بین ۳ رقم گندم کویر، قدس و مهدوی نشان می‌دهد. همینطور حداقل تعداد باکتری مربوط به نمونهٔ خاک برداشت شده در آذرماه است که احتمالا می‌تواند به کاهش تعداد باکتری در دمای پائین نسبت داده شود(جدول۱) .لوپر وهمکاران گزارش داده‌اند که در شرایط آزمایشگاهی، سرعت رشد این باکتریها در دمای۲۴ بیش از ۱۸ و۱۲ درجهٔ سانتیگراد است (۱۲) .

جدول ۱- جمعیت تقریبی پسودوموناس‌های فلورسنت در فاریشه گندم در خاکهای مختلف

شمارهٔ خاک	محل نمونه برداری	وضعیت زراعی زمین	cfuدرگرم خاک فاریشه‌ای $\times ۱۰^۴$
۱	کرج- مشکین‌آباد ۱	مزرعهٔ‌گندم‌زمستانه–اردیبهشت ماه	۵/۵
۲	کرج- مشکین‌آباد ۲	مزرعهٔ‌گندم‌زمستانه–اردیبهشت ماه	۸/۰۳
۳	کرج- مشکین‌آباد ۳	مزرعهٔ‌گندم‌زمستانه–اردیبهشت ماه	۱۱/۳
۴	کرج – مزرعه دانشکده	مزرعه گندم – آذرماه	۰/۵
۵	شهریار – زرنان	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۷۵
۶	شهریار – سعید آباد	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۲۱
۷	شهریار- فرخ‌آباد	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۰۴
۸	شهریار- کردزار	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۵/۷
۹	شهریار- هفت‌چوب	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۲۲
۱۰	شهریار– حصارک‌غفاری	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۲۷
۱۱	شهریار – حصارتماس	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۳۷
۱۲	شهریار- مویز	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۳۷
۱۳	شهریار- ارسطو	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۲۶
۱۴	ورامین – رقم مهدوی	مزرعهٔ گندم – اردیبهشت ماه	۶/۹
۱۵	ورامین – رقم کویر	مزرعهٔ گندم – اردیبهشت ماه	۷/۵
۱۶	ورامین – رقم قدس	مزرعهٔ گندم – اردیبهشت ماه	۸/۳
۱۷	گرمسار	مزرعهٔ گندم – اردیبهشت ماه	۷/۱
۱۸	پل کردان ۱	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۷/۹
۱۹	پل کردان۲	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۵
۲۰	حسن‌آباد(دشت‌قزوین)	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۲/۸
۲۱	شریف‌آباد۱(دشت قزوین)	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۲۰/۶
۲۲	شریف‌آباد۲(دشت قزوین)	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۴
۲۳	خاکقلی(دشت قزوین)	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۱
۲۴	ابتدای استان قزوین	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۷/۲
۲۵	دشت قزوین۱	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۳
۲۶	کمال آباد	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۶/۶
۲۷	سهیلیه	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۹/۴
۲۸	بعد از هشتگرد	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۷/۸
۲۹	آبیک	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱۴/۸
۳۰	اول هشتگرد	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۶/۸
۳۱	دشت قزوین۲	مزرعهٔ گندم – خرداد ماه	۱/۱

3 . double culture

جمعیت پسودوموناس‌های فلورسنت در فراریشه گندم درخاکهای مناطق مختلف استان تهران در جدول ۲ آمده است که میانگین جمعیت قابل توجهی را در تمام سطح استان نشان می‌دهد.

جدول ۲- جمعیت پسودوموناس‌های فلورسنت درخاکهای مناطق مورد بررسی

منطقه	ماکزیمم	مینیمم	میانگین
کرج	$۱/۱۳\times۱۰^{۵}$	$۵/۵\times۱۰^{۴}$	$۸/۲\times۱۰^{۴}$
شهریار	$۱/۲۶\times۱۰^{۶}$	$۵/۷\times۱۰^{۴}$	$۶/۵\times۱۰^{۵}$
دشت قزوین	$۲/۰۶\times۱۰^{۵}$	$۱/۱\times۱۰^{۴}$	$۹/۳۴\times۱۰^{۴}$
ورامین	$۸/۳\times۱۰^{۴}$	$۶/۹\times۱۰^{۴}$	$۷/۶\times۱۰^{۴}$
کل نمونه های برداشت شده دراردیبهشت ـ خرداد	$۱/۲۶\times۱۰^{۶}$	$۱/۱\times۱۰^{۴}$	$۲/۲\times۱۰^{۵}$

- نتایج بدست آمده با نتایج دیگر محققین از جمله ولاسک و همکاران (۱۹۹۲) مطابقت می‌کند که در فراریشه برنج جمعیت این باکتریها را $۴/۷\times۱۰^{۴}$ و $۲/۴\times۱۰^{۵}$ (cfu/g) برحسب محل نمونه‌برداری ودرفراریشه موز $۳/۶\times۱۰^{۴}$ (cfu/g) گزارش نمودند. این محققین عنوان کردند که پسودوموناس‌های فلورسنت از باکتریهای غالب فراریشه برنج و موز می‌باشند (۱۶). لامبرت و همکاران (۱۹۸۷) نیز جمعیت پسودوموناس‌های فلورسنت در فراریشه ذرت را $۱۰^{۸}$ (cfu/g) گزارش نمودند (۱۱). همچنین کلیبرگر و همکاران (۱۹۸۳) نیز عنوان کردند که۵۲٪ از جمعیت باکتریهای فراریشه گندم و جو را پسودوموناس‌های فلورسنت تشکیل می‌دهند (۸).

گرچه تعداد پرگنه‌های مشاهده شده در هر رقت در محیط سادهٔ KB بیشتر از محیط S_1 بود اما تعدادی از پرگنه‌ها در برابر اشعه UV خاصیت فلورسنس از خود نشان نمی‌دادند و همچنین تعدادی از پرگنه‌های ظاهر شده بر روی محیط KB گرم منفی تشخیص داده نشدند. بعلاوه ظروف حاوی محیط KB به سهولت به انواع قارچها آلوده می‌شدند. با توجه به نتایج بدست آمده و با توجه به گزارشات محققین قبلی (۱ ، ۵) محیط S_1 برای جداسازی و شمارش پسودوموناس‌های فلورسنت انتخاب گردید. جدایه‌های خالص شده از نظر ویژگیهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند که خلاصه‌ای از نتایج آزمون‌های انجام شده در جدول۳ ارائه شده است.

براساس آزمون‌های انجام شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی (۱۰) و اطلاعات موجود، از بین ۱۰۰ جدایهٔ مورد بررسی پس از حذف انواع مشکوک تعداد ۴۰ جدایه که از نظر ویژگیهای مرفولوژیک ، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بیشترین قرابت را با گونهٔ پسودوموناس فلورسنس داشتند بعنوان ۴۰ سویهٔ *Pseudomonas fluorescens* انتخاب شدند. در انتخاب این تعداد، تنوع منشأ آنها (منطقه و مزرعهٔ نمونه‌برداری) نیز مورد نظر قرار گرفت تا درحد امکان ازسویه‌های متفاوتی از گونهٔ فلورسنس استفاده شود. در بین ۴۰ سویه انتخابی ۲۶ سویه توانستند که بیش از ۷۰٪ اثر بازدارندگی از خود نشان دهند و بعنوان سویه‌های آنتاگونیست انتخاب شدند. درصد بازدارندگی ۵ سویه حدود ۷۰-۵۰٪ و در مورد بقیهٔ سویه‌ها کمتر از ۵۰٪ بود. در مورد سویه‌هایی با توان بازدارندگی ضعیف که رشد پرگنه قارچ در حضور آنها تقریبا برابر با شاهد بود هنوز نمی‌توان با قاطعیت دربارهٔ تولید آنتی‌بیوتیک توسط آنها اظهار نظر نمود و لازم است که آزمایش‌های تکمیلی با استفاده از سایر محیط‌های غذایی بر روی آنها انجام شوند.

جدول ۳- برخی از خصوصیات مرفولوژیک ، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویه‌های انتخابی

آزمون	کاتالاز	اکسیداز	تحرک	خاصیت فلورسنس	ذوب ژلاتین	مصرف سیترات	احیای نیترات	O/F
پاسخ جدایه‌های انتخاب شده	+	+	+	+	+	+	+	O_x

ادامه جدول ۳- برخی از خصوصیات مرفولوژیک ، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویه‌های انتخابی

آزمون	واکنش گرم	هیدرولیز آرژینین	رشد در دمای $۴۲C^{o}$	رشد در محیط مایع	تولید رنگدانه	شکل سلول	اسپور
پاسخ جدایه‌های انتخاب شده	-	+	-	+	+	میله‌ای کوتاه	-

کراوس و لوپر در بررسیهای خود دربارهٔ مکانیسم بازدارندگی سویهٔ Pf-5 گونهٔ پسودوموناس فلورسنس اعلام نمودند که این سویه روی محیط آگارمغذی تولیدآنتی بیوتیک نمی‌کند

درحالیکه روی محیط آگار ۵۲۳ ، آنتی‌بیوتیک از نوع پیرول نیترین و پایولوتئورین تولیدمی‌کند(۹).

به طور کلی تحقیق حاضر نشان می‌دهد که خاکهای زراعی زیر کشت گندم در استان تهران و دشت قزوین دارای باکتریهایی هستند که احتمالا تا حدی می‌توانند در بازدارندگی و کاهش طبیعی بیماری پاخورهٔ گندم مؤثر باشند، لذا پیشنهاد می‌شود که با انجام آزمونهای گلخانه‌ای و مزرعه‌ای، سویه‌های مؤثرتر از نظر توان کنترل این بیماری انتخاب وقبل از کاربرد در مقیاس‌وسیع،اثرات سوء احتمالی آنها بر روی میکروارگانیسم‌های مفید خاک مانند قارچهای میکوریزی بررسی شود.

سپاسگزاری

این‌پژوهش‌مستخرج‌از طرح بررسی‌جمعیت‌پسودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم کشت شده درخاکهای زراعی استان تهران وتعیین پتانسیل آنها برای افزایش رشد گیاه، به شمارهٔ ۷۱۴/۱/۳۰۳ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده و موجب کمال سپاسگزاری است. همچنین ازآقای مهندس صداقت فردانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی تهران که قارچ عامل پاخورهٔ گندم را در اختیار ما گذاشتند صمیمانه قدردانی می‌شود.

مراجع مورد استفاده **REFERENCES**

۱. احمدزاده، م.، شریفی تهرانی، ع . و ح. رحیمیان . ۱۳۷۶. جداسازی باکتریهای آنتاگونیست از ناحیهٔ ریزوسفر نخود ایرانی و بررسی مکانیسم بازدارندگی علیه قارچ *Pythium ultimum* عامل پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه. مجلهٔ علوم کشاورزی ایران. ۲۸ (۳) :۸۵ـ ۸۱ .

۲. حسن‌زاده، ن . ۱۳۷۷. اصول و روش‌های باکتری‌شناسی گیاهی، مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی

۳. علوی ، ا. و ع. آهون‌منش . ۱۳۷۶ . کنترل بیولوژیکی عوامل بیماریزای گیاهی خاکزاد . جلد اول ، ترجمه ، نشر آموزش کشاورزی، کرج.

۴. وزیری، ب.، ۱۳۶۳. اصول آزمایشهای بیوشیمیایی و میکروب‌شناسی تشخیصی، مؤسسه انتشارات امیرکبیر، تهران.

5. Gould, W.D., C.Hagedorn, T.R.Bardinelli and R.M.Zablotowicz. 1985. New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. Appl. Environ . Microbiol. 49: 28-32.
6. Hagedorn,C., W.D.Gould and T.R.Bardinelli. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression seedling disease pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 55: 2793-2797.
7. Kaiser, W.J., R.M.Hannand, D.M.Weller. 1989. Biological control of seed rot and preemergence damping – off of chickpea with fluorescent Pseudomonads. Soil. Biol. Biochem. 21 : 269-273.
8. Kleeberger, A.,H.Castorph and W.Klingmuller. 1983. The rhizosphere microflora of wheat and barley with special reference to gram – negative bacteria. Arch. Microbiol. 136: 306-311.
9. Kraus, J.and J.E. Loper. 1990. Biocontrol damping – off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 : Mechanistic studies. PP: 172-175, In Keel, C.B.Koller and G.Defago . eds. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second international workshop on Plant Growth Promoting Rhizobacteria. Interlaken, Switzerland.
10. Krieg,N.R.and J.G.Holt ,eds.1994.Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and wilkins, Baltimore, Maryland.
11. Lambert, B., F.Leyns, L.Van Rooyen., F.Gossele., Y.Paponand , and J.Swings. 1987.Rhizobacteria of maize and their antifungal activities. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1866-1871.
12. Loper, J.E., C.Heack and M.N.Schroth. 1985. Population dynamics of soil pseudomonads in the rhizosphere of potato (Solanum tuberosum.L). Appl. Environ. Microbiol. 49:416-422.
13. Parke, J.L., A.E.Joy and E.B.King. 1991. Biological control of pythium damping-off and Aphanomyces root rot of peas by application of *Pseudomonas cepacia* or *P.fluorescens* to seed. Plant Dis. 75 : 987-992.
14. Tarp-casas, A., W.J.Kaiser and D.M.Ingram.1990. Control of Pythium seed rot preemergence damping-off of chickpea in the U.S.Pacific North westand Spain. Plant Dis. 74:563-569.
15. Thomashow, L.S. and D.M. Weller. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis var.tritici*. Journal of Bacteriology. 170: 3499-3508.

16. Vlassak,K., L.Vanholm, L.Dcuateau, J.Vanderleyden and R.Demot. 1992. Isolation and characterization of fluorescent pseudomonads associated with the roots of rice and banana growth in Srilanka. Plant and Soil . 145 : 51-63.
17. Weller, D.M. 1984. Distribution of a take-all supressive strain of *Pseudomonas fluorescens* on seminal roots of winter wheat. Appl. Environ. Microbiol. 48:897-899.
18. Weller, D.M. 1988. Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology. 26:379-407.
19. Weller, D.M and R.J.Cook.1982. Suppression of take–all of wheat by seed treatment with fluorescent pseudomonads. Phytopathology. 73: 463-459.

The Occurrence and Distribution of Fluorescent Pseudomonads in Wheat Fields in Tehran Province along with a Study on their Repressive Effect Against *Gaeumannomyces graminis var. tritici* , Causal Agent of Take-all

A. REYHANY TABAR[1], N. SALEH RASTIN[2], M. MOHAMMADI [3] AND H. A. ALIKHANI[4]

1, 2, 3, 4, Former Graduate Student, Associate Professor, Assistant Professor and Instructor, Faculty of Agriculture, University of Tehran

Accepted March. 5, 2003

SUMMARY

In this study, the occurrence of fluorescent pseudomonads in wheat rhizosphere and the ability of 40 isolates of *Pseudomonas fluorescens* to suppress the *G.g. tritici* were investigated. Wheat plants with rhizospheric soil were collected from different fields in Tehran province, Ghazvin plain and Garmsar. Enumeration of these bacteria were carried out through spread plate method, using selective S_1 medium. A pure culture of each isolate was prepared after several subculturings on the same medium. Bacterial isolates were identified on the basis of morphological, physiological and biochemical tests. The suppressive effect of strains against take-all casual agent were investigated on the NA and PDA media. Based on the results, a high population of fluorescent pseudomonads existed in wheat rhizosphere, ranging from 5×10^3 to 1.26×10^6 cfu g^{-1} soil, in different fields. Most strains were able to limit the growth of *G.g.tritici* on both NA and PDA media under *in vitro* conditions.However, the degree of inhibition was not the same, being observed to be varied from 0 to more than 70% for different strains.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, Rhizosphere, Wheat take-all .