مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۱، ۱۳۹۱ (۱۲-۱)

ارتباط بین تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور در سودوموناد های فلورسنت ریزوسفر گندم با افزایش رشد گیاه

سمیه الوانی[1*]، حمید روحانی [2] و عصمت مهدیخانی مقدم[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد،
(تاریخ دریافت : ۸۹/۱۰/۲۸- تاریخ تصویب: ۹۰/۳/۲۴)

چکیده

غالب باکتری‌های ریزوسفر به خصوص سودوموناد های فلورسنت به وسیله ترشح متابولیت های مختلف مثل سیانید هیدروژن و سیدروفورها باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. جهت بررسی اثر این ترکیبات روی رشد گندم، نسبت به جداسازی و شناسایی سودوموناد‌های فلورسنت ریزوسفر گندم در استان‌های خراسان اقدام گردید. سپس این جدایه ها برای تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور به ترتیب با روش آلسترووم و کاستاندا مطالعه شدند. با توجه به نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی تعداد ۱۶ جدایه از ۱۳۰ جدایه باکتری‌های سودوموناد فلورسنت که مقادیر متفاوتی از سیدروفور و سیانید هیدروژن را تولید نمودند، برای انجام آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند. از این جدایه ها سوسپانسیونی به میزان 10^8 باکتری در میلی لیتر آب مقطر استریل همراه با یک درصد کربوکسی متیل سلولز تهیه شد و بذور گندم رقم فلات به مدت ۳۰ دقیقه در این سوسپانسیون قرار داده شدند. پس از خشک شدن آن‌ها در شرایط استریل، تعداد پنج بذر در گلدان‌های حاوی یک کیلوگرم خاک گلخانه‌ای اتوکلاو شده همراه با یک تیمار شاهد کاشته شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه با ۱۷ تیمار و سه تکرار از هر یک، به اجرا درآمد. یک ماه بعد، بوته‌ها از گلدان‌ها خارج شدند و وزن تر بوته‌ها تعیین گردید. نتایج حاصله نشان داد جدایه هایی که در تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور عملکرد بالایی داشتند، نسبت به شاهد بدون باکتری به طور چشمگیری سبب افزایش وزن بوته‌ها و همچنین ارتفاع بوته و طول ریشه شدند. در مجموع همبستگی مثبتی بین وزن تر بوته‌ها و میزان تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور مشاهده شد. این همبستگی در مورد سیانید هیدروژن و سیدروفور به ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۹۳ تعیین گردید.

واژه‌های کلیدی: افزایش رشد، باکتری‌های محرک رشد، سیانید هیدروژن، سیدروفور، گندم

مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاه[1] به طور مستقیم یا غیر مستقیم سبب افزایش رشد گیاه می‌گردند (Mantelin & Touraine., 2004 ؛ Luna *et al*., 2002). به طور کلی مواد مترشحه ریشه برای جذب باکتری‌های محرک رشد گیاه و افزایش جمعیت آن‌ها و کلونیزاسیون ریشه و ترشح ترکیبات مختلف موثر در افزایش رشد گیاه توسط این باکتری‌ها ضروری است (Montesinos

1. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

* نویسنده مسئول: سمیه الوانی تلفن:۰۹۱۵۳۱۵۸۹۰۲ E-mail :somaye5778@gmail.com

Raaijmakers *et al*., 2001؛*et al*., 2002).توانایی رقابت این میکروارگانیزم ها در ارتباط با توانایی استفاده از ترکیبات تولیدی گیاه است (Ji *et al*., 2006). بررسی‌های انجام شده نشان داده است که اسیدهای ارگانیک از مواد پایه گذار عمل کلونیزاسیون موثر ریزوسفر توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه محسوب می‌گردند (Bloemberg & Lugtenberg., 2001 ؛ Lugtenberg *et al*., 1999). به طور کلی واژه PGPR به گروهی از باکتری‌ها اطلاق می‌شود که خود را با ریشه‌های گیاهان بر اساس ترشحات آن‌ها سازش داده‌اند و به این ترتیب از سایر باکتری‌هایی که نمی‌توانند کلونیزاسیون موثری را بر روی ریشه داشته باشند، جدا می‌گردند (Montesinos *et al*., 2002 ؛ Rumjanek *et al*., 2004).

در ناحیه ریزوسفر این باکتری‌ها تشکیل جمعیت‌هایی از میکروکلنی ها در ترشحات ریشه می‌دهند (Bais *et al*., 2006). تحریک غیر مستقیم رشد گیاه زمانی اتفاق می‌افتد که باکتری اثرات زیان آور یک یا چند بیمارگر گیاهی را خنثی کند و به دو طریق امکان پذیر است. در یک روش باکتری با تولید آنتی بیوتیک (Kaaijmakers & Weller., 2001)، ترشح سیدروفور (Rasolisedghiyani., 2005 ؛ O'Sullivan & O'Gra., 1992)، تولید سیانید هیدروژن (Bagnasco *et al*., 1998)، ترشح آنزیم‌های برون سلولی مانند کیتیناز[1] ، بتا- یک و سه گلوکاناز[2] ، پروتئاز[3] و لیپاز[4] (Nagarajkumar *et al*., 2004) فعالیت عامل بیماری زا را کاهش می‌دهد یا آن را متوقف می‌سازد. در روش دیگر باکتری سبب فعال شدن مکانیسم مقاومت سیستمیک القایی[5] در گیاه می‌گردد (Bakker *et al*., 2003).

در این زمینه می‌توان به سیدروفورها، لیپوپلی ساکاریدها و اسید سالیسیلیک[6] اشاره نمود. تثبیت نیتروژن (Donate-Correa *et al*., 2004)، تولید هورمون‌های گیاهی (Glick., 1995)، افزایش قابلیت در دسترس قرار دادن عناصر معدنی نامحلول مثل فسفر برای گیاه (Rodriguez & Fraga., 1999) و تولید آنزیم Acc-deaminase (Glick *et al*., 1994) نیز از مکانیسم‌های دیگر این باکتری‌ها در تنظیم رشد گیاه می‌باشد. در میان طیف عظیم باکتری‌ها، سودوموناد‌ها به دلیل صفات محرک رشد گیاهی مثل تولید اکسین (Patten & Glick., 2002)، تولید آنزیم Acc-deaminase (Penrose & Glick., 2003)، حل کنندگی فسفات (Rashid *et al*., 2004)، تولید سیدروفور (Meyer., 2000)، سالیسیلیک اسید (Maurhofer *et al*., 1998)، کیتیناز (Ajit *et al*., 2006) و سیانید هیدروژن (Schippers *et al*., 1990) به طور مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند. در میان آن‌ها *Pseudomonas putida* و *P. fluorescens* از گونه‌های غالب موجود در ریزوسفر گیاهان می‌باشند (Hass & Defago., 2005).

با بررسی‌های انجام شده بر روی فراوانی سودوموناد‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم در استان تهران، تعداد سودوموناد‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم $۱/۲۶\times۱۰^{۶}$ - ۵×۱۰^{۳} باکتری در گرم خاک بود (Reyhanitabar., 2000).

همچنین نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای در تحقیق فوق نشان دادند که پاسخ گندم به تلقیح با سویه‌های سودوموناد فلورسنت در بیشتر شاخص‌های رشد از قبیل طول ریشه و ساقه مثبت بود. Lalande *et al* (1989) ضمن جداسازی و شناسایی باکتری‌های ریزوسفر ذرت (اکتوریزوسفر، سطح ریشه[7] و اندوریزوسفر) و بررسی پتانسیل محرک رشد آن‌ها نشان دادند گونه‌های سودوموناس بیشترین جمعیت (۶۳٪) را در ریزوسفر داشتند و بیشتر در سطوح ریشه متمرکز شده بودند. در اندوریزوسفر جمعیت سودوموناس ها کمتر بود (۱۱٪) در حالیکه گونه‌های باسیلوس بالاترین فراوانی را در این منطقه داشتند (۸۸٪). Hassanzadeh (1991) ضمن بررسی تأثیر ۱۰۰ جدایه ریزوباکتر، نشان داد که افزایش رشد گیاه لوبیا چشم بلبلی در شرایط عاری از هر گونه بیمارگر می‌تواند به علت تولید مواد تنظیم کننده رشد و

1. Chitinase
2. ß-1,3 glucanase
3. Protease
4. Lipase
5. Induced Systemic Resistance
6. Salysilic acid (SA)
7. Rhizoplane

یا افزایش جذب برخی مواد معدنی باشد. (1988) Weller نشان داد که آغشته نمودن قطعات بذری سیب زمینی به باکتری‌های *P. putida* و *P. fluorescens* باعث افزایش محصول گردید که این افزایش رشد گیاه به علت جذب مواد معدنی و جلوگیری از رشد میکروارگانیزم های مضر بوده است. به طور کلی می‌توان بیان کرد که به واسطه حضور سیدروفورها، قابلیت استفاده و تحرک آهن در ریزوسفر افزایش یافته و کمپلکس سیدروفور-آهن تشکیل شده، می‌تواند در محلول خاک طی فرآیند جذب به سطح ریشه برسد و آهن از طریق آنزیم احیاکننده کلات آهن III موجود در غشای پلاسمایی (Marschner & Romheld., 1994) و یا از طریق فرآیند تبادل لیگاندی (Yehuda *et al*., 1996) جذب شود.

سیانید هیدروژن یکی از متابولیت ثانویه بسیاری از میکروارگانیسم ها بوده که مستقیماً از پرولین، گلایسین و یا گلیکوزیدهای سیانوژنیک ساخته می‌شود. همگی این مواد در ترشحات ریشه گیاهان دیده شده‌اند (Schippers *et al*., 1987).

نکته قابل توجه اینکه تولید سیانید هیدروژن به وسیله سودومونادهای فلورسنت بستگی به حضور آهن سه ظرفیتی قابل جذب دارد. لذا رقابت برای جذب آهن به وسیله میکروارگانیزم ها روی تولید سیانید مؤثر است (Schippers *et al*., 1987). سیانید هیدروژن ترکیبی است که از یک سو برای قارچها ماده‌ای سمی به شمار می‌رود و از سوی دیگر باکتری‌های تولید کننده سیانید هیدروژن متابولیسم گیاه را تحت تأثیر خود قرار داده و موجب تشکیل ریشه‌های مویین می‌گردند.

امکان دارد به جز تأثیرات ذکر شده، سیانید هیدروژن موجب افزایش مقاومت گیاه میزبان شود. با توجه به مطالب ذکر شده و اهمیت سودومونادهای فلورسنت در افزایش رشد گیاه، در این تحقیق سعی بر آن شد که به بررسی تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن و تأثیر آن در افزایش رشد گیاه گندم پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی سودومونادهای فلورسنت از ریزوسفر گندم

به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناد فلورسنت تعداد ۶۰ نمونه خاک (شامل ریشه‌های گندم) از مناطق مختلف استان‌های خراسان شمالی، رضوی و جنوبی جمع آوری گردید. سپس ۱۰ گرم از هر نمونه خاک ریزوسفری در ۹۰ میلی لیتر آب پپتون۲٪ ریخته شد و سری رقت 10^{-1} تا 10^{-7} از آن تهیه گردید. از رقت‌های مختلف بر روی محیط کشت کینگ بی (King's medium B) پخش شد. سپس تشتک‌های پتری به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت زمان مذکور، اقدام به تک کلون و خالص کردن باکتری‌ها شد. کلنی‌های خالص شده با استفاده از نور UV از نظر خاصیت فلورسنس بررسی گردیدند.

شناسایی سودومونادهای فلورسنت و انتخاب جدایه ها

جهت شناسایی باکتری‌ها، انجام تست‌های شناسایی بر اساس روش شاد و همکاران، صورت گرفت (Schaad *et al*., 2001).

واکنش‌های کاتالاز ، اکسیداز، گرم، تولید آرژنین دهیدرولاز، تولید لوان از سوکروز روی محیط آگار مغذی حاوی سوکروز پنج درصد، احیای نیترات، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کینگ بی، رشد در چهار و ۴۱ درجه سانتی‌گراد، تست قندهای سوربیتول، ال آرابینوز، تری هالوز و گالاکتوز در جدایه های انتخاب شده صورت پذیرفت.

تولید سیدروفور

برای اندازه گیری میزان سیدروفور از روش کمی اسپکتروفتومتری استفاده شد. به این صورت که مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها در محیط مایع سوکسینات که شامل: سه گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم ، شش گرم فسفات هیدروژن دی پتاسیم، چهار گرم سوکسینیک اسید، یک گرم سولفات آمونیوم، ۰/۲ گرم سولفات منیزیوم آبدار می‌باشد، به ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۴۰ میلی لیتر محیط کشت تازه سوکسینات منتقل شد.

این محیط‌ها به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و روی شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریوفیوژ کردن در

g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند. بعد از حذف رسوب باکتری، میزان جذب مایع رویی در طول موج ۴۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. در این آزمایش برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد انجام شد. داده‌های حاصله با استفاده از فرمول A= εBC به مول در لیتر تبدیل شد.

در این فرمول A میزان جذب، ε ضریب جذب مولی، B قطر کوت و C غلظت ماده می‌باشد(Castaneda *et al*., 2005).

تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن ابتدا برای هر جدایه سه پتری حاوی محیط کینگ بی تهیه شد. داخل هر تشتک پتری ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری پخش گردید. سپس کاغذ صافی آغشته به معرف (شامل ۲٪ کربنات سدیم و۵٪ اسید پیکریک) در قسمت درب پتری قرار داده شد و درب پتری با نوار پارا فیلم بسته شد تا از خروج هرگونه متابولیت فرار وگازی از جمله HCN جلوگیری شود. پتری ها به صورت واژگون در دمای ۲۷ سانتی‌گراد در انکوباتور به مدت یک هفته قرار داده شدند. در صورت تولید HCN توسط باکتری رشد یافته روی سطح محیط کشت، تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ اولیه زرد به کرم، قهوه‌ای روشن ، قهوه‌ای تیره تا آجری رنگ دیده می‌شود که نشانه تفاوت در میزان تولید HCN توسط باکتری می‌باشد.

رنگ کرم بیانگر حداقل مقدار تولید HCN و رنگ آجری مبین حداکثر تولید HCN می‌باشد. در بعضی منابع بر اساس توان تولید HCN توسط جدایه باکتری آن‌ها را در چهار سطح مختلف بر اساس رنگ گروه بندی می‌نمایند (Alstrom, 1989).

بررسی قابلیت تحریک (افزایش) رشد گندم توسط جدایه های منتخب

برای آغشته سازی بذور با باکتری، ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت Nutrient broth yeast extract agar (NBYA) کشت داده شدند و ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند.سپس سوسپانسیونی با پنج میلی لیتر آب مقطر استریل از این باکتری‌ها تهیه شد و دو میلی لیتر از آن در محیط کشت King B کشت داده شد. از محیط جدید، سوسپانسون دیگری با کربوکسی متیل سلولز ۰/۵ درصد تهیه شد. این سوسپانسیون دارای 10^8 CFU باکتری می‌باشد. به منظور چسبندگی باکتری‌ها به بذور، آن‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند. سپس تعداد هفت عدد بذر در هر گلدان بین دو لایه ماسه قرار داده شدند. گلدان‌ها به مدت چهار هفته در شرایط گلخانه در دمای ۲۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۷ تیمار در سه تکرار انجام گردید. پس از گذشت مدت مذکور بوته‌ها از گلدان‌ها خارج و پس از حذف خاک اطراف ریشه‌ها و خشک شدن رطوبت سطحی آن‌ها ارتفاع بوته و طول ریشه اندازه گیری و وزن گیاه سنجیده و در مقایسه با شاهد قرار داده شد (Ownley *et al*., 2003).

تجزیه و تحلیل آماری

برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون تحلیل واریانس استفاده شد، ضریب همبستگی پیرسون [1] برای مقایسه متغیرهای مربوط به تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن با تحریک رشد در گیاه تعیین شد. بدین منظور از نرم افزار MSTATC و SPSS استفاده شد.

نتایج

از میان کل جدایه های بدست آمده از ریزوسفر گندم، ۱۳۰ جدایه سودوموناد فلورسنت بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مرفولوژیکی شناسایی شدند. نتایج شناسایی تعداد ۱۶ جدایه منتخب در جدول ۱ آمده است. از این میان *Pseudomonas fluorescens* biovar I بیشترین فراوانی (۶۲٪) را به خود اختصاص داد و *P. fluorescens* biovar III و *P.aeruginosa* هر کدام با فراوانی ۱۲٪ و *P. fluorescens* biovar V و *P. putida* هر کدام با فراوانی۶٪ در درجات بعد قرار گرفتند.

این جدایه ها برای انجام آزمون‌های گلخانه‌ای بر اساس داشتن دامنه متفاوت در تولید سیانید هیدروژن و

1. Pearson

سیدروفور انتخاب شدند. این جدایه های منتخب دارای میزان‌هایی متفاوتی از تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن (درجه بندی ۴-۰) بودند (جدول ۲).

جدول۱- واکنش‌های بیوشیمیایی سودوموناد های فلورسنت

۱	رنگدانه فلورسنت	واکنش گرم	کاتالاز	اکسیداز	احیای نیترات	ذوب ژلاتین	تولید لوان	آرژنین دهیدرولاز	رشد در ۴ درجه	رشد در ۴۱ درجه	رشد روی ال آرابیتوز	رشد روی سوربیتول	رشد روی تری هالوز	رشد روی دی گالاکتوز
Um *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 2 *P.aeruginosa*	+	−	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	−
Um 3 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 4 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 5 *P.aeruginosa*	+	−	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−
Um 6 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 7 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 8 *P.fluorescens* bv.III	+	−	+	+	+	+	−	+	+	−	م	م	م	م
Um 9 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 10 *P.putida* bv.B	+	−	+	+	−	−	−	+	+	−	+	م	−	م
Um 11 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+

ادامه جدول ۱- واکنش‌های بیوشیمیایی سودوموناد های فلورسنت

Um 12 *P.fluorescens* Bv.III	+	−	+	+	+	+	−	+	+	−	م	م	م	م
Um 13 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 14 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Um 15 *P.fluorescens* bv.V	+	−	+	+	−	−	−	+	+	−	+	م	م	م
Um 16 *P.fluorescens* bv.I	+	−	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+

+: مثبت، −: منفی، م: متغیر

جدول۲- تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن در جدایه های باکتری سودوموناد فلورسنت بدست آمده از ریزوسفر (فراریشه) گندم در استان‌های خراسان

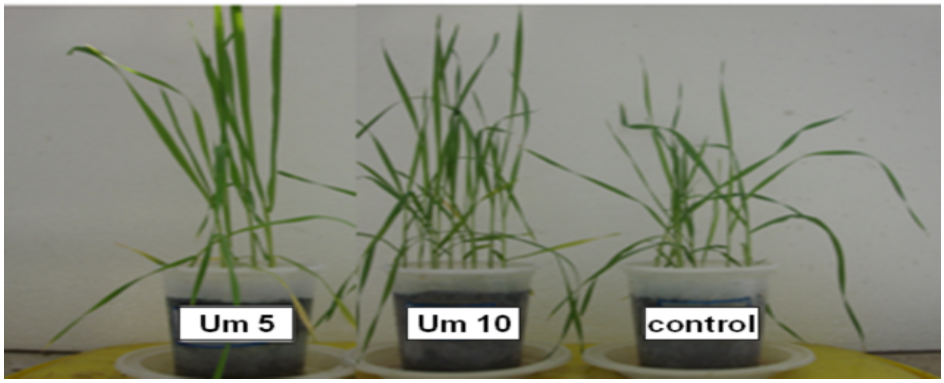
کد جدایه باکتری	میزان تولید سیدروفور (میکرومول در میلی لیتر)*	تولید سیانید هیدروژن**
Um 1	۲/۵۶i	۰
Um 2	۲۵/۵e	۱
Um 3	۹۵/۲۳a	۴
Um 4	۲۶/۸۶e	۱
Um 5	۳۴/۷۳d	۲
Um 6	۵/۴ghi	۰
Um 7	۶/۴۶gh	۰
Um 8	۷/۳۸g	۱
Um 9	۷۲/۳۶c	۳
Um 10	۲۵/ ۶e	۱
Um 11	۸۳/۴۳b	۴
Um 12	۳/۵۶hi	۰
Um 13	۱۵/۳۳f	۱
Um 14	۵/۳۳ghi	۰
Um 15	۱۵f	۰
Um 16	۶/۴۸gh	۰

* میانگین‌هایی که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.05$ با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

** میزان تولید سیانید هیدروژن بر اساس درجه بندی ۰ تا ۴ (۰= عدم تغییر رنگ کاغذ صافی، ۱= تغییر رنگ کاغذ صافی به کرم رنگ، ۲= تغییر رنگ کاغذ صافی به قهوه‌ای روشن، ۳= تغییر رنگ کاغذ صافی به قهوه‌ای تیره و ۴= تغییر رنگ کاغذ صافی به آجری). اعداد مربوط به میزان تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن میانگین سه تکرار می‌باشند.

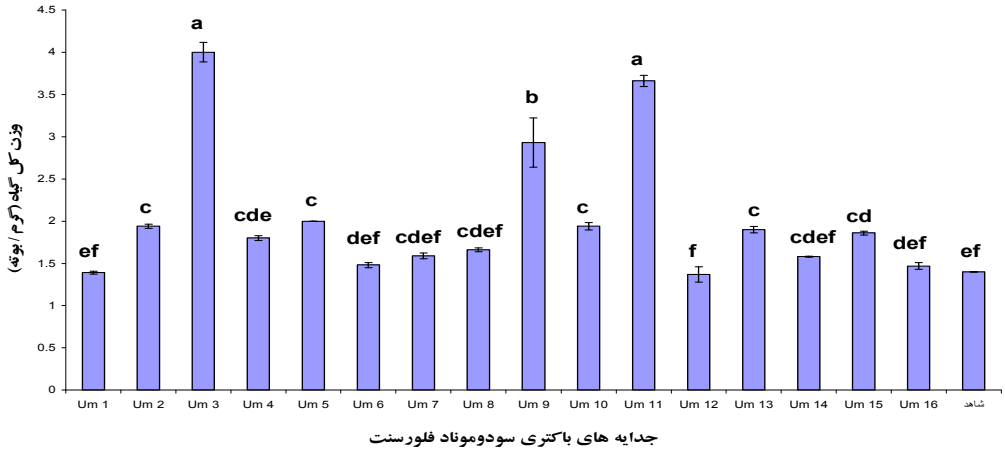
نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

بر اساس یافته‌های حاصل از آزمون گلخانه‌ای، گیاهان حاصل از بذور تیمار شده توسط جدایه های باکتری دارای رشد بیشتری نسبت به گیاه شاهد (بدون تلقیح با باکتری) داشتند (شکل ۱).



شکل ۱- گندم تیمار نشده با باکتری (شاهد) در سمت راست و گیاهان تیمار شده توسط جدایه های Um 5 و Um 10 در سمت چپ تصویر

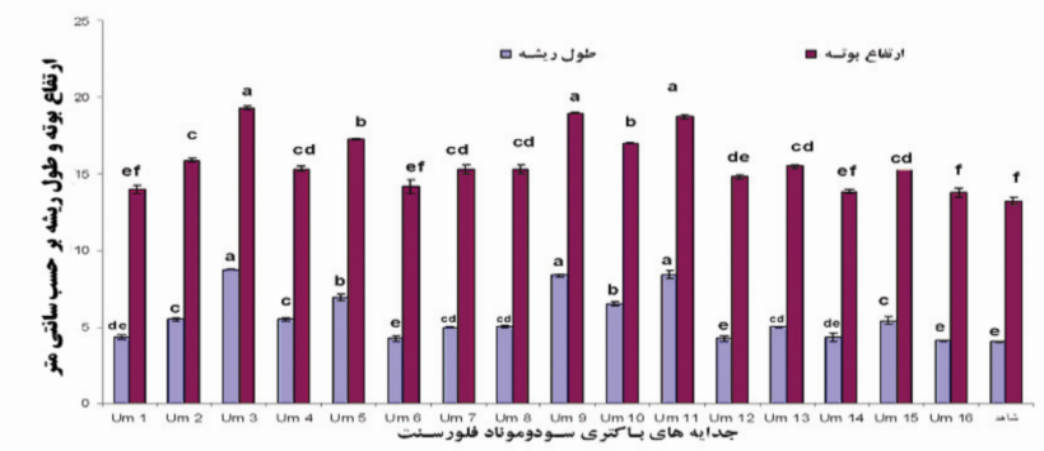
نتایج حاصل از توزین گیاهان نشان دهنده افزایش وزن تر در گیاهان تلقیح شده توسط بیشتر جدایه های باکتری بود. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار MSTATC نشان دهنده اختلاف معنی دار بین وزن گیاهان حاصل از بذور تلقیح شده توسط جدایه های باکتریایی با گیاه شاهد بود. به طوری که گیـــاهان تلقیح شده با جدایه های Um 3 ، Um 9 و Um 11 بیشترین اختلاف معنی دار را با شاهد نشان دادند (نمودار ۱). این جدایه ها همان طور که در جدول دو نشان داده است بیشترین میزان سیدروفر را داشته و از نظر تولید سیانید هیدروژن نیز در درجه بندی بالایی قرار گرفته‌اند.



نمودار ۱- وزن ترگیاه گندم در اثر تلقیح با باکتری در مقایسه با شاهد بدون باکتری در گلخانه
میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نمی باشند، بر اساس آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.05$ با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

بررسی‌های مربوط به اندازه گیری طول ریشه و ساقه در گیاهان تیمار شده توسط جدایه های باکتری نیز نشان داد که اختلاف معنی داری در برخی جدایه ها در طول ریشه و ارتفاع بوته گندم با شاهد بدون تلقیح باکتری وجود دارد. در اینجا نیز جدایه های Um 3 ، Um 9 و Um 11 بیشترین اختلاف معنی دار را با شاهد

نشان دادند و در گروه a قرار گرفتند. سپس جدایه های Um 5 و Um 10 بیشترین اختلاف را داشتند و در گروه بندی در گروه b قرار گرفتند (نمودار ۲). نتایج بررسی فوق با نتایج کارهای Iswandi *et al* (1987)، Buysens *et al* (1996) و Hofte *et al* (1991) مطابقت دارد. این پژوهشگران با بررسی‌های خود افزایش رشد گیاهان خانواده غلات و سبزیجات را با استفاده از سویه‌های باکتری سودوموناس نشان دادند و به نقش مهم سیدروفور در جذب آهن در گیاه و تأثیر مثبت بر روی رشد گیاه پی بردند.



نمودار ۲- طول ریشه و ارتفاع بوته در گیاهان تلقیح شده با باکتری در مقایسه با شاهد میانگین‌های ها که دارای حروف مشترک نمی باشند، بر اساس آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

بررسی همبستگی‌ها

در جدول ۳ ضرایب همبستگی بین تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن با افزایش رشد گیاه دیده می‌شود. ضریب همبستگی پیرسون برای مقایسه متغیرهای مربوط به تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن با تحریک رشد در گیاه تعیین شد. تجزیه واریانس اعداد بدست آمده با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SPSS نشان داد همبستگی بالایی بین تولید این متابولیت ها با افزایش رشد گیاه وجود دارد.

جدول ۳- بررسی همبستگی بین تولید سیانید هیدروژن و سیدروفور با افزایش رشد گیاه گندم در گلخانه

پمتغیرها	ضریب همبستگی
تولید سیدروفور و افزایش وزن گیاه	۰/۹۶۹۰
تولید سیانید هیدروژن و افزایش وزن گیاه	۰/۸۴۹۳
تولید سیدروفور و افزایش طول ریشه	۰/۹۵۲۹
تولید سیانید هیدروژن و افزایش طول ریشه	۰/۹۴۳۳
تولید سیدروفور و افزایش طول ساقه	۰/۹۱۹۹
تولید سیانید هیدروژن و افزایش طول ساقه	۰/۹۱۵۱

بحث

سودوموناد ها به ویژه گونه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* با استقرار در مکان‌های مختلف بر روی ریشه و کلونیزاسیون موثر گیاهان از راه‌های مختلفی رشد آن‌ها را تحریک می‌نمایند. مطالعه بیشتر این گونه‌ها از طریق تولید مواد محرک رشد گیاهی، دورنمای روشنی را در افزایش رشد گیاهان به ویژه غلات نوید می‌دهد. افزایش عملکرد در غلات با تلقیح بذر و خاک با سویه‌های فلورسنت سودوموناد توسط محققین زیادی گزارش شده است (Germida & Walley., 1996 ؛ Hofte *et al*., 1991؛ Khaliq *et al*., 1996). بررسی‌های انجام شده توسط سویه‌های مختلف باکتری *Bradyrhizobium* spp. بر روی گیاه لوبیا نشان دهنده افزایش خصوصیات کیفی و کمی محصول بوده است (Hungria & Bohrer., 2000). یافته‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان دهنده نقش موثر سیدروفورها و سیانید هیدروژن به عنوان متابولیت های تولید شده توسط سودوموناد های فلورسنت در افزایش رشد گیاه گندم می‌باشد. همان طور که مشاهده شد بررسی ضریب همبستگی‌ها نشان دهنده همبستگی بالا در تولید این متابولیت ها و تأثیر آن‌ها در تحریک رشدی گیاه گندم می‌باشد. جدایه Um 3، Um 9 و Um 11 بیشترین تاثیر را به عنوان تحریک کنندگی رشدی از خود نشان دادند. جدایه های Um 5 و Um 10 نیز در درجه پایین‌تر بعد از سه جدایه مذکور جای گرفتند. نتایج حاصل از بررسی تولید سیدروفور در این جدایه ها نشان دهنده بیشترین میزان تولید سیدروفور در آن‌ها می‌باشد که تولید سیدروفور در آن‌ها ۹۵/۲۳، ۷۲/۳۶، ۸۳/۴۳، ۳۴/۷۳ و ۲۵/۶ برای جدایه های Um 3 ، Um 9 ، Um11 ، Um 5 و Um10 بوده است. این جدایه ها در درجه بندی مربوط به تولید سیانید هیدروژن نیز در درجات ۴ ، ۳، ۴، ۲و۱ به ترتیب برای جدایه های Um 3، Um 9 ، Um 11، Um 5 و Um 10 قرار گرفتند. همان طور که مشاهده می‌گردد جدایه های مذکور با بالاترین میزان تولید سیانیدهیدروژن و سیدروفور سبب بیشترین میزان در افزایش وزن گیاه، طول ریشه و اندازه بوته‌ها شده‌اند. ضرایب حاصل از همبستگی‌ها نشان دهنده تأثیر بالای این دو متابولیت در تحریک کنندگی رشد گیاه گندم دارد. Frietas & Germida (1990) در تحقیقی افزایش عملکرد دانه گندم بر اثر تلقیح با سویه‌هائی از سودوموناس را گزارش کردند. در تحقیق دیگری که توسط Walley & Germida (1997) انجام پذیرفت استفاده از باکتری‌های سودوموناد به طور معنی داری شاخص برداشت گندم را افزایش داد. دانش استفاده از باکتری‌های محرک رشد (PGPR) افق‌های نوینی را در جهت افزایش رشد و عملکرد گیاه و کنترل عوامل بیماری زا نوید می‌دهد. در این میان انتخاب سویه‌های برتر و کارا تعیین کننده است. در حال حاضر سویه‌های موثری از سودوموناد های فلورسنت شناسایی و از آن‌ها به منظور اهداف فوق استفاده می‌شود. Iswandi *et al* (1987) باکتری *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 را از ریزوسفر جو جداسازی کردند. این سویه در شرایط کمبود آهن سه نوع سیدروفور بنام‌های اسیدسالسیلیک، پیوکلین و پیووردین تولید نموده و باعث افزایش رشد گیاهانی از خانواده غلات و سبزیجات شده است. سویه MPFM1 موتانت سیدروفور منفی (sid^-) باکتری 7NSK2 است که از آن به عنوان شاهد منفی در این تحقیق استفاده شد و نتایج نشان دهنده عدم تأثیر موتانت مورد نظر بر رشد سبزیجات و غلات بود (Hofte *et al*., 1991 ؛ Buysens *et al*., 1996). یک نمونه دیگر از PGPR ها سویه *Pseudomonas* sp GRP3 است. این سویه‌ها از ریزوسفر سویا جداسازی شده که توانایی بالایی در تولید سیدروفور داشته و از پتانسیل خوبی برای افزایش رشد و کمک به جذب آهن توسط گیاه برخوردار است (Sharma *et al*., 2003). نتایج پژوهش حاضر با کارهای پژوهشی انجام شده فوق مطابقت داشته است. استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه در تحقیقات زیادی و بر روی محصولات مهم به منظور تأثیرات رشدی آن‌ها صورت پذیرفته است. از جمله می‌توان به استفاده از باکتری *Azospirillum braziliens* بر روی سویا اشاره نمود که سبب افزایش ۶۳ درصدی وزن خشک ریشه سویا گردیده است. این در حالی بود که وزن ویژه ریشه را بیش از شش برابر و طول ریشه را بیش از ۱۰ برابر افزایش داد (Molla *et al*., 2001). مجموع نتایج نشان دهنده توانایی بالای سودوموناس

های فلورسنت بومی ایران به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاهی می‌باشد. امید است این سویه‌های مفید بیشتر مورد بررسی قرار گیرند و قابلیت آن‌ها مورد تجزیه و تحلیل پژوهشگران قرار گیرد.

REFERENCES

1. Ajit, N. S., Verma, R., and Shanumugan, V. (2006). Extracellular chitinase of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianti* causing carnation wilt. *Current Microbiology* 52, 310-316.
2. Alstrom, S. (1989). Factors associated with detrimental effects of rhizobacteria on plant growth. *Plant and Soil* 102, 3-9.
3. 3. Bagnasco, P., Delafuente, L., Gualtieri, G ., Noya, F., and Anas, A. (1998). Fluorescent *pseudomonas* spp. As biocontrol agent against forage legume root pathogenic fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 30, 1317-1322.
4. Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., and Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudate in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57, 233-266.
5. Bakker, P. A. H. M., Ran, L. X., Pieterse, C. M. J., and Van loon, L. C. (2003). Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant disease. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25, 5-9.
6. Bloemberg, G. V., Lugtenberg, B. J. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobia. *Plant Biology* 4, 343-350.
7. Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J., and Hofte, M. (1996). Involvement of pyoverdin in suppression of *Pythium*- induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and Environmental Microbiology* 3, 865-871.
8. Castaneda, G. C., Munoz, T. J. J., and Videa, J. R. P .(2005). A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. *Microchemical Journal* 81, 35-40.
9. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., and Perez-Galdona, R. (2004). Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in Chamaecytisus proligerus, a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant and Soil* 266, 261-272.
10. Frietas, J., and Germida, J. J. (1990). Plant growth promoting rhizobacteria for winter wheat. *Canadian Journal of Microbiology* 36, 265-272.
11. Germida, J. J., Walley, F. L. (1996). Plant growth promoting rhizobacteria affect rooting pattern and arbuscular mycorrhizal fungi colonization of field grown spring wheat. *Biology and Fertility of Soil* 23, 113-120.
12. Glick, B. R. (1995). The enhacement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41, 109-117.
13. Glick, B. R., Jacobson, C. B., Schwarze, M. M. K., and Pasternak, J. J. (1994). 1-aminocyclopropane-1-carboxylix acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 donot stimulate canola root elongation. *Canadian Journal of Microbiology* 40, 911-915.
14. Hass, D., and Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Microbiology* 3, 307-319.
15. Hassanjadeh, N. (1991). Role of Rhizobacteria in promoting cow pea seed growth. Bulletin OILB SROP, 14, 8.
16. Hofte, M., Seong, K. Y., Jurkevitch, E., and Verstraete, W. (1991). Pyoverdin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain $7NSK_2$: Ecological significance in soil. *Plant and Soil* 130, 249-257.
17. Hungria, M., and Bohrer, T. R. J. (2000). Viability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. *Biology and Fertility of soil* 31, 45-52.
18. Iswandi, A., Bossier, P., Vandenabeele, J., and Verstraete, W . (1987). Effects of seed inoculation with the rhizopseudomonas strain 7NSK2 on the root microbiota of maize and barley. *Biology and Fertility of Soil* 3, 153-158.
19. Ji, P., Campbell, H. L., Kloepper, J. W ., Jones, J. B., Suslow, T. V., and Wilson, M. (2006). Integrated biological control of bacterial speck and spot of tomato under field conditions using foliar biological control agents and plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control* 36, 358-367.
20. Khaliq, A., Arshad, M., Khalid, A ., and Zahir, A. (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.

21. Lalande, R., Bissonnette, N., Coutlee, D., and Antoun, H. (1989). Identification of rhizobacteria from maize and determination of their plant-growth promoting potential. *Plant and Soil* 115, 7-11.
22. Lugtenberg, B. J. J., Kravchenko, L. V., and Simons, M. (1999). Tomato seed and root exudates sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental Microbiology* 1, 439-446.
23. Luna, C. L., Mariano, R. L. R., and Maior, A. M. S. (2002). Production of a Biocontrol agent for Crucifers Black Rot Disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 19, 133-140.
24. Mantelin, S., Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany* 55, 27-34.
25. Marschner, H., Romheld, V. (1994). Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* 165, 261-274.
26. Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-sacherer, P ., Heeb, S ., Hass, D., and Defago, G. (1998). Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of system resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 88, 678-684.
27. Meyer, D. M. (2000). Pyoverdins: Pigments siderophores and potential taxanomic markers of fluorescent *pseudomonas* species. *Microbiology* 174, 135-142.
28. Molla, A. H., Shamsuddin, Z. H., Halimi, M. S., Morziah, M., and Puteh, A. B. (2001). Potential for enhancement of root growth and nodulation of soybean co-inoculated with *Azospirillum* and *Bradyrhizobium* in laboratory system. *Annual of Microbiology* 33, 457-463.
29. Montesinos, E., Bonaterra, A., Badosa, E., Frances, j., Alemany, J ., Llorente, I., and Moragrega, C. (2002). Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Microbiology* 5, 169-175.
30. Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., and Velazhahan, R. (2004). Involvement of secondry metaboloties and extracellular lytic enzymes produced dy *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice, sheath blight pathogen. *Microbiology* 159, 73-81.
31. O'Sullivan, D. J., O'Gra, F. (1992). Traits of *Pseudomonas fluorescens* spp. Involeved in suppression of plant root pathogens. *Review of Microbiology* 56, 662-676.
32. Ownley, B. H., Duffy, B. K ., and Weller, D. M. (2003). Identification and manipulation of Soil properties To improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 112, 3333-3343.
33. Patten, C. L., Glick, B. R. (2002). Regulation of indolectic acid production in Pseudomonas putida GR12-2 by tryptophan and stationary-phase sigma factor Rpos. *Canadian Journal of Microbiology* 48, 635-642.
34. Penrose, M., Glick, R. B. (2003). Methods for isolating and characterizing Acc deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Physiology* 118,10-15.
35. Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. (2001). Exploiting genotypic diversity of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas* spp: Characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q81-96. *Applied and Environmental Microbiology* 2545-2554.
36. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N ., Alam, S., and Latif, F . (2004). Organic acids productions solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Science* 7, 187-196.
37. Rasolisedghiyani, M., Rahimiyan, P., Khavari, K., and Malakoti, M. H. (2005). Study of population density and identification of wheat phizospheric fluorescent pseudomonas in different region in Iran. *Journal of Water and Soil Science* 19, 224-234.
38. 38. Reyhanitabar, E. (2000). *Study of population of fluorescent pseudomonas in wheat rhizosphere and determination of their potential on plant growth increasing in Tehran province*.MSc. dissertation. University of Tehran. Karaj. Iran. (In Farsi).
39. Rodriguez, H., Fraga, R . (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17., 319.
40. Rumjanek, N. G., Fonseca, M. C. C., and Xavier, G. R. (2004). Quorum sensing em sistemas agricolas: *Review of Biotecnology* 33, 35-50.
41. 41. Schaad. N. W., Jones, J. B., and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. *APS press* 373pp.
42. Schippers, B., Bakker, A.W., and Bakker, A. H. M . (1987). Intractions of deleterious and and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* 25,339-59.
43. Schippers, B., Bakker, A. W., Bakker, P. A. H. M ., and Vanpeer, R . (1990). Beneficial and deleterious effects of HCN-production pseudomonas on rhizosphere interaction. *Plant and Soil* 129, 75-83.

44. Sharma, A., Johri, B. N., Sharma, A. K ., and Glick, B. R . (2003). Plant growth- promoting bacterium *Pseudomonas* sp. Strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean. *Soil Biology and Biochemistry* 35-887-849.
45. Walley, F. L., and Germida, J. J. (1997). Response of spring wheat (*Triticum aestivum*) and interactions between pseudomonads species and *Glomus clarum* NT4. *Biology and Fertility of Soil* 24, 365-371.
46. Weller, D. M. (1988). Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26, 379-407.
47. Yehuda, Z., Skenker, M ., Romheld, V ., Marschner, H ., Hadar, Y ., and Chen, Y. (1996). The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiology* 112, 1273-1280.