بررسی فراوانی و انتشار پسودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم و مطالعه توان بازدارندگی آنها در برابر قارچ عامل پاخوره گندم

عادل ریحانی‌تبار، ناهید صالح راستین، حسینعلی علیخانی و مجتبی محمدی

به ترتیب : دانشجوی دکتری، دانشیار، دانشجوی دکتری و مربی گروه خاکشناسی و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

مقدمه

در سالهای اخیر، مدیریت جمعیت میکروارگانیسم‌ها در ریزوسفر، به سوی استفاده بهینه از ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) پیش می‌رود. اصطلاح PGPR نخستین بار در سال ۱۹۷۸ توسط کلوپرواسکروت وضع گردید (۲). این گروه در ابتدا، باکتریهایی را که نسبت به عوامل بیماریزای گیاهی حالت آنتاگونیستی نشان می‌دادند، شامل می‌شد ولی امروزه تمام باکتریهای مؤثر در رشد بهتر گیاه را که در ریزوسفر نسبت به خاک غیر ریزوسفری برتری یافته و پتانسیل قابل توجهی برای اشغال سیستم ریشه‌ای گیاه نشان می‌دهند، در بر می‌گیرد. در بین انواع این گروه، پسودوموناس‌های فلورسنت (گونه‌های فلورسنس و پوتیدا) اهمیت ویژه‌ای دارند. در این تحقیق فراوانی پسودوموناس‌های فلورسنت در ریزوسفر گندم و توان این باکتریها بعنوان عوامل آنتاگونیست در برابر قارچ عامل بیماری پاخوره گندم (G. g. tritici) مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در طول فصل رشد گندم از مزارع مختلف واقع در استان تهران نمونه‌های گیاه همراه با خاک ریزوسفری از مزارع متعدد گندم جمع‌آوری شدند. شمارش این باکتریها با روش تلقیح رقت‌های خاک روی پلیت حاوی محیط اختصاصی S1 انجام گرفت. کشت خالص هر ایزوله، پس از چند واکشت روی همان محیط تهیه گردید و ایزوله‌ها براساس مطالعات میکروسکپی و آزمون‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، تفکیک و شناسایی شدند. اثر بازدارندگی سویه‌ها بر روی قارچ عامل بیماری Take-all در گندم، با استفاده از دو محیط PDA و NA (نوترینت آگار) بررسی شد.

درصد بازدارندگی از فرمول زیر محاسبه شد:

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

برای بررسی تولید آنتی‌بیوتیک توسط باکتری از روش کرائوس و لوپر استفاده شد (۴). 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 کلنی‌های رشد یافته از سطح محیط جمع‌آوری شدند. برای اطمینان از عدم رشد بقایای کلنی از روش قرار دادند پنبه 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، نشانه وجود آنتی‌بیوتیک درون محیط غذایی تلقی گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از شمارش پسودوموناس‌های فلورسنت حاکی از این است که جمعیت قابل توجهی از این باکتریها در ریزوسفر گندم حضور دارند که تعداد آنها در مزارع مورد مطالعه در محدوده $۱۲/۶ \times ۱۰^{۵}$ ۵×۱۰^{۳} cfu در هر گرم خاک ریزوسفری قرار داشت. گرچه تعداد کلنی‌های مشاهده شده در هر رقت در محیط ساده KB بیشتر از محیط S1 بود اما تعدادی از کلنی‌ها در برابر اشعه uv خاصیت فلورسنس از خود نشان نداده و تعدادی از کلنی‌های ظاهر شده بر روی محیط

KB گرام منفی تشخیص داده نشدند. بعلاوه ظرف‌های حاوی محیط KB به سهولت به انواع قارچها آلوده می‌شد. لذا باتوجه به این نتایج و گزارشات محققین قبلی محیط S1 برای جداسازی و شمارش پسودوموناس‌های فلورسنت انتخاب گردید. براساس آزمون‌های انجام شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی (۳) و اطلاعات موجود تعداد ۴۰ ایزوله که از نظر ویژگی‌های مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بیشترین قرابت را با گونه پسودوموناس فلورسنس داشتند، بعنوان ۴۰ سویه *Pseudomonas fluorescens* انتخاب شدند. در انتخاب این تعداد، تنوع منشاء آنها (منطقه و مزرعه نمونه‌برداری) نیز مورد نظر قرار گرفت تا در حد امکان از سویه‌های متفاوت از گونه فلورسنس استفاده شود. در بین ۴۰ سویه انتخابی ۲۶ سویه توانستند بیش از ۷۰٪ اثر بازدارندگی را از خود نشان دهند و بعنوان سویه‌های آنتاگونیست معرفی شدند. درصد بازدارندگی ۵ سویه حدود ۷۰-۵۰٪ و در مورد بقیه سویه‌ها کمتر از ۵۰٪ بود. در مورد سویه‌هایی با توان بازدارندگی ضعیف که رشد کلنی قارچ در حضور آنها تقریبا برابر با شاهد بود نمی‌توان با قاطعیت درباره تولید آنتی‌بیوتیک توسط آنها اظهار نظر نمود و لازم است که آزمایش‌های تکمیلی با استفاده از سایر محیط‌های غذایی بر روی آنها انجام شوند. کرائوس و لوپر در بررسیهای خود درباره مکانیسم بازدارندگی سویه Pf-5 گونه پسودوموناس اعلام نمودند که این سویه روی محیط NAG تولید آنتی‌بیوتیک نمی‌کند. در حالیکه روی محیط آگار ۵۲۳ آنتی‌بیوتیک تولید می‌کند (۴).

منابع مورد استفاده

1- 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.
2- Klopper, J. W., M. N. Schroth. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. Phytopathology. 24:879-882.
3- Holt, J. G.,
Baltimore, Maryland.
4- 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. Interlacen, Switzerland.