مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۴، سال ۱۳۸۴ (۸۵۷-۸۴۹)

تعیین بیووارهای جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* جدا شده از مناطق مهم سیب‌زمینی کاری ایران و بررسی توانایی تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور در آنها

فاطمه شهریاری[۱]، غلام خداکرمیان[۲] و اصغر حیدری[۳]
۱، ۲، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس
۳، محقق مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۷/۲۲

خلاصه

از غده‌ها و خاک مزارع سیب‌زمینی استانهای همدان، اصفهان، اردبیل و تهران، ۱۷۰ جدایه از سودوموناسهای فلورسنت با استفاده از محیط کشت Pseudomonas agar F جداسازی گردید. پس از بررسی نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های محلول سلولی آنها، ۲۸ جدایه انتخاب و خصوصیات فنوتیپی آنها تعیین گردید. تمام جدایه‌ها روی محیط کشت Pseudomonas agar F تولید رنگ فلورسنت نمودند و قادر به هیدرولیز ژلاتین و تولید آرژنین دی هیدرولاز و اکسیداز بوده و اکثراً توانایی احیاء نیترات را داشتند. رشد در ٤ درجه سانتی‌گراد و تولید لیسیتیناز در همه جدایه‌ها مثبت و رشد در ٤١ درجه سانتی‌گراد در تعدادی از جدایه‌ها مثبت بود. اغلب جدایه‌ها از نظر تولید لوان منفی بودند و واکنش HR روی برگ توتون، تولید رنگ غیر فلورسنت و فعالیت پکتولیتیکی در تمام جدایه‌ها منفی بود. تمام جدایه‌ها ازقندهای ال- آرابینوز، دی- زایلوز، دی – گالاکتوز و سوکروز تولید اسید و از اسیدهای دی- آلانین و ال- تارتاریک اسید تولید قلیا کردند. استفاده از آدونیتول، اتانول و ژرانیول در تمام جدایه‌ها منفی بود. استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، فنیل استات، نیکو تینات و بوتیل آمین در تعدادی از جدایه‌ها مثبت و در تعدادی از آنها منفی بود. با توجه به ویژگیهای فنوتیپی بررسی شده، جدایه‌های مورد مطالعه به عنوان *P. fluorescens* شامل بیووارهای III، IV و V تشخیص داده شدند که بیووار III این باکتری بیشترین جمعیت را در میکروفلور گیاه سیب زمینی داشت. از لحاظ نقوش الکتروفورز پروتئین نیز بین جدایه‌هایی که در بیووارهای مختلف باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند اختلافات جزئی وجود داشت. نماینده‌های بیووارهای مختلف این باکتری در شرایط آزمایشگاهی تولیدکننده آنتی بیوتیک و سیدروفور بودند.

واژه های کلیدی: *P. fluorescens*، سیب زمینی، بیووار، ایران

مقدمه

باکتری *P. fluorescens* دارای انتشار وسیع بوده و به فراوانی در آب، خاک و به ویژه در ریزوسفر گیاهان وجود دارد. مطالعات فراوانی در مورد این باکتری صورت گرفته است. بعضی از جدایه ها موجب افزایش رشد و سلامتی گیاه شده و در نتیجهٔ موجب کاهش کاربرد مواد شیمیایی در کشاورزی می شوند. برخی در خاک‌های باز دارنده طبیعی علیه بیماری های خاکزاد متعددی موثرند (۱۸) . تولید آنتی بیوتیک توسط این باکتری یک فاکتور مهم در توانایی آن جهت جلوگیری از رشد عوامل بیماریزای گیاهی می باشد. این باکتری جهت کنترل بیماریهای

مکاتبه کننده: فاطمه شهریاری
e-mail: shahryari14@yahoo.com

مرگ گیاهچه حاصل از قارچهای *Pythium* و *Rhizoctonia* و بیماریهای ناشی از گونه‌های بیماریزای جنس *Pseudomonas* از قبیل *P. tolaasii* به کار رفته است (۲). جدایه های ویژه‌ای از این باکتری که ژن تشکیل دهندهٔ هسته یخ در آنها حذف شد، جهت تولید عوامل بیوکنترل برای به حداقل رساندن خطر سرمازدگی درگیاهانی از قبیل گیلاس، سیب، گلابی، هلو، بادام، گوجه فرنگی، سیب‌زمینی و توت فرنگی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که جدایه A506 از این باکتری به صورت تجاری جهت کنترل جراحات سرمازدگی گلابی استفاده شده است(۱). همچنین *P. fluorescens* یکی از چندین گونه باکتریایی معمول است که جهت کنترل بیماریها در فیلوسفر گیاهان به کار رفته است و یک جدایه طبیعی مؤثر از این گونه به صورت تجاری جهت کنترل آتشک گلابی استفاده شده است (۱، ۲). تعدادی از جدایه‌های این باکتری نیز باعث تجزیه بیولوژیکی ترکیبات طبیعی یا ترکیبات سمی تولید شده توسط انسان می‌شوند و در گیاهان متعددی به صورت اپی‌فیت زندگی می‌کنند. بعضی از آنها نیز پاتوژن‌های فرصت طلب گیاهی بوده و ایجادکننده پوسیدگی نرم می‌باشند. به خاطر اهمیت *P. fluorescens* در محیط‌های مختلف، مطالعات اکولوژیکی متعددی در مورد این باکتری صورت گرفته است (۴).

در یک مطالعه وسیع فنوتیپی با ۲۶۷ جدایه از سودوموناس‌های غیربیماریزای گیاهی جدا شده از مناطق مختلف، که شامل ۱۷۵ استرین فلورسنت نیز بودند، ۱۴۶ خصیصه غذایی بررسی شد و نشان دادند که گونه *P. fluorescens* بسیار هتروژن می‌باشد. این گونه به ۷ بیوتیپ تقسیم شد که سپس بیوتیپ‌هایD، C، B، A و F بیووارهای ۱ تا ۵ نامیده شدند و بیوتیپ‌های G و E به ترتیب گونه‌های *P. chlororaphis* و *P. aureofaciens* معرفی شدند (۱۹) که بعداً گونه *P. chlororaphis* نامیده شدند (۱۱). بیووار V این باکتری یک زیر گروه هتروژن است و جدایه‌های آن اغلب غیر قابل طبقه‌بندی می‌باشند (۱۹). به خاطر هتروژنیتی بیووار V اختصاص یک استرین مرجع به آن غیر ممکن شده است. این سیستم چند بیوواری تنها سیستم طبقه‌بندی موجود است و به طور وسیع نیز به کار می‌رود (۴).

یک آنالیز عددی با ۱۹۳ جدایه از باکتری *P. fluorescens* متعلق به همه بیووارها به جز بیووار V انجام شد و برای هر بیووار زیرگروه‌هایی تعیین گردید. بیووار I به دو زیر گروه، بیووار II به سه زیر گروه و بیووارهای III و IV نیز هر کدام به دو زیر گروه تقسیم شدند (۵). به طور مشابه یک آنالیز عددی با ۷۲ جدایه از بیووارV این باکتری انجام شد و این بیووار به ۷ زیر گروه تقسیم گردید (۳). در مجموع، توصیف فنوتیپی نشان‌دهنده تنوع زیاد در این گونه می‌باشد که منجر به تقسیم آن به بیووارها و خود بیووارها نیز به زیرگروه‌هایی شده است. همچنین مطالعات مختلف نشان دادند که تنوع ژنومیکی بسیار زیادی در بیووارهای این باکتری وجود دارد و احتمالاً بیووارها مطابق با گونه هستند (۴). مطالعات فراوانی بر وجود تنوع زیاد در این گونه تأکید کرده‌اند. تنوع توصیف شده در *P. fluorescens* می‌تواند مربوط به تنوع زیستگاهی آن (خاک، آب، گیاهان، گوشت و لبنیات، نمونه‌های بالینی انسان و حیوان) باشد. فاکتورهای محیطی نقش اصلی در تکامل تدریجی باکتری‌ها دارند. در حقیقت منبع کربن و متابولیسم انرژی *P. fluorescens* نسبت به محیطی که از آن جداسازی شده متفاوت می‌باشد. تنوع در بین باکتری‌های متعلق به این گونه براساس شرایط محیطی آنها نه تنها در سطح فنوتیپی که در سطح ژنوتیپی نیز دیده می‌شود. با توجه به تنوع زیاد ژنومیکی در این گونه ، تاکسونومی آن باید اصلاح شود. در چندین مطالعه اخیر در مورد نیاز طبقه‌بندی مجدد جدایه هایی که قبلاً به عنوان *P. fluorescens* شناخته شده‌اند، توافق شده است (۴). تعیین تاکسونومی این گروه فقط با استفاده از مجموعه‌ای از جدایه‌های مناطق مختلف و نماینده‌ای از همه بیووارها امکان‌پذیر خواهد شد و در مطالعات باید همه تکنیک‌های فنوتیپی و ژنومیکی شامل تست‌های متابولیکی، پروفیل پروتئین‌ها، استفاده از پروب‌هایی با دقت متفاوت، هیبریداسیون کمی DNA-DNA و آنالیز RFLP استفاده شود. مطالعات فراوانی در مورد اکولوژی سودوموناس‌های فلورسنت جهت یافتن روش‌های معتبر، سریع و ارزان برای شناسایی تعداد زیادی از جدایه‌ها لازم است (۴).

جدایه‌های این گونه تولید رنگیزه فلورسنت بر روی محیط کشت کینگ ب می کنند .عموماً اکسیداز مثبت و قادر به هیدرولیز ژلاتین و آرژنین دی هیدرولاز هستند. رشد در ۴ درجه سانتی‌گراد و تولید لیسیتیناز در آنها مثبت و رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد در تعدادی از آنها مثبت و در تعدادی منفی است. واکنشهای تولید رنگ غیرفلورسنت، لهانیدن سیب زمینی، هیدرولیز نشاسته و ایجاد فوق حساسیت در توتون در آنها منفی است. بعضی از جدایه‌ها توانایی احیاء نیترات و تولید لوان را دارند و از قندهای ال- آرابینوز، دی- زایلوز، دی– گالاکتوز و سوکروز تولید اسید و از اسیدهای دی- آلانین و ال- تارتاریک اسید تولید قلیا می‌کنند. استفاده از آدونیتول، اتانول و ژرانیول درآنها منفی است و استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، فنیل استات، نیکو تینات و بوتیل آمین در آنها متغیر است (۲۰).

امروزه حفظ منابع طبیعی و کاستن از مواد آلاینده هوا، خاک و آب استفاده از روش‌های طبیعی و بیولوژیک را جهت کنترل بیماری‌های گیاهی از اهمیت روزافزونی برخوردار کرده است. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی برای طبیعت بدون زیان می‌باشد لذا لزوم توجه بیشتر به روش‌های کنترل غیرشیمیایی کاملاً آشکار بوده و در این راستا استفاده از عوامل آنتاگونیست علیه عوامل بیماریزا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به همین دلیل لزوم شناسایی و جداسازی عوامل آنتاگونیست بومی مناطق آلوده کشور که دارای قدرت بالقوه مهار عوامل بیماری‌زا باشند، بسیار ضروری است. این تحقیق به منظور جداسازی و شناسایی بیووارهای *P. fluorescens* مناطق مهم سیب‌زمینی کاری ایران صورت گرفته است تا بتوان از جدایه‌هایی که خاصیت آنتاگونیستی دارند جهت کنترل بیماریهای سیب زمینی و سایر گیاهان استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداري، جداسازي و نگهداري جدايه ها

از اوائل مرداد تا اواخر آبان ۱۳۸۰ از مناطق مهم سیب‌زمینی کاری ایران شامل استانهای همدان، اصفهان، اردبیل و شهرستان دماوند نمونه‌هایی از غده‌ها و خاک مزارع سیب‌زمینی به طور تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل و در یخچال نگهداری شد. جهت جداسازی باکتری‌های متعلق به گونه *P. fluorescens* ازخاک، ۱۰ گرم خاک از هر نمونه در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر سترون حل و پس از دو ساعت گذاشتن روی شیکر یک قطره از سوسپانسیون حاصله به کمک لوپ پلاتینی سترون روی محیط کشت Pseudomonas agar F مخطط گردید. پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸-۲۴ نگهداری شدند و سپس ۴-۳ کلنی به رنگ سبز متمایل به زرد به طور تصادفی انتخاب و جهت اطمینان از خلوص، مجدداً روی محیط کشت مخطط گردیدند. برای جداسازی از سطح غده‌ها نیز پوست ۳۰۰ گرم غده سیب زمینی جدا و سپس روی آن۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته و از سوسپانسیون حاصل به روش بالا جهت جداسازی باکتری مورد نظر استفاده شد. برای استفاده روزمره، جدایه‌های خالص شده روی محیط کشت PDA (سیب زمینی، قند و آگار) و درون لوله زیر پارافین نگهداری شدند و برای نگهداری میان مدت، از کشت ۲۴ ساعته باکتری سوسپانسیونی در شیشه‌های درپوش‌دار حاوی آب مقطر سترون تهیه و در یخچال نگهداری شد.

الکتروفورز پروتئین

الکتروفورز پروتئین استخراج شده در ژل پلی اکریل آمید (SDS-PAGE) (SDS –Polyacrylamid Gel Electrophoresis) تخت عمودی بر مبنای روش اصلاح شده لاملی (۱۶) انجام شد. از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت آگار مغذی (NA) سوسپانسیون تهیه و چند بار با آب مقطر یا بافر فسفات یا سرم فیزیولوژی (۰/۹ گرم نمک در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب) با سانتریفوژ ۴-۳ هزار دور به مدت پنج دقیقه شسته شدند. در صورت استفاده از بافر یا سرم فیزیولوژی در نهایت یک بار با آب مقطر شسته وسپس‌سانتریفوژ شدند.غلظت (optical density) سوسپانسیون نهایی با اسپکتروفتومتر ۱/۵-۱ در طول موج ۶۰۰ نانومتر تنظیم گردید سپس محلولهای I (۷ میلی‌لیتر Tris-Hcl ۱/۵ مولار با pH برابر ۶/۸، ۲/۶ گرم SDS، ۱۶/۸ میلی‌لیتر گلیسرین، ۲ میلی‌گرم برم فنل بلو، ۳ میلی لیتر آب مقطر) و II (۸/۸ میلی‌لیتر از محلول I+ ۱/۲ میلی‌لیتر مرکاپتواتانول) تهیه شدند. به ازای هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری، ۰/۱۶

میلی‌لیتر از محلول II اضافه و به مدت ۵-۴ دقیقه جوشانیده و بلافاصله سرد شد و در سانتریفوژ ده هزار دور به بالا به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سرنگ برداشته و در لوله‌های اپندروف در فریزر نگهداری شد. در این روش از ژل جدا کننده (separating gel) ۱۴ درصد و ژل متراکم کننده (stacking gel) پنج درصد استفاده گردید. بعد از تهیه ژل ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهکهای ژل قرار داده شد و الکتروفورز به کمک جریان ۸۰ ولتی تا رسیدن مادهٔرنگی (برم فنل بلو) به ابتدای ژل زیری وسپس ۱۰۰ ولت وآمپر ثابت در بافر تانک تریس – گلیسین (۳/۲ گرم تریس، ۱۴/۴ گرم گلیسین، ۱ گرم SDS با حجم نهایی یک لیتر و ۸/۳ : pH) انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در محلول رنگ (۰/۱ درصد کوماسی بلو R-250 در متانل، آب واسید استیک به نسبت حجمی ۵: ۵: ۱) به مدت حداقل ۲ ساعت رنگ‌آمیزی وسپس در همان محلول بدون کوماسی بلو رنگبری شد. جهت نگهداری ژلها از اسید استیک ۷ درصد استفاده گردید.

بررسي ويژگيهاي فنوتيپي جدايه ها

از مجموع ۱۷۰ جدایه باکتری جدا شده از سیب زمینی ۲۸ جدایه بر اساس نقوش الکتروفورزی پروتئین های سلولی به عنوان نماینده انتخاب و مورد بررسیهای فنوتیپی قرار گرفتند. مشخصات این ۲۸ جدایه در جدول ۱ خلاصه شده است.

آزمون اکسید از به روش کواکس (۱۵) و آزمون آرژنین دی هیدرولاز به روش تورنلی (۲۲) انجام گرفت. آزمون لیسیتیناز بر اساس روش للیوت و همکاران (۱۷) و آزمون تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط کشت King's medium B به روش شاد (۲۰) انجام شد. آزمون تولید لوان روی محیط حاوی ۵ درصد سوکروز و آزمون فعالیت پکتولیتیکی روی برشهای سیب زمینی و همچنین آزمون تولید رنگ غیر فلورسنت به روش شاد (۲۰) انجام گردید. آزمون احیاء نیترات به نیتریت یا تولید گاز ازت بر پایه روش دای (۸) و آزمون تحریک واکنش فوق حساسیت در توتون به روش کلمنت (۱۲) انجام شد. آزمون هیدرولیز ژلاتین به روش شاد (۲۰) و به دو روش درون لوله و روی پتری انجام گردید.

جدول ۱- مشخصات جدایه های مورد بررسی از مناطق مختلف

بیووار	گونه	محل جمع آوری	کد جدایه	شماره جدایه
III	*P. fluorescens*	اصفهان	S13	۱
III	*P. fluorescens*	همدان	H2	۲
IV	*P. fluorescens*	اصفهان	SD1	۳
-	*Pseudomonas sp.*	همدان(بهار)	H46	۴
III	*P. fluorescens*	همدان	H17	۵
III	*P. fluorescens*	همدان (هارون آباد)	H39	۶
III	*P. fluorescens*	همدان	H25	۷
III	*P. fluorescens*	دماوند	D3	۸
IV	*P. fluorescens*	دماوند	D1	۹
III	*P. fluorescens*	اردبیل (رضی آباد)	AR1	۱۰
V	*P. fluorescens*	همدان (زرند)	H4	۱۱
V	*P. fluorescens*	اصفهان	S12	۱۲
III	*P. fluorescens*	همدان (نهاوند)	H19	۱۳
III	*P. fluorescens*	همدان(کبودر آهنگ)	H22	۱۴
III	*P. fluorescens*	اصفهان	S15	۱۵
III	*P. fluorescens*	اصفهان	S9	۱۶
III	*P. fluorescens*	اصفهان	S17	۱۷
III	*P. fluorescens*	اصفهان	S22	۱۸
III	*P. fluorescens*	همدان (نهاوند)	H41	۱۹
III	*P. fluorescens*	اردبیل (آلادیق)	AR13	۲۰
III	*P. fluorescens*	همدان	H5	۲۱
IV	*P. fluorescens*	اصفهان	S1	۲۲
III	*P. fluorescens*	دماوند	D14	۲۳
III	*P. fluorescens*	دماوند	D6	۲۴
V	*P. fluorescens*	دماوند	D9	۲۵
III	*P. fluorescens*	دماوند	D7	۲۶
III	*P. fluorescens*	دماوند	D15	۲۷
-	*Pseudomonas. sp.*	همدان	H2o	۲۸

برای سنجش رشد باکتری در۴ و ۴۱ درجه سانتی گراد از محیط پایه آیر و همکاران با افزودن ۰/۵ درصد گلوکز و ۰/۵ درصد عصارهٔ مخمر و قرار دادن در بن ماری استفاده شد. آزمونهای توان استفاده از منابع مختلف کربو هیدرات به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و تولید اسید یا قلیا به روش شاد (۲۰) و با استفاده از محیط پایه آیر و همکاران انجام و نتایج تا ۳۰ روز بعد ارزیابی گردید. منابع کربنی و بنیانهای کربوهیدراتی استفاده شده عبارت بودند از: ال آرابینوز، دی زایلوز، ال تارتاریک اسید، دی آلانین ، سوربیتول، ترهالوز، سوکروز، بوتیرات، والرات،

مزواینوزیتول، آدونیتول، نیکوتینات، دی‌گالاکتوز، اتانول، ژرانیول، فنیل استات و بوتیل آمین.

بررسي توليد آنتي بيوتيك

جهت بررسی توانایی تولید آنتی بیوتیک و سیدروفور از جدایه های S13, D3, AR1, H4, S15, S17, H5, S1, D6 و D9 که نماینده بیووارهای مختلف باکتری *P. fluorescens* بودند و همچنین در مقابل باکتری عامل ساق سیاه سیب زمینی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند، استفاده گردید.

برای بررسی تولید آنتی بیوتیک از روش ولر و کوک (۲۳) استفاده شد. جدایه های آنتاگونیست روی محیط Nutrient agar glucose (یک درصدگلوکز) حاوی کلرید آهن III ($FeCl_3$) به غلظت ۱۰۰۰ میکرومول به صورت نقطه ای کشت شدند. بعد از ۲۴ ساعت رشد در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، کلنی ها بوسیله پنبه استریل پاک گردیدند و با گذاشتن پتری ها به صورت وارونه و قراردادن چند قطره کلروفرم روی در آن، باکتریهای باقی مانده از بین برده شدند، پس از تهویه، سوسپانسیون باکتری *P. c.* subsp. *atrosepticum* به صورت چمنی بر روی محیط پخش گردید و وجود هاله بازدارندگی پس از ۳۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. به علت وجود آهن کافی در این محیط سیدروفور تولید نشده و اثرات بازدارندگی موجود، ناشی از تولیدآنتی بیوتیک تلقی گردید.

بررسي توليد سيدروفور

روی محیط NAS(یک درصد سوکروز) و NAS حاوی ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن III ($FeCl_3$)، باکتری آنتاگونیست به صورت نقطه ای کشت داده شد، بعد از ۲۴ ساعت کلنی باکتری بوسیله پنبه سترون پاک گردید. روی در پتری وارونه چند قطره کلروفرم ریخته شد و بعد از یک ساعت پتری ها تهویه و به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند تا آنتی بیوتیک های احتمالی تولید شده، غیرفعال گردند. عدم وجود هاله در پتری حاوی کلرید آهن III و وجود هاله در پتری فاقد کلرید آهن III پس از کشت چمنی پاتوژن مؤید وجود سید روفور خواهد بود.

نتایج و بحث

با بررسی خصوصیات فنوتیپی ۲۸ جدایه منتخب (جدول۱) بر اساس خصوصیات فنوتیپی ارایه شده توسط سایر محققین (۴، ۹، ۱۹، ۲۰، ۲۱)، جدایه‌های شناسایی شده با داشتن ویژگیهایی از قبیل تولید رنگ فلورسنت روی محیط Pseudomonas agar F (حاوی ۱۰ درصد گلیسرول در هر لیتر)، اکسیداز مثبت، توانایی هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز و ژلاتین، رشد در ۴ درجه سانتی گراد، تولید لیسیتیناز، عدم تولید رنگ غیر فلورسنت، عدم فعالیت پکتولیتیکی و عدم واکنش فوق حساسیت روی برگ توتون با خصوصیات گونه *P. fluorescens* مطابقت داشتند . جدایه های متعلق به گونه *P. fluorescens* در سه گروه قرار گرفتند که در جدول ۲ ذکر گردیده است.

در گروه اول آزمونهای احیاء نیترات، استفاده از ال- آرابینوز، دی زایلوز، ال- تارتاریک اسید، دی - آلانین، سوکروز و دی- گالاکتوز مثبت و آزمونهای استفاده از سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، فنیل استات و رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد متغیر و استفاده از آدونیتول، نیکو تینات، اتانول، ژرانیول و بوتیل آمین منفی بود و توانایی تولید لوان را نیز نداشتند که با توجه به ویژگیهای گفته شده اعضاء این گروه که شامل ۱۹ جدایه بود در بیووار III باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند که با خصوصیات ارایه شده توسط سایر محققین(۴، ۹، ۲۰) مطابقت داشته و فقط اختلاف در آزمون رشد در ۴۱ درجه سانتی گراد مشاهده شد که می تواند ناشی از تفاوت جغرافیایی و شرایط آب وهوایی باشد. در گروه دوم آزمون های احیاء نیترات، تولید لوان، استفاده از ال- آرابینوز، دی - زایلوز، دی – گالاکتوز، سوربیتول، ترهالوز، مزواینوزیتول، سوکروز، ال- تارتاریک اسید، دی- آلانین و بوتیرات مثبت و استفاده ار والرات، آدونیتول، نیکو تینات، اتانول، ژرانیول، فنیل استات، بوتیل آمین و رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد منفی بود که این گروه با سه جدایه بیووار IV باکتری *P. fluorescens* را تشکیل دادند و با شناسایی های ارایه شده مطابقت داشت(۴، ۹، ۲۰). در گروه سوم آزمونهای احیاء نیترات و تولید لـوان منفـــی

جدول ۲ - خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *P. fluorescens* جداشده از سیب زمینی مناطق مختلف ایران.

آزمون	واکنش بیووارهای مختلف باکتری *P. fluorescens*		
	بیوارIII	بیوارIV	بیوارV
تولید رنگ فلورسنت	+	+	+
تواید رنگ غیر فلورسنت	–	–	–
هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز	+	+	+
اکسیداز	+	+	+
احیاء نیترات	+	+	–
لیسیتیناز	+	+	+
فعالیت پکتولیتیکی	–	–	–
تولید HR روی برگ توتون	–	–	–
تولید لوان	–	+	–
رشد در ۴ درجه سانتی گراد	+	+	+
رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد	V	–	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+
استفاده از:			
ال- آرابینوز	+	+	+
دی - زایلوز	+	+	+
ال- تارتاریک اسید	+	+	+
دی- آلانین	+	+	+
سوربیتول	V	+	v
ترهالوز	V	+	–
سوکروز	+	+	+
بوتیرات	v	+	v
والرات	v	-	v
مزواینوزیتول	–	+	v
آدونیتول	-	–	–
نیکوتینات	+	–	v
دی – گالاکتوز	–	+	+
اتانول	–	–	–
ژرانیول	v	–	v
فنیل استات	–	–	v
بوتیل آمین		–	

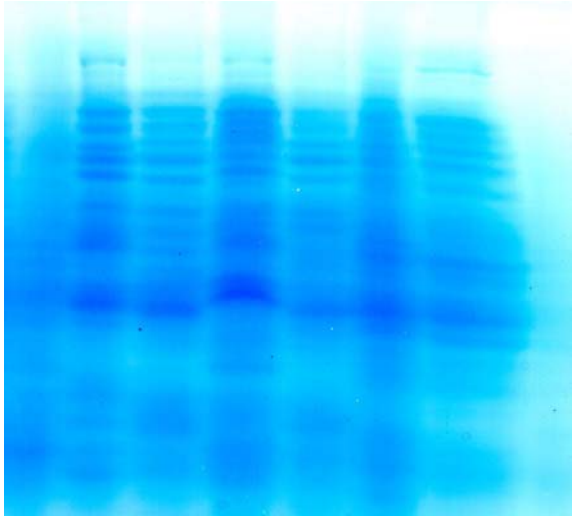
- : واکنش منفی جدایه به آزمون + : واکنش مثبت جدایه به آزمون

v (متغیر): بین ۲۱ تا ۸۹ درصد جدایه

و آزمونهای استفاده از ال- آرابینوز، دی زایلوز، دی -گالاکتوز، سوکروز، ال- تارتاریک اسید و دی آلانین مثبت و آزمون‌های استفاده از ترهالوز، آدونیتول، اتانول و ژرانیول منفی و سوربیتول، مزواینوزیتول، بوتیرات، والرات، نیکوتینات، فنیل استات و بوتیل آمین متغیر بود. همچنین رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد در اعضاء این گروه مثبت بود. ۴ جدایه این گروه در بیووار V باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند که به جز آزمون رشد در ۴۱ درجه سانتی‌گراد در سایر موارد با خصوصیات ارایه شده مشابه بود (۴، ۲۰). با توجه به ویژگیهای فنوتیپی بررسی شده، جدایه‌های مورد مطالعه شامل بیووارهای III، IV و V باکتری *P. fluorescens* بودند که بیووار III این باکتری بیشترین جمعیت را در میکروفلور گیاه سیب زمینی داشت. دو جدایه H46 و H20 نیز وجود داشتند که با خصوصیات گونه *P. fluorescens* مطابق نبودند. در جدایه H20 آزمون‌های اکسیداز، هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز، رشد در۴۱ درجه سانتی‌گراد، تولید لوان، احیاء نیترات، تولید رنگ غیرفلورسنت، فعالیت پکتولیتیکی، استفاده از ترهالوز، آدونیتول، نیکوتینات، اتانول، ژرانیول، فنیل استات و بوتیل آمین منفی و آزمونهای هیدرولیز ژلاتین، تولید لیسیتیناز، رشد در۴ درجه سانتی‌گراد، استفاده از سوکروز، دی – گالاکتوز، سوربیتول، مزواینوزیتول، دی- زایلوز، ال - آرابینوز، دی – آلانین و ال – تارتاریک اسید مثبت بود. جدایهH46 اکسیداز منفی و آزمونهای هیدرولیز آرژنین دی هیدرولاز، رشد در۴۱ درجه سانتی‌گراد، احیاء نیترات و استفاده از ترهالوز مثبت و در سایر آزمونها با جدایهH20 مشابه بود .

نقوش الکتروفورزی جدایه‌های AR13 ، S15، H39،S17، H5، S13، D6 وAR1 که از نظر خصوصیات فنوتیپی در بیووار III باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند در تعداد و محل قرارگیری باندهای قوی و ضعیف به هم شباهت داشتند. جدایه‌های D15، H4 و D9 که توسط تست‌های بیوشیمیایی در بیوارV باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند نیز از لحاظ تعداد و محل قرارگیری باندهای قوی و ضعیف شباهت داشتند. جدایه‌های S1، D1 و SD1 که از لحاظ خصوصیات فنوتیپی در بیووار IV باکتری *P. fluorescens* قرار گرفتند نیز در تعداد و محل قرارگیری باندهای قوی و ضعیف کاملا به هم شبیه بودند. بیوارهای تشخیص داده شده با روش فنوتیپی از نظر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی در ژل پلی آکریل آمید دارای تفاوتهای جزیی بودند. در قسمت فوقانی ژل در مقابل دو باند بیووار IV وV در بیوارIII سه باند وجود داشت و در قسمت پایین‌تر در مقابل دو باند موجود در بیووار III وV باندی در

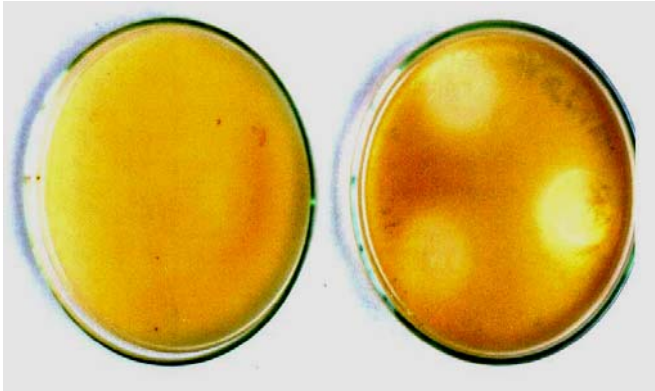
بیووارIV نبود . همچنین در قسمت وسط ژل یک باند قوی در بیووارIII مشاهده شد که در مقابل آن در سایر بیووار ها باندی وجود نداشت. (شکل ۱).



D_1 H_4 D_6 SD_1 AR_1 D_9

شکل۱- نقوش الکتروفورزی پروتئینهای سلولی جدایه‌های باکتری *P. fluorescense* جدا شده از سیب زمینی. جدایه‌های D1 و SD1 بیووارIV ، H4 و D9 بیووار V و D6 و AR1 بیووار III.

در آزمون بررسی تولید آنتی بیوتیک نیز در همه جدایه‌های آنتاگونیست بکار رفته هاله بازدارنده در مقابل باکتری پاتوژن مشاهده شد در صورتیکه در پتری شاهد پاتوژن به صورت یکدست رشد کرد که در شکل ۲ نشان داده شده است.این امر نشان دهنده تولید یک یا چند نوع آنتی بیوتیک توسط باکتری‌های آنتاگونیست می‌باشد.



شکل۲- هاله های بازدارنده ایجاد شده با تولید مواد آنتی بیوتیکی توسط جدایه های *P. fluorescens* علیه P. c. subsp. Atrosepticum

سودو موناس‌های فلورسنت متابولیت‌های ثانویه مختلفی از قبیل آنتی بیوتیک‌ها تولید می‌کنند که فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید (pca)، فنازین ۱- کربوکسامید (pcn)، ۲ و ۴ دی استیل فلوروگلوسینول (phl)، پیولوتئورین (plt) و پیرول نیترین (prn) تعدادی از آنتی بیوتیک‌های تولید شده توسط آنها می‌باشد (۷). در بررسی‌های انجام شده جهت تولید سیدروفور نیز در پتری‌های حاوی NAS که تیمار حرارتی شدند هاله بازدارنده در اطراف باکتریهای آنتاگونیست به وجود آمد. از آنجایی که آنتی‌بیوتیک‌ها به حرارت حساس می باشند، وجود هاله در پتری‌های حاوی NAS که تیمار حرارتی شدند در مقایسه با شاهد و نتایج مثبت بدست آمده از آزمایش تولید رنگ فلورسنت روی محیط Pseudomonas agar F توسط باکتریهای آنتاگونیست تاییدی بر تولید سیدروفور یا موادی با خواص مشابه است. سیدروفورها مواد کلاته کننده آهن سه ظرفیتی با وزن مولکولی کم هستند که تحت شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند و با یون آهن کمپلکس تشکیل می‌دهند. این کمپلکس بوسیله پروتئین‌های گیرنده در غشای سلول باکتری به طور اختصاصی شناسایی و جذب می‌گردد. تاکنون سیدروفورهای متعددی شناخته شده‌اند که ساختمان شیمیایی برخی از آنها نیز مشخص گردیده است. سیدروفور تولید شده به وسیله سودوموناسهای فلورسنت از نوع سودوباکتین یا پیووردین است که نسبت به سیدروفور سایر میکروارگانیسم‌های خاک قدرت رقابت آنها بیشتر است زیرا میل ترکیبی سیدروفور سودوموناسهای فلورسنت بیشتر از سیدروفور سایر میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. سیدروفورها نقش مهمی در آنتاگونیسم بین میکروارگانیسم‌های مختلف دارند. سیدروفور خارج سلولی برخی از استرین‌ها به نام سودوباکتین سریعاً ریشه‌ها را احاطه کرده و آهن منطقه ریشه را غیر قابل دسترس برای میکروارگانیسم‌های ریزوسفر می‌سازد (۱۰).

با توجه به متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط سودوموناسهای فلورسنت می‌توان چنین استنباط کرد که سودوموناسهای فلورسنت عوامل مؤثری برای کنترل بیولوژیکی می‌باشند. این باکتریها محیط اطراف ریشه را کلنیزه کرده و جمعیت بالایی را تولید می‌کنند و با تولید متابولیتهای ثانویه

متعددی از قبیل سیدروفور، آنتی بیوتیک و سیانید هیدروژن از رشد عوامل بیماریزای گیاهی جلوگیری کرده و موجب افزایش رشد گیاه می‌شوند که این باکتریها بعنوان محرک‌های رشد گیاه شناخته شده‌اند (۱، ۶، ۱۳، ۱۴).

REFERENCES

1. Anonymous.1997. Consensus Document on Information Used in the Assessment of Environmental Application Involving *Pseudomonas*. *www1.oecd,org/ehsmono.pdf*
2. Anonymous. 2001. Pseudomonas fluorescens. www.Agrobiologicals.com
3. Barrett, E. J., R. E. Solanes, J. S. Tang, & N. J. Palleroni. 1986. *Pseudomonas fluorescens* biovar V: its resolution into distinct groups and relationships of these groups to other *P. fluorescens* biovars, to *P. putida*, and to psychrotrophic pseudomonads associated with food spoliage. J. Gen. Microbiol., 132: 2709-2721.
4. Bossis, E., P. Lemanceau, X. Latour, & L. Gardan. 2000. The taxonomy of *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agronomie 20: 50-63.
5. Champion, A. B., E. L. Barrett, & N. J. Palleroni. 1980. Evolution in *Pseudomonas fluorescens*. J. Gen. Microbiol.,120: 485-511.
6. Cronin, D., Y. Moenne Loccoz, A. Fenton, C. Dunne, D. N. Dowling, & O'Gara. 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiol. Ecol., 23: 95-106.
7. Dieter, H., B. Caroline, & K. Christoph. 2000. Biocontrol ability of fluorescent pseudomonas genetically dissected:Importance of positive feedback regulation.*www. bentham. org* .
8. Dye , D. W. 1968 . A taxonomic study of the genus *Erwinia* . I . The amylovora group . NewZ. J. Sci., 11:590-607 .
9. Fahy , P. C. & G. J. Persley. 1983 . Plant Bacterial Disease . A Diagnostic Guide . Academic Press , Australia , 393pp .
10. Fuchs, R., M. Schafer, V. Geoffroy, & J. M. Meyer. 2002. Siderotyping - A powerful tool for the characterization of pyoverdines. *http://www.bentham.org/ctmc1-1/fuch/fuchsms.htm*
11. Johnson, J. & N. J. Palleroni. 1989. Desoxyribonucleic acid similarities among. *Pseudomonas* species. Int. J. Syst. Bacteriol., 39: 230-235.
12. Klement, Z., C. L. Farkas, & L. Lovrekorich. 1964 . Hypersensitivity reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf . Phytopathology , 54: 474-477 .
13. Kloepper, J. W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant promoting rhizobacteria on populations of *E. carotovora* on potato roots and daughter tubers. Phytopathology , 73: 217-219.
14. Kloepper, J. W., M. N. Schroth, & T. D. Miller. 1986. Effects of rhizospher colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato development and yield. Phytopathology, 70: 1078-1082.
15. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas solanacearum* by the oxidase reaction . Nature (Lond). 178:703
16. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T_4. Nature. (London) 227: 680-685.
17. Lelliott, R. A., E. Billing, & A. C. Hayward. 1966 . A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. J. Appl. Bacteriol. , 29: 470-489.
18. Lemanceau, P. 1992. Beneficial effects of rhizobacteria on plants: example of fluorescent *Pseudomonas* spp. Agronomie, 12: 413-437.
19. Palleroni, N. J. 1984. Gram – negative aerobic rods and cocci: Family I Pseudomonadaceae. In: Krieg, N. R. and Holt, J. G. (Eds), Bergey's manual of bacteriology, William and Wilkins, Baltimore, 141-168.
20. Schaad, N. W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3th ed APS Press, 373pp.

21. Stanier, R. Y., N. J. Palleroni, & M. Doudoroff. 1966. The aerobic pseudomonads, a taxonomy study. J. Gen. Microbiol., 43: 159-271.
22. Thornley, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism . Appl. Bacteriol., 13: 37-52 .
23. Waller, D. M. & R. J. Cook. 1993. Suppression of take-all of wheat seed treatments with fluorescent pseudomonads. Phytopathology, 73: 463-469.