

## ارزیابی توان سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور

میرحسین رسولی صدقیانی، کاظم خاوازی، حشمت‌اله رحیمیان، محمدجعفر ملکوتی  
و هادی اسدی رحمانی<sup>\*۱</sup>

### چکیده

در دهه‌های اخیر استفاده از توانایی باکتری‌های ریزوسفری برای تحریک و تقویت رشد گیاهان در سطح وسیعی گسترش یافته است. این تحقیق با هدف بررسی پتانسیل تولید سیدروفور سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت در سال ۱۳۸۲ انجام گرفت. برای این منظور ۲۰۱ جدایه از گونه‌های *Pseudomonas putida* و *Pseudomonas fluorescens* و *Pseudomonas aeruginosa* که از مزارع گندم مناطق مختلف ایران جداسازی و براساس روشهای استاندارد شناسایی شده بودند، مورد آزمایش قرار گرفتند. همچنین از دو سویه PGPR خارجی متعلق به جنس سودوموناس بنامهای 7NSK<sub>2</sub> و GRP3 بعنوان شاهد مثبت (sid<sup>+</sup>) و از سویه MPFM1 بعنوان شاهد منفی (sid<sup>-</sup>) استفاده شد. توان تولید سیدروفور توسط سویه‌ها با استفاده محیط جامد حاوی کرم آزورل اس (CAS-agar) مورد ارزیابی قرار گرفت. محیط‌های کشت آبی‌رنگ CAS-آگار با روش کشت قطره‌ای با ۵ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه هر سویه با جمعیت تنظیم‌شده در حدود  $5 \times 10^8$  CFU/ml در سه تکرار تلقیح شدند. در فواصل ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون، قطر کلنی و قطر هاله نارنجی‌رنگ اطراف کلنی اندازه‌گیری و شاخص نسبت قطر هاله به قطر کلنی برای هر سویه محاسبه گردید. نتایج حاصل از ارزیابی توانایی تولید سیدروفور نشان داد که ۱۰۰ درصد سویه‌های سودوموناس قادر به رشد و تولید سیدروفور در محیط CAS-آگار بودند. سرعت گسترش هاله در ۲۵ درصد سویه‌ها کمتر از ۱۵ میلی‌متر در روز، در ۶۱ درصد بین ۲۰-۱۵ میلی‌متر در روز و در ۱۴ درصد سویه‌ها بیش از ۲۰ میلی‌متر در روز بود. در گروه با توان تولید بالای سیدروفور درصد زیادی (۵۷ درصد) از جدایه‌ها را گونه *Pseudomonas fluorescens* تشکیل داد و در گروه با توان تولید متوسط گونه *Pseudomonas putida* با ۵۶ درصد بیشترین فراوانی را داشت. بطور کلی در مورد هر سه گونه از نظر تولید سیدروفور، بالاترین فراوانی در محدوده متوسط (۲۰-۱۵ میلی‌متر در روز) قرار داشت. بهترین سویه‌ها، جدایه‌های FP136 و FP93 با توسعه هاله معادل ۲۴ میلی‌متر در روز از گونه *Pseudomonas fluorescens* بودند. ضمناً سویه‌های FP159، FP165، FP45، FP120، FP190 و FP106 از گونه‌های مختلف توانایی بسیار بالایی نسبت به سویه‌های خارجی 7NSK<sub>2</sub> و GRP3 در تولید سیدروفور نشان دادند. از میان جدایه‌های برتر FP93 و FP159 با توجه به توانایی تولید اکسین و انحلال فسفات نامحلول، برای تهیه مایه تلقیح PGPR پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: سیدروفور، سودوموناس‌های فلورسنت، ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) و CAS-آگار

### مقدمه

ریشه گیاهان بخش قابل ملاحظه‌ای (در حدود ۵ تا ۴۰ درصد) از خاک موجود در اطراف سیستم ریشه‌ای یک گیاه را تشکیل می‌دهد

ریزوسفر به لایه نازک یک الی دو میلی‌متری خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که بسته به شکل هندسی

۱- برترتیب عضو هیات علمی دانشگاه ارومیه، استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب، استاد دانشگاه مازندران، استاد دانشگاه تربیت مدرس و استاد یار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب

\* وصول: ۸۴/۳/۱۷ و تصویب: ۸۴/۱۲/۳

و از این طریق بطور مؤثری آن را به داخل سلول خود منتقل می‌نمایند (Leoni و همکاران، ۲۰۰۲). غلظت سیدروفورهای باکتریایی در خاک بین ۴ تا ۳۰۰ میکرومول و غلظت انواع قارچی بین ۳۰ تا ۲۴۰ میکرومول در گرم خاک گزارش شده است (Barton و Hemming، ۱۹۹۳).

سیدروفورهای باکتریایی براساس ساختمان شیمیایی، به چهار دسته تقسیم‌بندی شده‌اند (Barton و Hemming، ۱۹۹۳). دسته اول شامل سیدروفورهای فنل-کاتکولی<sup>۵</sup> هستند که از آن جمله می‌توان به انتروباکتین (Enterobactin)، آگروباکتین (Agrobactin)، پیوکلین (Pyochelin) و مایکوباکتین (Mycobactin) اشاره نمود. هیدروکساماتها<sup>۶</sup> دسته دیگری از سیدروفورها را تشکیل می‌دهند. سیدروفورهای آئروباکتین (Aerobactin) و شیزوکینین (Schizokinen) که توسط باسیلوس مگاتریوم و سیناوپاکترها مانند گونه‌های جنس آنابنا تولید می‌شود و همچنین فری‌اکسامین‌های<sup>۷</sup> حلقه‌ای (نوع E و D2) و خطی (A، B، D1، G1 و G2) از این دسته هستند. فری‌اکسامین‌ها عمدتاً توسط اکتینومیست‌ها ترشح می‌شوند (Leong و Neilands، ۱۹۸۶). گروه بعدی، سیدروفورهای نوع کربوکسیلات<sup>۸</sup> هستند که مشخص‌ترین نمونه آن ریزوباکتین (Rhizobactin) است که توسط سویه‌های از سینوریزوبیوم میلیوتی تولید می‌شود. دسته چهارم سیدروفورهای باکتریایی، پیووردین‌ها<sup>۹</sup> هستند. این سیدروفورها کروموپتیدهای محلول در آب و به‌رنگ سبز تا زرد هستند و توسط سودوموناس‌های فلورسنت تولید می‌شوند. نزدیک به ۷۰ نوع پیووردین با ساختمان مختلف شناسایی شده‌است. سودوباکتین (Pseudobactin) نمونه‌ای از سیدروفورهای نوع پیووردین بوده و توسط *Pseudomonas* B10 تولید می‌شود (Barton و Hemming، ۱۹۹۳). تفرق اشعه ایکس و روش‌های اسکپتروسکوپی نشان داده که سودوباکتین از یک هگزاپتید خطی تشکیل شده است (L-Lys-D-threo-β-OH-Asp-L- Ala-D-allo-Thr-L-Ala-D-N<sup>δ</sup>-OH-Orn) که در آن باقیمانده اورنیتین به داخل حلقه N-هیدروکسی‌پیپریدون<sup>۱۰</sup> متصل شده و باقیمانده لیزین با یک مشتق فلورسنت کوئینولین<sup>۱۱</sup> در ارتباط است. ترکیب آهن‌دار سودوباکتین بصورت (C<sub>42</sub>H<sub>57</sub>N<sub>12</sub>O<sub>16</sub>Fe.13H<sub>2</sub>O) می‌باشد که بخش

(Boven و Rovira، ۱۹۹۹). میکروارگانیسمهای موجود در این ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای قرار دارند.

(Boven و Rovira، ۱۹۹۹). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)<sup>۱</sup> به انواع باکتری‌های مفید مستقر در این ناحیه اطلاق می‌گردد (Schroth و Kloepper، ۱۹۷۸). این باکتری‌ها به دو صورت "مستقیم" یعنی تحریک رشد گیاه از طریق مکانیسم‌های تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مانند تولید هورمون‌های گیاهی، حل‌کنندگی فسفات، تسریع فرآیند معدنی‌شدن و یا "غیرمستقیم" یعنی کنترل عوامل بیماری‌زا از طریق تولید ترکیبات مختلف مانند سیانید، سیدروفور<sup>۲</sup>، متابولیت‌های ضد قارچ و آنتی‌بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند (Cattelan و همکاران، ۱۹۹۹).

باکتری‌های جنس *Pseudomonas* و بلاخص سودوموناس‌های فلورسنت<sup>۳</sup> از مهمترین اعضای جامعه باکتری‌های ریزوسفری می‌باشند که مطالعات بسیار زیادی در خصوص صفات PGP<sup>۴</sup> و اثرات مثبت ناشی از تلقیح آنها بر رشد گیاه صورت گرفته است. باکتری‌های جنس سودوموناس متعلق به خانواده Pseudomonadaceae بوده و به شکل میله‌ای راست یا کمی خمیده، دارای تاژک قطبی، بدون اسپور و گرم منفی هستند. گونه‌های فلورسنت این جنس شامل *P. putida*، *P. fluorescens*، *P. aeruginosa* و همچنین پاتوژنهای گیاهی نظیر *P. cichorii* و *P. syringae* هستند (Hendricks و همکاران، ۲۰۰۱).

مشخصه عمومی سودوموناس‌های فلورسنت تولید پیگمانهایی است که در برابر نور فرابنفش با طول موج کوتاه (۲۵۴ نانومتر) بویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت فلورسانس دارند (Leoni و همکاران، ۲۰۰۲). این پیگمان‌های فلورسنت و محلول در آب از جمله انواع مهم سیدروفورها هستند. سیدروفورها کلاتها یا ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم و با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای کمپلس شدن با آهن فریک (Fe<sup>3+</sup>) هستند. میکروارگانیسم‌ها به‌منظور تأمین آهن مورد نیاز خود، در شرایط کمبود آهن (Fe<sup>3+</sup> < ۱۰ μM) سیدروفور ترشح می‌کنند که کمپلکس پایداری (Kf = 10<sup>30</sup>) با آهن (III) نامحلول تشکیل داده و آن را بصورت ترکیب متحرک و قابل دسترس در می‌آورند

5 - Phenol-catecholates  
6 - Hydroxamates  
7 - Ferrioxamin  
8 - Carboxylate  
9 - Pyoverdin  
10 - N-hydroxy piperidone  
11 - Quinoline

1 - Plant growth- promoting rhizobacteria  
2 - Siderophore  
3 - Fluorescent Pseudomonads  
4 - Plant growth- promoting

نقش کلیدی دارد (Goel و Katiyar، ۲۰۰۴). نتایج تحقیقات در مورد انتقال آهن بواسطه سیدروفورها نشان داده که از نظر میزان نیاز به آهن در گیاهان و میکروبا مشابهت وجود دارد و چنین استنباط می‌شود که میکروارگانسیم‌های ریزوسفری ممکن است آهن مورد نیاز گیاهان را تأمین نمایند. بنابراین گیاهانی که قادر به استفاده از سیدروفورهای میکروبی بعنوان حامل آهن III هستند، به اتکای توانایی‌شان در استفاده از منابع متعدد آهن در شرایط مختلف خاک، کارایی بالاتری برای جذب آهن نشان می‌دهند.

برخی از گیاهان آهن-کارا<sup>۲</sup> اعم از انواع متکی به استراتژی I و یا II جذب آهن، می‌توانند از سیدروفورهای میکروبی برای تأمین آهن مورد نیاز خود بهره گیرند، بطوری که حتی از این توانایی، بعنوان استراتژی III یاد شده است (Marschner و Romheld، ۱۹۹۴؛ Crowley و همکاران، ۱۹۹۱؛ Jurkevitch و همکاران، ۱۹۸۸). به‌رحال به واسطه حضور سیدروفورها، قابلیت استفاده و تحرک آهن در ریزوسفر افزایش یافته و کمپلکس سیدروفور - آهن تشکیل شده می‌تواند در محلول خاک همراه با جریان توده‌ای به سطح ریشه برسد و آهن از طریق آنزیم احیاکننده کلات آهن III موجود در غشای پلاسمایی (Marschner و Romheld، ۱۹۹۴) و یا از طریق فرآیند تبادل لیگاندی (Yehuda و همکاران، ۱۹۹۶) جذب شود.

دانش استفاده از باکتری‌های محرک رشد (PGPR) افق‌های نوینی را در جهت افزایش رشد و عملکرد گیاه و کنترل عوامل بیماری‌زا نوید می‌دهد. در این میان انتخاب سویه‌های برتر و کارا تعیین‌کننده است. در حال حاضر سویه‌های مؤثری از سودوموناس‌های فلورسنت شناسایی و از آنها به منظور اهداف فوق استفاده می‌شود. باکتری *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 یکی از این جدایه‌ها است که توسط Iswandi و همکاران (۱۹۸۷) از ریزوسفر جو جداسازی شده‌است. این سویه در شرایط کمبود آهن سه نوع سیدروفور بنامهای اسیدسالیسیلیک، پیوکلین و پیوریدین تولید نموده (Buysens و همکاران، ۱۹۹۶) و باعث افزایش رشد گیاهانی از خانواده غلات و سبزیجات شده‌است. سویه MPFM1 موتانت سیدروفور منفی (sid<sup>-</sup>) باکتری 7NSK2 است (Hoft و همکاران، ۱۹۹۱) که از آن به‌عنوان شاهد منفی در این تحقیق استفاده گردید. یک نمونه دیگر از PGPRها سویه *Pseudomonas sp* GRP3 است. این سویه از ریزوسفر سویا جداسازی شده که توانایی بالایی در تولید سیدروفور داشته و از پتانسیل

آمینوکوئینولین آن به سودوباکتین رنگ سبز فلورسنت می‌دهد. با افزودن نمک‌های آهن III و تشکیل ترکیب سودوباکتین-فریک، رنگ آن به قهوه‌ای قرمز تغییر می‌یابد (Teintze و همکاران، ۱۹۸۱). در حال حاضر جامع‌ترین روش برای تشخیص تولید سیدروفور، روش CAS (Schwyn و Neilands، ۱۹۸۷) است. اساس این سنجش، رقابت برای آهن بین یک کمپلکس سه‌تایی آهن III معرف رنگی (CAS) و HDTMA با یک کلات‌کننده یا سیدروفور میکروبی می‌باشد. سیدروفور با داشتن تمایل شدید به ترکیب شدن با آهن III، آن را از کمپلکس سه‌تایی برداشته و منجر به تغییر رنگ معرف CAS از آبی به نارنجی می‌شود. از این روش عمدتاً برای ارزیابی توان تولید سیدروفور باکتری‌ها استفاده شده است (Milagres و همکاران، ۱۹۹۹).

توانایی بسیار بالای تولید سیدروفور، توسط سویه‌های مختلفی از سودوموناس‌ها گزارش شده‌است (Buysens و همکاران، ۱۹۹۶؛ Meyer، ۲۰۰۰؛ Hoft و همکاران، ۱۹۹۱؛ Jurkevitch و همکاران، ۱۹۸۸). سودوموناس‌ها بواسطه تولید سیدروفورها و ایجاد رقابت برای سوبستراهای مختلف بویژه آهن، اثر بازدارندگی قابل‌ملاحظه‌ای علیه عوامل بیماری‌زا نظیر قارچ عامل پاختوره<sup>۱</sup> غلات (Hoft و همکاران، ۱۹۹۱) و بافت‌مردگی ناشی قارچ پتیوم (Buysens و همکاران، ۱۹۹۶) از خود نشان داده‌اند. تقریباً تمام باکتری‌های هوازی و قارچ‌ها سیدروفور تولید می‌کنند، لیکن توانایی تولید در گونه‌ها و حتی سویه‌های مختلف داخل هرگونه متفاوت است (Leong و Neiland، ۱۹۸۶). جذب کمپلکس سیدروفور - آهن توسط باکتری‌ها به حضور گیرنده‌های پروتئینی خاص در سطح غشای سلولی آنها بستگی داشته و توانایی جذب سیدروفورهای مترشحه خود و حتی سیدروفورهای سایر باکتری‌ها، بعنوان توان رقابتی آنها در شرایط محدودیت آهن تلقی می‌شود (Crowley و همکاران، ۱۹۹۱).

گزارش‌های متعددی در مورد امکان جذب کمپلکس سیدروفور-آهن توسط ریشه گیاهان نیز گزارش شده‌است (Crowley و همکاران، ۱۹۸۸؛ Bar-Ness و همکاران، ۱۹۹۱؛ Yehuda و همکاران، ۱۹۹۶؛ Sharma و همکاران، ۲۰۰۳). این موضوع اهمیت سیدروفورها را دوچندان می‌کند، چه آهن در بسیاری از فرآیندها از جمله ذخیره و فعال‌سازی اکسیژن مولکولی، احیای ربیونوکلئوتیدها و نیتروژن مولکولی، فعال‌سازی و تجزیه پراکسیدها و انتقال الکترون توسط طیف وسیعی از ناقلها

فاز سکون در گونه‌های مختلف با اندازه‌گیری و کنترل جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید. به منظور تنظیم تراکم جمعیت میکروبی یکسان در ارلن‌ها، یک آزمایش اولیه با استفاده از جدایه‌های سه گونه مورد نظر بصورت مجزا انجام گرفت، بدین ترتیب که در زمانهای مختلف دانسیته نوری در ۵۴۰ نانومتر و همچنین تعداد باکتری‌ها به روش شمارش کلنی اندازه‌گیری شدند. سپس منحنی رشد باکتری در زمانهای مختلف برای گونه‌های مورد نظر رسم و از این منحنی برای تعیین زمان رسیدن به فاز سکون استفاده گردید. همچنین از روی منحنی جمعیت باکتری‌ها در دانسیته‌های مختلف نوری، تعداد باکتری‌ها در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون برآورد گردید و در صورت لزوم با استفاده از محلول نیم درصد NaCl نسبت به تنظیم و یکسان نمودن جمعیت جدایه‌ها اقدام گردید.

#### تهیه محیط آگار آبی کرم آزورل (CAS Blue Agar) S

برای تهیه این محیط بر اساس روش اصلاح‌شده Alexander و Zuberer (۱۹۹۱) چهار محلول بطور مجزا تهیه، استریل و سپس باهم مخلوط شدند.

#### ۱- محلول معرف Fe-CAS

این محلول از اختلاط ۱۰ میلی‌لیتر  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  یک میلی‌مولار (در محلول ۱۰ میلی‌مولار اسیدکلریدریک) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول حاوی ۶۰/۵ میلی‌گرم CAS (۱/۲۱) میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. این مخلوط ارغوانی تیره به‌آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته به ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاوی ۷۲/۸ میلی‌گرم HDTMA (۱/۸۲) میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر) اضافه شد. محلول آبی تیره حاصله اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

#### ۲- محلول بافر

برای تهیه محلول بافر، ۳۰/۲۴ گرم PIPES<sup>۱</sup> در ۷۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حل گردید. محلول نمکی حاوی ۳ گرم  $KH_2PO_4$ ، ۵ گرم NaCl و ۱ گرم  $NH_4Cl$  بود. pH این محلول با استفاده از محلول ۵۰ درصد KOH در ۶/۸ تنظیم گردید و سپس حجم نهایی آن به ۸۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل پس از افزودن ۱۵ گرم آگار اتوکلاو و تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

#### ۳- محلول غذایی

حاوی ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی‌گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱۱ میلی‌گرم  $CaCl_2$ ، ۱/۱۷ میلی‌گرم  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ، ۱/۴ میلی‌گرم  $H_3BO_3$ ، ۰/۰۴ میلی‌گرم  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۱/۲ میلی‌گرم  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  و ۱

خوبی برای افزایش رشد و کمک به جذب آهن توسط گیاه برخوردار است (Sharma و همکاران، ۲۰۰۳).

با توجه به نقش مهم سیدروفورهای میکروبی در کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد، امکان تأمین آهن مورد نیاز گیاه و همچنین پتانسیل بالای سودوموناس‌های فلورسنت برای کلونیزاسیون ریشه و استقرار در ریزوسفر ضرورت داشت تا توانایی تولید سیدروفور سویه‌های بومی ایران نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. بنابراین، این تحقیق به منظور ارزیابی توانایی تولید سیدروفور توسط سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت، انتخاب سویه‌های کارآمد از نظر تولید سیدروفور انجام شد. در خاتمه و به منظور یک برآورد کلی از وضعیت PGPR بودن سویه‌های با توانایی بالای تولید سیدروفور، بعضی از صفات PGP آنها با سویه‌های خارجی مقایسه شد.

#### مواد و روش‌ها

##### منشاء جدایه‌های سودوموناس

در این تحقیق ۲۰۱ جدایه از گونه‌های *P. fluorescens*، *P. putida* و *P. aeruginosa* از لحاظ توانایی تولید سیدروفور مورد ارزیابی قرار گرفتند. این باکتری‌ها از ریزوسفر مزارع ارقام مختلف گندم استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، زنجان، همدان، کرمانشاه، فارس، تهران، خراسان، کردستان و یزد جداسازی شده‌اند (رسولی صدقیانی و همکاران، ۱۳۸۳). ارقام گندمی که باکتری‌ها از ریزوسفر آنها تهیه شده بودند شامل شهریار، نوید، الموت، الوند، مردشت، زرین، قیاسی، فلات، شیراز، آتیلا، مهدوی، سرداری، کراس‌آزادی، طوس، کاسپارو، فلات ۳، آذر ۲، سیلان، گاسکوژن، تریپیکاله و چند رقم محلی آذربایجان بودند. به همراه این جدایه‌ها دو سویه PGPR خارجی شامل سویه *P. sp.* GRP3 و سویه *P. sp.* 7NSK2 بعنوان شاهد مثبت ( $Sid^+$ ) و همچنین سویه *P. sp.* MPFM1 (موتانت  $Sid^-$  سویه 7NSK2) بعنوان شاهد منفی برای مقایسه جدایه‌های بومی در آزمون‌ها گنجانده شدند. سویه GRP3 از طرف پروفیسور B.N. Johri و سویه‌های 7NSK2 و MPFM1 از طرف پروفیسور M. Hoft دریافت شدند.

##### تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها

برای تهیه سوسپانسیون، یک کلنی از کشت تازه هر جدایه در شرایط استریل به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع KingB تلقیح گردید. این محیط شامل ۲۰ گرم پروتئوز پیتون، ۱/۵ گرم  $MgSO_4$ ، ۱/۵ گرم  $KH_2PO_4$  و ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول در لیتر بود. ارلن‌ها تا زمان رسیدن به فاز سکون، در دمای ۲۸°C و در ۱۲۰ دور در دقیقه بر روی دستگاه شیکر انکوباتور قرار داده شدند.

به نسبت ۲ به ۱ مخلوط و بعد از گذشت ۲۵ دقیقه و سانتریفیوژ مجدد در ۱۹۷۰۰ دور در دقیقه، O.D در طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Benizri و همکاران، ۱۹۹۸). همچنین میزان تولید اکسین توسط جدایه‌ها در حضور تریپتوفان (پیش‌ساز سنتز اکسین) نیز ارزیابی گردید. برای این منظور از غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان در محیط کشت TSB استفاده گردید. توانایی انحلال فسفات در محیط Sperber (۱۰ گرم گلوکز، ۵/۰ گرم عصاره مخمر، ۲۳/۰ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱۴/۰ گرم  $CaCl_2$ ، ۲/۵ گرم  $Ca_3(PO_4)_2$  و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر) و همانند روش آزمون تولید سیدروفور (روش قطره‌گذاری) مورد سنجش قرار گرفت. از روی هاله ایجاد شده در اطراف کلنی‌ها، توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفات معدنی نامحلول تعیین شد (Sperber، ۱۹۵۸).

#### نتایج و بحث

##### ارزیابی تولید سیدروفور در محیط CAS-آگار

طبق مشاهدات Schwyn و Neilands ماده HDTMA موجود در ساختمان کمپلکس سه‌تایی برای برخی از باکتری‌ها (بویژه باکتری‌های گرم مثبت) و قارچها، سمی و خاصیت بازدارندگی دارد. با وجود این نتایج حاصل از ارزیابی توانایی تولید سیدروفور در جدایه‌های سودوموناس بومی در این تحقیق نشان داد که ۱۰۰ درصد جدایه‌ها قادر به رشد و تولید سیدروفور در محیط CAS-آگار بودند. در تحقیقی که توسط Alexander و Zuberer (۱۹۹۱) به منظور ارزیابی تولید سیدروفور در باکتری‌های ریزوسفری انجام گرفت، نشان داده شد که ۷۱ الی ۷۹ درصد از جمعیت میکروبی موجود در ریزوسفر قادر به رشد در محیط CAS-آگار نبودند. همچنین برخی از باکتری‌ها که در محیط مایع M9 قادر به تولید سیدروفور بودند، در محیط CAS-آگار این توانایی را از دست دادند. برای رفع این مشکل، محققان راههایی را پیشنهاد نموده‌اند که از آن جمله می‌توان به خشتی نمودن مقدار اضافی HDTMA با یک رزین جذب‌کننده، شناسایی افزودنی جایگزین و غیرسمی و استفاده از محیط کشت مناسب باکتری به همراه محیط CAS-آگار دریک پلیت اشاره نمود (Milagres و همکاران، ۱۹۹۹). بهرحال در این تحقیق تمام ۲۰۱ جدایه سودوموناس بومی و سویه‌های 7NSK2 و GRP3 سیدروفور تولید نمودند. هاله تشکیل شده در بیشتر باکتری‌ها با حاشیه‌ای کاملاً واضح بود و در تعداد کمی از جدایه‌ها، حاشیه هاله تشکیل شده بصورت پخشیده بود. همچنین رنگ هاله از نارنجی پررنگ تا زرد متغیر بود. سویه MPFMI که بعنوان Sid<sup>-</sup> از آن استفاده شده بود، بر

میلی‌گرم  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. این محلول پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید.

##### ۴- محلول کازوآمینواسید

برای تهیه این محلول، ۳ گرم کازوآمینواسید در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و سپس بوسلیه کاغذ صافی غشائی با قطر ۴۵/۰ میکرون استریل شد. پس از آماده‌شدن چهار محلول فوق، محلول شماره ۳ به محلول بافر و محلول کازوآمینواسید اضافه گردید. سپس همراه با بهم‌زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-CAS به آنها اضافه و در پلیت‌ها پخش گردید. کشت باکتری‌ها با روش تلقیح قطره‌گذاری<sup>۱</sup> در محیط CAS-Agar<sup>۲</sup>

پلیت‌های حاوی محیط CAS-آگار پس از انجماد، با تیغ استریل به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند. از سوسپانسیون تازه جدایه‌های مورد مطالعه با جمعیت تنظیم شده ( $5 \times 10^8$  CFU/ml) به اندازه ۵ میکرولیتر در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری تلقیح شد. همزمان با تلقیح جدایه‌های بومی از سویه‌های PGPR خارجی 7NSK2 و GRP3 بعنوان شاهد مثبت (Sid<sup>+</sup>) و از سویه MPFMI بعنوان شاهد منفی (Sid<sup>-</sup>) نیز در همان محیط کشت تلقیح انجام گرفت. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸ درجه نگهداری شدند. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ بسیار واضح (از آبی به نارنجی) محیط CAS-آگار و با اندازه‌گیری هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در اطراف کلنی باکتری‌ها و در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ارزیابی گردید. همچنین قطر کلنی باکتری و نسبت قطر هاله به قطر کلنی نیز تعیین شد.

پس از غربال‌گری جدایه‌ها از نظر توانایی تولید سیدروفور، سویه‌های برتر انتخاب شده به همراه سویه‌های 7NSK2 و GRP3 از لحاظ برخی خصوصیت‌های محرک رشد نظیر توانایی تولید اکسین و توانایی انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول ارزیابی گردیدند. اندازه‌گیری توانایی تولید اکسین با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف سالکوسکی Salkowski انجام گرفت. برای این منظور از کشت ۷۲ ساعته جدایه‌ها در محیط مایع TSB<sup>۳</sup> استفاده شد. بعد از سانتریفیوژ کردن در ۷۱۶۰ دور در دقیقه بمدت ۵ دقیقه، محلول رویی با معرف سالکوسکی (مخلوط ۲ میلی‌لیتر ۵/۰ مولار  $FeCl_3$  و ۹۸ میلی‌لیتر ۳۵ درصد  $HClO_4$ )

1 - Spot inoculation

2- Universal CAS assay

3 - Trypticase Soy Broth

می‌شد از نظر تولید سیدروفور نسبت به سویه‌های خارجی 7NSK<sub>2</sub> و GRP3 برتری نشان دادند.

گسترش قطر هاله می‌تواند بعنوان معیاری از میزان تولید سیدروفور بکار رود (Loper و Henkels, 1۹۹۹). در شکل‌های ۱ و ۲ اندازه قطر هاله، قطر کلنی و نسبت قطر هاله به قطر کلنی برای جدایه‌های FP159 (از گونه *P. putida*)، FP93 (از گونه *P. fluorescens*) و FP45 (از گونه *P. aeruginosa*) در مقایسه با جدایه‌های خارجی 7NSK<sub>2</sub> و GRP3 نشان داده شده است. قطر هاله FP93 و FP159 در تمام زمانها نسبت به بقیه جدایه‌ها بطور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بیشتر بود (شکل ۱- الف) و قطر هاله آنها در روز چهارم بترتیب به ۶۰/۳ و ۴۵ میلی‌متر رسید. در همین زمان 7NSK<sub>2</sub> و GRP3 قطر هاله‌ای به اندازه ۴۱ و ۲۸ میلی‌متر داشتند. سویه 7NSK<sub>2</sub> توان تولید سیدروفور بیشتری از GRP3 داشت. بهرحال با افزایش زمان انکوباسیون تولید سیدروفور در این جدایه‌ها روند صعودی داشت، لیکن این روند تولید سیدروفور در جدایه FP93 (بویژه پس از ۷۲ ساعت) بطور چشمگیری افزایش یافت. با گذشت زمان، قطر کلنی در تمام جدایه‌های بررسی شده افزایش یافت (شکل ۱ - ب). سویه‌های FP93 و GRP3 از توانایی رشد خوبی در محیط CAS - آگار برخوردار بودند.

به‌رغم یکسان بودن جمعیت اولیه باکتری به‌هنگام تلقیح در محیط CAS - آگار، باکتریها در این محیط سرعت رشد متفاوتی داشتند و حتی با گذشت زمان اختلاف قطر کلنی آنها به حداکثر رسید بطوریکه می‌توانست بر اندازه نسبت آن به قطر هاله تشکیل شده تأثیر بگذارد. بنابر این نسبت قطر هاله به قطر کلنی می‌تواند بعنوان شاخص دقیق‌تری برای مقایسه توانایی تولید سیدروفور جدایه‌های مختلف بکار رود.

روی محیط CAS- آگار رشد کرد ولی سیدروفور تولید ننمود.

میزان تولید سیدروفور با اندازه‌گیری قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی باکتری‌ها ارزیابی گردید. جدول ۱ نتایج مربوط به سرعت گسترش هاله نارنجی ناشی از تولید سیدروفور در محیط کشت CAS- آگار را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که میزان گسترش هاله در ۲۵ درصد کل جدایه‌ها کمتر از ۱۵ میلی‌متر در روز، در ۶۱ درصد بین ۲۰-۱۵ میلی‌متر در روز و در ۱۴ درصد جدایه‌ها بیش از ۲۰ میلی‌متر در روز بود. در گروه با توان تولید بالای سیدروفور (بیش از ۲۰ میلی‌متر در اولین روز)، ۱۶ جدایه از مجموع ۲۸ جدایه را گونه *Pseudomonas fluorescens* تشکیل داد که نشان از توانایی بالای این گونه در تولید سیدروفور بود. در گروه با توان تولید متوسط (بین ۱۵ الی ۲۰ میلی‌متر در روز) گونه *Pseudomonas putida* با ۵۶ درصد بیشترین فراوانی را داشت. بطور کلی در مورد هر سه گونه از نظر سرعت تولید سیدروفور در طی ۲۴ ساعت، بالاترین فراوانی در محدوده متوسط قرار داشت.

جدول ۲ قطر کلنی و نسبت قطر هاله به قطر کلنی را نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که در بیشتر جدایه‌های سه گونه، قطر کلنی کمتر از ۵ میلی‌متر و نسبت قطر هاله به قطر کلنی بیشتر از ۳ بود. در جدایه‌هایی که از نظر قطر هاله در محدوده بالا قرار داشتند، غالباً قطر کلنی بویژه در زمان‌های اولیه کمتر از ۵ میلی‌متر و نسبت قطر هاله به قطر کلنی بیشتر از ۳ بود. همچنین این نسبت در طول چهار روز روند صعودی داشت. بهترین جدایه‌ها از نظر تولید سیدروفور، FP136 و FP93 با تولید معادل ۲۴ میلی‌متر در روز از گونه *Pseudomonas fluorescens* بودند، ضمناً سویه‌های FP45، FP165، FP159، FP120، FP190 و FP106 که هر سه گونه باکتریایی در آنها یافت

جدول ۱- مقایسه تعداد جدایه‌ها از نظر سرعت گسترش هاله در زمان‌های مختلف

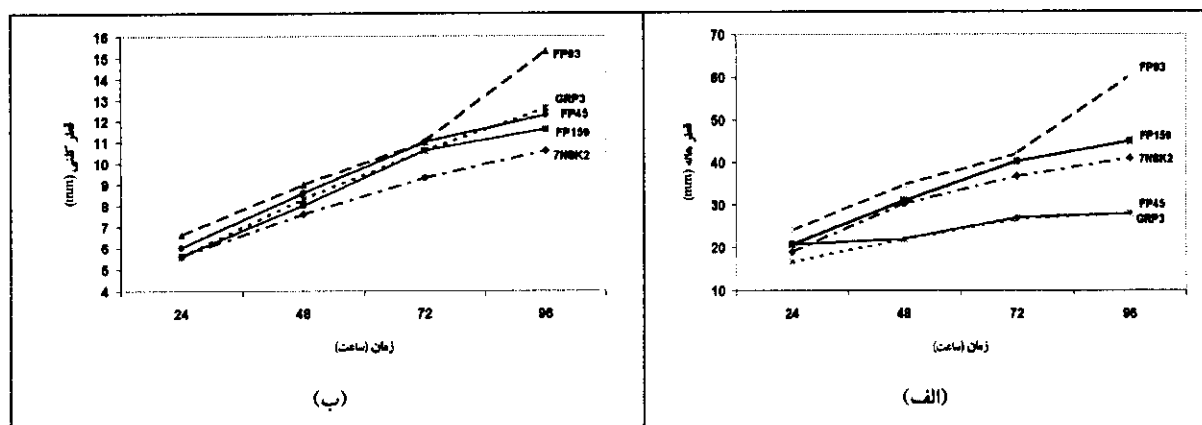
تعداد جدایه	High Dh > 20 mmd <sup>-1</sup>				Medium 15 < Dh < 20 mmd <sup>-1</sup>				Low Dh < 15 mmd <sup>-1</sup>				گونه باکتری
	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	
۱۰۶	۱۰۶	۱۰۲	۹۰	۱۱	-	۴	۱۵	۶۹	-	-	۱	۲۶	<i>P. putida</i>
۸۹	۸۸	۸۸	۸۳	۱۶	۱	۱	۶	۵۰	-	-	-	۲۳	<i>P. fluorescens</i>
۶	۶	۶	۵	۱	-	-	۱	۴	-	-	-	۱	<i>P. aeruginosa</i>
۲۰۱	۲۰۰	۱۹۶	۱۷۸	۲۸	۱	۵	۲۲	۱۲۳	-	-	۱	۵۰	مجموع

Dh: سرعت گسترش قطر هاله برحسب میلی‌متر در روز

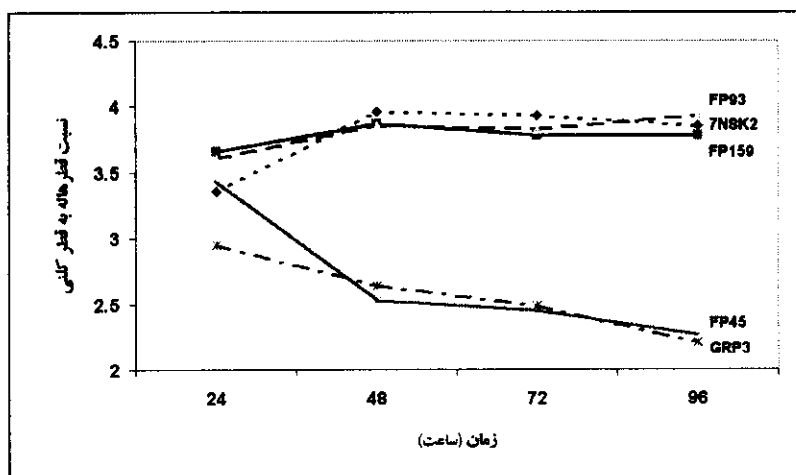
جدول ۲- مقایسه تعداد جدایه‌ها از نظر قطر کلنی و نسبت قطر هاله به قطر کلنی در زمان‌های مختلف

Dh/Dc > 3				Dh/Dc < 3				Dc > 5 mm				Dc < 5 mm				گونه باکتری
زمان (ساعت)																
۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	۹۶	۷۲	۴۸	۲۴	
۴۶	۶۷	۶۹	۶۵	۶۰	۳۹	۳۷	۴۱	۱۰۶	۱۰۶	۱۰۵	۲۵	-	-	۱	۷۱	<i>P. putida</i>
۲۷	۶۴	۷۰	۵۳	۴۲	۲۵	۱۹	۳۶	۸۹	۸۹	۸۸	۳۳	-	-	۱	۵۶	<i>P. fluorescens</i>
۱	۱	۱	۴	۵	۵	۵	۲	۶	۶	۶	۳	-	-	-	۳	<i>P. aeruginosa</i>
۹۴	۱۳۲	۱۴۰	۱۲۲	۱۰۷	۶۹	۶۱	۷۹	۲۰۱	۲۰۱	۱۹۹	۷۱	-	-	۲	۱۳۰	مجموع

Dc: قطر کلنی، Dh/Dc: نسبت قطر هاله بر قطر کلنی



شکل ۱- مقایسه قطر هاله و قطر کلنی جدایه‌های برتر تولیدکننده سیدروفور



شکل ۲- نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه‌های برتر تولیدکننده سیدروفور

جدول ۳- توانایی تولید اکسین و انحلال فسفات معدنی جدایه‌های برتر تولیدکننده سیدروفور

توانایی انحلال فسفات	میزان اکسین تولید شده (mg/l)		جدایه
	+Trp	-Trp	
-	n.d	n.d	7NSK2
+	n.d	n.d	GRP3
-	۱۷/۱۸	۱۶/۵۵	PF45
+	۶۶/۹۸	۶۷/۳۴	PF159
+	۲/۱۹	۲/۱۳	PF93

n.d: غیر قابل تشخیص، (+): توانایی انحلال فسفات، (-): عدم توانایی انحلال فسفات و Trp: تریپتوفان

Trp به محیط رشد باکتری‌ها تأثیر کمی در افزایش تولید اکسین داشت.

از نظر توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول، جدایه‌های PF159 و PF93 مثبت بودند در حالیکه PF45 فاقد این توانایی بود. سویه GRP3 در مقایسه با 7NSK2 قادر به انحلال فسفات بود. مقدار زیادی از فسفر موجود در کودها در خاکهای آهکی به ترکیبات نامحلول کلسیم و منیزیم و در خاکهای اسیدی به فسفات آهن و آلومینیم تبدیل شده و از دسترس گیاه خارج می‌شود. بنابراین استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات (PSB)<sup>۱</sup> برای تبدیل شکل نامحلول فسفر به شکل محلول ضروری بنظر می‌رسد (Laheurte و Berthlin, ۱۹۸۸).

باکتری‌های سودوموناس بواسطه تولید سیدروفور بالا، با القای مقاومت سیستمیک<sup>۲</sup> سبب کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی خاکزاد می‌شوند، بطوریکه Iswandi و همکاران (۱۹۸۷) نشان دادند اثر بازدارندگی ناشی از تولید سیدروفور توسط سویه سودوموناس 7NSK<sub>2</sub> نقش مهمی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا دارد. مطالعه بیشتر این جدایه‌ها از نظر تولید مواد تحریک کننده رشد گیاهی، دورنمای روشنی را در افزایش و تقویت رشد گیاهان به ویژه غلات نوید می‌دهد. افزایش عملکرد غلات با تلقیح بذر و یا خاک زیرکشت آنها با سویه‌های سودوموناس از جمله 7NSK<sub>2</sub> توسط Hofst توسط همکاران (۱۹۹۱) گزارش شده است. بهرحال نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سویه 7NSK<sub>2</sub> توانایی تولید اکسین و انحلال فسفات نامحلول را نداشته و فقط قادر به تولید سیدروفور آن هم کمتر از سویه‌های PF93 و PF159 بود. سویه GRP3 وضعیت نسبتاً بهتری از 7NSK<sub>2</sub> داشت، چه توانایی انحلال فسفات آن مثبت بود. Sharma و همکاران (۲۰۰۳) که GRP3 را بعنوان PGPR معرفی نمودند، نشان دادند این باکتری بطور چشمگیری رشد و جذب آهن توسط گیاهان را افزایش داده است گرچه، این سویه توانایی تولید اکسین را نداشت. سویه‌های PF93 و PF159 که بترتیب از خاکهای استان‌های آذربایجان غربی و خراسان جداسازی شده بودند، از لحاظ خصوصیت‌های محرک رشد وضعیت بسیار مطلوبتری از انواع خارجی مورد مطالعه داشتند. بنابراین با تکیه بر توانایی‌های این دو جدایه می‌توان اطمینان داد با تهیه مایه تلقیح باکتری‌های PGPR مرکب از این جدایه‌ها به افزایش رشد و عملکردهای بالایی دست یافت.

نسبت قطر هاله به قطر کلنی در جدایه‌های مورد بررسی از ۲/۲۱ تا ۳/۹۶ متغیر بود. در مورد جدایه‌های FP93، FP159 و 7NSK<sub>2</sub>، این نسبت تا ۴۸ ساعت افزایش یافت و در ادامه تغییر معنی‌داری در آن مشاهده نگردید: اما نسبت قطر هاله به قطر کلنی در جدایه‌های FP45 و GRP3 با افزایش زمان انکوباسیون کاهش یافت. این کاهش در سویه FP45 در سطح ۱ درصد معنی‌دار بود. در جدایه‌های اخیر کاهش این نسبت می‌تواند به دلیل کم بودن قطر هاله سیدروفوری آنها باشد. بنابراین شاخص قطر هاله به قطر کلنی می‌تواند نشان‌دهنده میزان ثبات و پایداری در تولید سیدروفور نیز به حساب آید: یعنی هرچه این نسبت با پیشرفت زمان افزایش یابد و یا حداقل ثابت بماند، در حقیقت میزان تولید سیدروفور افزایش یافته است و چنانچه این نسبت در مورد یک سویه کاهش یابد نشان می‌دهد احتمالاً سویه مورد نظر در زمانهای اولیه از توان تولید خوبی برخوردار بوده لیکن با گذشت زمان رشد کلنی بیش از سیدروفور ترشح شده افزایش یافته است. عبارت دیگر باکتری در همان زمانهای اولیه نیاز آهن خود را تأمین نموده و به تبع آن ترشح سیدروفور کاهش یافته‌است.

یکی دیگر از خصوصیت‌های مهم برای انتخاب باکتری‌های محرک رشد، توانایی ترشح هورمون‌های گیاهی و همچنین قدرت انحلال فسفات نامحلول خاک است. جدول ۳ توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول و میزان تولید هورمون اکسین توسط جدایه‌های برتر تولید کننده سیدروفور را در حضور و عدم حضور تریپتوفان (Trp) نشان می‌دهد. در بین جدایه‌هایی که به این منظور و جهت مقایسه با سویه‌های 7NSK<sub>2</sub> و GRP3 مورد سنجش قرار گرفتند؛ هر سه سویه FP45، FP159 و FP93 در حضور و عدم حضور Trp قادر به تولید اکسین بودند. میزان اکسین تولید شده توسط سویه‌های PGPR خارجی (7NSK<sub>2</sub> و GRP3) غیرقابل تشخیص بود، لیکن جدایه‌های بومی بویژه FP159 از توانایی بسیار بالایی برخوردار بودند. مطالعات Lifshitz و همکاران (۱۹۸۷) نشان دادند که تحریک رشد رویشی ایجاد شده توسط *Pseudomonas putida* با توانایی آن در تولید هورمونهای گیاهی و ترکیبات محرک رشد ارتباط داشت. Asghar و همکاران (۲۰۰۲) با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف سالکوسکی باکتری‌های PGPR را از نظر تولید اکسین غربال نمودند و ضمن تلقیح بذر گیاه کلم با جدایه‌های برتر، افزایش معنی‌داری در ارتفاع گیاه، قطر ساقه، تعداد شاخه‌های فرعی و تعداد غلاف در بوته شدند. در تحقیق حاضر افزودن

1 - Phosphate solubilizing bacteria

2 - Induced systemic resistance (ISR)



## فهرست منابع:

۱. رسولی صدقیانی، م. ح.، ح. رحیمیان، ک. خاوازی، م. ج. ملکوتی و ه. اسدی رحمانی. ۱۳۸۴. بررسی تراکم جمعیت، جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران. مجله علوم خاک و آب. جلد ۱۹ شماره ۲: ۲۲۴-۲۳۴. تهران، ایران.
2. Alexander, D. B., and D. A. Zuberer. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol. Fertil. Soils* 12: 39-45.
3. Asghar, H. N., Z. A. Zahir, M. Arshad and A. Khaliq. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting in *Brassica juncea* L. *Biol. Fertil. Soils* 35:231-237.
4. Bar-Ness, E., Y. Chen, Y. Hadar, H. Marschner, and V. Romheld. 1991. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants. *Plant and Soil* 130: 231-241.
5. Barton, L. L. and B. C. Hemming. 1993. *Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms*. Academic Press, USA.
6. Benizri, E., A. Courtade, C. Picard, and A. Guckert. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxines by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. *Soil Biol. Biochem.* 30: 1481-1484.
7. Boven, G. D., and A. D. Rovira. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy* 66:1-102.
8. Buysens, S., K. Heungens, J. Poppe, and M. Hofte. 1996. Involvement of pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK<sub>2</sub>. *Appl. Environ. Microbiol.* 3: 865-871.
9. Cattelan, A. J., P. G. Hartel, and J. J. Fuhrmann. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63: 1670-1680.
10. Crowley, D. E., C. P. P. Reid, and P. J. Szaniszlo. 1988. Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat. *Plant Physiol.* 87: 680-685.
11. Crowley, D. E., Y. C. Wang, C. P. P. Reid, and P. J. Szaniszlo. 1991. Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants. *Plant and Soil.* 130: 179-198.
12. Hendricks, D., P. H. A. Sneath and J. G. Holt. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2<sup>nd</sup> Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
13. Hofte, M., K. Y. Seong, E. Jurkevitch, and W. Verstraete. 1991. Pyoverdine production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7SNK<sub>2</sub>: Ecological significance in soil. *Plant and Soil* 130: 249-257.
14. Iswandi, A., P. Bossier, J. Vandenabeele, and W. Verstraete. 1987. Effects of seed inoculation with the rhizopseudomonas strain 7SNK<sub>2</sub> on the root microbiota of maize and barley. *Biol. Fertil. Soils* 3; 153-158.
15. Jurkevitch, E., Y. Hadar, and Y. Chen. 1988. Involvement of bacterial siderophores in the remedy of lime-induced chlorosis in peanut. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52:1032-1037.
16. Katiyar, V., and R. Goel. 2004. Siderophore mediated plant growth promotion at low temperature by mutant of fluorescent pseudomonad. *Plant Growth Regulation* 42:239-244.
17. 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.
18. Laheurte, F., and J. Berthelin. 1988. Effect of a phosphate solubilizing bacteria on maize growth and root exudation over four levels of labile phosphorous. *Plant and Soil* 105:11-17.
19. Leoni L., Ambrosi C., Petrucca A., and Visca P. 2002. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth-promoting *Pseudomonas* B10. *FEMS Microbiol. Letters.* 208: 219-225.

20. Lifshitz, R., J. W. Kloepper, M. Kozłowski, C. Simson and I. Zaleska. 1987. Growth promotion of canola seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic condition. *Can. J. Microbiol.* 33: 390-395.
21. Loper, J. E., and M. D. Henkels. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances level of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5357-5363.
22. Marschner, H., and V. Romheld. 1994. Strategies of plants for acquisition of iron. *Plant and Soil* 165:261-274.
23. Meyer, J. M. 2000. Pyoverdins: pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch. Microbiol.* 174: 135-142.
24. Milagres, A. M. F., A. Machuca, and D. Napoleão. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J. Microbiol. Methods* 37: 1-6.
25. Neilands, J. B. and S. A. Leong. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 187-208.
26. Schwyn, B. and J. B. Neilands. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.
27. Sharma, A., B. N. Johri, A. K. Sharma and B. R. Glick. 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. Strain GRP<sub>3</sub> influences iron acquisition in mung bean. *Soil Biol. Biochem.* 35: 887-894.
28. Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite solubilizing organisms in the rhizosphere. *Aust. J. Agr. Res.* 9: 778-781.
29. Teintze, M. M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong and D. vander Helm. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochem.* 20: 6446-6457.
30. Yehuda, Z., M. Shenker, V. Romheld, H. Marschner, Y. Hadar, and Y. Chen. 1996. The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiol.* 112: 1273-1280.

## An Evaluation of the Potentials of Indigenous Fluorescent Pseudomonads of Wheat Rhizosphere for Producing Siderophore

M. H. Rasouli Sadaghiani, K. Khavazi, H. Rahimian,  
M. J. Malakouti and H. Asadi rhamani<sup>1</sup>

### Abstract

The potentials of non-symbiotic rhizobacteria for stimulating plant growth have been extensively used during recent decades. The objective of this investigation was to determine the potentials of some indigenous fluorescent Pseudomonads for siderophore production. For this purpose, some 201 strains of *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Pseudomonas aeruginosa* were studied. Also two imported PGPR strains belonging to the *Pseudomonas* genus (7NSK2 and GRP3) were used as positive controls ( $sid^+$ ), and MPFMI strain was used as negative control ( $sid^-$ ). The potentials of these strains for siderophore production were evaluated by chrome azorel-S assay (CAS blue agar) through color change. The blue CAS-agar medium was inoculated in a drop plate method with 5 microliter of fresh culture suspensions having a controlled population density of  $5 \times 10^8$  CFU/ml in three replications. The diameter of colonies and orange halos around the colonies and their ratio were determined 24, 48, 72, and 96 hours after the inoculation. The results showed that 100% of the *Pseudomonas* strains were capable of growing on the CAS-agar medium and producing siderophore. The advance of color change was measured to be less than 15 mm/day for 25% of the strains, 15-20 mm/day for 61% of the strains, and more than 20 mm/day for 14% of the strains. A large percentage (75%) of the group with high potentials for siderophore production consisted of *Pseudomonas fluorescens* strains. Regarding the potential of these strains for siderophore production, the most abundant strain lay within the medium range (15-20 mm/day). The best strains FP136 and FP93 producing about 24 mm/day belonged to the *Pseudomonas fluorescens* strain. Furthermore, strains FP45, FP165, FP159, FP120, FP190, and FP106 from various species showed much greater potentials for siderophore production as compared with the strains 7NSK<sub>2</sub> and GRP3. Considering the superior potentials of FP93, and FP159 strains for auxin production and for solubilizing insoluble phosphates, they are recommended for the production of PGPR inoculum.

**Keywords:** Siderophore, Fluorescent Pseudomonads, Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and CAS-agar.

1 - Scientific Staff Member of Urmia University, member of Scientific Staff at Soil and Water Research Institute, Prof. at Mazandaran Univ. and Prof. at Tarbiat Modares Univ., respectively., Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran