ارزیابی توان سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت ریزوسفر گندم برای تولید سیدروفور

میرحسن رسولی صدقیانی، کاظم خاوازی، حشمت‌اله رحیمیان، محمدجعفر ملکوتی و هادی اسدی رحمانی[1]*

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 درسال 1382 انجام گرفت. برای این منظور 201 جدایه از گونه‌های *Pseudomonas putida*، *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 $7NSK_2$ و GRP3 بعنوان شاهد مثبت (sid^+) و از سویه MPFM1 بعنوان شاهد منفی (sid^-) استفاده شد. توان تولید سیدروفور توسط سویه‌ها با استفاده محیط جامد حاوی کرم آزورل اس (CAS-agar) مورد ارزیابی قرارگرفت. محیط‌های کشت آبی‌رنگ CAS-آگار با روش کشت قطره‌ای با 5 میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه هر سویه با جمعیت تنظیم‌شده در حدود5×10^8 CFU/ml در سه تکرار تلقیح شدند. در فواصل 24، 48، 72 و 96 ساعت انکوباسیون، قطر کلنی و قطر هاله نارنجی‌رنگ اطراف کلنی اندازه‌گیری و شاخص نسبت قطرهاله به قطر کلنی برای هر سویه محاسبه گردید. نتایج حاصل از ارزیابی توانایی تولید سیدروفور نشان داد که 100 درصد سویه‌های سودوموناس قادر به رشد و تولید سیدروفور در محیط CAS-آگار بودند. سرعت گسترش هاله در 25 درصد سویه‌ها کمتر از 15 میلی‌متر در روز، در 61 درصد بین 20-15 میلی‌متر در روز و در 14 درصد سویه‌ها بیش از 20 میلی‌متر در روز بود. در گروه با توان تولید بالای سیدروفور درصد زیادی (57 درصد) از جدایه‌ها را گونه *Pseudomonas fluorescens* تشکیل داد و درگروه با توان تولید متوسط گونه *Pseudomonas putida* با 56 درصد بیشترین فراوانی را داشت. بطورکلی در مورد هر سه گونه از نظر تولید سیدروفور، بالاترین فراوانی در محدوده متوسط (20-15 میلی‌متر در روز) قرار داشت. بهترین سویه‌ها، جدایه‌های FP136 و FP93 با توسعه هاله معادل 24 میلی‌متر در روز از گونه *Pseudomonas fluorescens* بودند. ضمناً سویه‌های FP45، FP165، FP159، FP120، FP190 و FP106 از گونه‌های مختلف توانایی بسیار بالایی نسبت به سویه‌های خارجی $7NSK_2$ 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 مایه‌تلقیح PGPR پیشنهاد می‌شوند.

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

مقدمه

1- بترتیب عضو هیات علمی دانشگاه ارومیه، استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک وآب, استاد دانشگاه مازندران، استاد دانشگاه تربیت مدرس و استاد یار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب

* وصول: 84/3/17 و تصویب: 84/12/3

ریزوسفر به لایه نازک یک الی دو میلی‌متری خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که بسته به شکل هـــندسی ریشه گیاهان بخش قابل ملاحظه‌ای (در حدود 5 تا 40 درصد) از خاک موجود در اطراف سیســتم ریشــه‌ای یک گیاه را تشکیل می‌دهد (Boven و Rovira, 1999). میکروارگانیسمهای موجود در این ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای قرار دارند.

(Boven و Rovira, 1999). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)[1] به انواع باکتری‌های مفید مستقر در این ناحیه اطلاق می‌گردد (Kloepper و Schroth, 1978). این باکتری‌هابه 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[2], متابولیت‌های ضد قارچ و آنتی‌بیوتیک‌ها به رشد بهتر گیاه کمک می‌کنند (Cattelan و همکاران، 1999).

باکتری‌های جنس *Pseudomonas* و بلاخص سودوموناس‌های فلورسنت[3] از مهمترین اعضای جامعه باکتری‌های ریزوسفری می‌باشند که مطالعات بسیار زیادی در خصوص صفات PGP[4] 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. fluorescens*، *P. putida*، *P. aeruginosa* و همچنین پاتوژنهای گیاهی نظیر *P. syringae* و *P. cichorii* هستند (Hendricks و همکاران، 2001).

مشخصه عمومی سودوموناسهای فلورسنت تولید پیگمانهایی است که در برابر نور فرابنفش با طول موج کوتاه (254 نانومتر) بویژه در شرایط کمبود آهن خاصیت فلورسانس دارند (Leoni و همکاران، 2002). این پیگمان‌های فلورسنس 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 کمپلس‌شدن با آهن فریک (Fe^{3+}) هستند. میکروارگانیسم‌ها به‌منظور تأمین آهن مورد نیاز خود، در شرایط کمبود آهن (Fe^{3+}< 10μM) سیدروفور ترشح می‌کنند که کمپلکس پایداری ($Kf = 10^{30}$) با آهن(III) نامحلول تشکیل داده و آن را بصورت ترکیب متحرک و قابل دسترس در می‌آورند و از این طریق بطور مؤثری آن را به داخل سلول خود منتقل می‌نمایند (Leoni و همکاران، 2002). غلظت سیدروفورهای باکتریایی در خاک بین 4 تا 300 میکرومول و غلظت انواع قارچی بین 30 تا 240 میکرومول در گرم خاک گزارش شده است (Barton و Hemming، 1993).

سیدروفورهای باکتریایی براساس ساختمان شیمیایی، به چهار دسته تقسیم‌بندی شده‌اند (Barton و Hemming، 1993). دسته اول شامل سیدروفورهای فنل-کاتکولی[5] هستند که از آن جمله می‌توان به انتروباکتین (Enterobactin)، آگروباکتین (Agrobactin)، پیوکلین (Pyochelin) و مایکوباکتین (Mycobactin) اشاره نمود. هیدروکساماتها[6] دسته دیگری از سیدروفورها را تشکیل می‌دهند. سیدروفورهای آئروباکتین (Aerobactin) و شیزوکینن (Schizokinen) که توسط باسیلوس مگاتریوم و سیانوباکترها مانند گونه‌های جنس آنابنا تولید می‌شود و همچنین فری‌اکسامین‌های[7] حلقه‌ای(نوع E و D2) و خطی (A، B، D1، G1 و G2) از این دسته هستند. فری‌اکسامین‌ها عمدتاً توسط اکتینومیست‌ها ترشح می‌شوند (Neilands و Leong، 1986). گروه بعدی، سیدروفورهای نوع کربوکسیلات[8] هستند که مشخص‌ترین نمونه آن ریزوباکتین(Rhizobactin) است که توسط سویه‌های از سینوریزوبیوم ملیلوتی تولید می‌شود. دسته چهارم سیدروفورهای باکتریایی، پیووردین‌ها[9] هستند. این سیدروفورها کروموپپتیدهای محلول در آب و به‌رنگ سبز تا زرد هستند و توسط سودوموناس‌های فلورسنت تولید می‌شوند. نزدیک به 70 نوع پیووردین با ساختمان مختلف شناسایی شده‌است. سودوباکتین (Pseudobactin) نمونه‌ای از سیدروفورهای نوع پیووردین بوده و توسط *Pseudomonas* B10 تولید می‌شود (Barton و Hemming، 1993). تفرق اشعه ایکس و روش‌های اسکپتروسکوپی نشان داده که سودوباکتین از یک هگزاپپتید خطی تشکیل شده‌است (L-Lys-D-threo-β-OH-Asp-L-Ala-D-allo-Thr-L-Ala-D-N^{δ}-

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

5 - Phenol-catecholates
6 - Hydroxamates
7 - Ferrioxamin
8 - Carboxylate
9 - Pyoverdin

OH-Orn) که در آن باقیمانده اورنیتین به داخل حلقهN-هیدروکسی‌پیپریدون[1] متصل شده و باقیمانده لیزین با یک مشتق فلورسنت کوئینولین[2] در ارتباط است. ترکیب آهن‌دار آهن‌دار سودوباکتین بصورت ($C_{42}H_{57}N_{12}O_{16}Fe.13H_2O$) می‌باشد که بخش 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، 1981). در حال حاضر جامع‌ترین روش برای تشخیص تولید سیدروفور، روش CAS (Schwyn و Neilands، 1987) است. اساس این سنجش، رقابت برای آهن بین یک کمپلکس سه‌تایی آهنIII، معرف رنگی (CAS) و HDTMA با یک کلات‌کننده یا سیدروفور میکروبی می‌باشد. سیدروفور با داشتن تمایل‌شدید به ترکیب‌شدن 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، 1999).

توانایی بسیار بالای تولید سیدروفور، توسط سویه‌های مختلفی از سودوموناس‌ها گزارش شده‌است (Buysens و همکاران، 1996؛ Meyer، 2000؛ Hoft و همکاران، 1991؛ Jurkevittch و همکاران، 1988). سودوموناسها بواسطه تولید سیدروفورها و ایجاد رقابت برای سوبستراهای مختلف بویژه آهن، اثر بازدارندگی قابل‌ملاحظه‌ای علیه عوامل بیماری‌زا نظیر قارچ عامل پاخوره[3] غلات (Hoft و همکاران، 1991) و بافت‌مردگی ناشی قارچ پتیوم (Buysens و همکاران، 1996) ازخود نشان داده‌اند. تقریباً تمام باکتری‌های هوازی و قارچ‌ها سیدروفور تولید می‌کنند، لیکن توانایی تولید در گونه‌ها و حتی سویه‌های مختلف داخل هرگونه متفاوت است (Neiland و Leong، 1986). 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. (Crowleyو همکاران، 1991).

گزارش‌های متعددی در مورد امکان جذب کمپلکس سیدروفور-آهن توسط ریشه گیاهان نیز گزارش شده‌است (Crowley و همکاران، 1988؛ Bar-Ness و همکاران، 1991؛ Yehuda و همکاران، 1996؛ Sharma و همکاران، 2003). این موضوع اهمیت سیدروفورها را دوچندان می‌کند، چه آهن در بسیاری از فرآیندها از جمله ذخیره و فعال‌سازی اکسیژن مولکولی، احیای ریبونوکلئوتیدها و نیتروژن مولکولی، فعال‌سازی و تجزیه پراکسیدها و انتقال الکترون توسط طیف وسیعی از ناقلها نقش کلیدی دارد (Katiyar و Goel، 2004). نتایج تحقیقات در مورد انتقال آهن بواسطه سیدروفورها نشان داده که از نظر میزان نیاز به آهن در گیاهان و میکروبها مشابهت وجود دارد و چنین استنباط می‌شود که میکروارگانیسم‌های 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، کارائی بالاتری برای جذب آهن نشان می‌دهند.

برخی ازگیاهان آهن-کارا[4] اعم از انواع متکی به استراتژی I و یا II جذب آهن، می‌توانند از سیدروفورهای میکروبی برای تأمین آهن مورد نیاز خود بهره گیرند، بطوری‌که حتی از این توانایی، بعنوان استراتژی III یاد شده است (Marschner و Romheld ،1994؛ Crowley و همکاران، 1991؛ Jurkevitch و همکاران، 1988). 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،1994) و یا از طریق فرآیند تبادل لیگاندی (Yehuda و همکاران، 1996) 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 (1987) از ریزوسفر جو جداسازی شده‌است. این سویه در شرایط کمبود آهن سه نوع سیدروفور بنامهای اسیدسالسیلیک، پیوکلین و پیووردین تولید نموده (Buysens و همکاران، 1996) و باعث افزایش رشد گیاهانی از خانواده غلات و سبزیجات

10 - N-hydroxy piperidone
11 - Quinoline
1 - Take-all
2 - Fe-efficient

شده‌است. سویه MPFM1 موتانت سیدروفور منفی (sid^-) باکتری 7NSK2 است (Hoft و همکاران، 1991) 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 خوبی برای افزایش رشد و کمک به جذب آهن توسط گیاه برخوردار است (Sharma و همکاران، 2003).

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 201 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 آذربایجانشرقی، آذربایجانغربی، زنجان، همدان، کرمانشاه، فارس، تهران، خراسان، کردستان و یزد جداسازی شده‌اند (رسولی صدقیانی و همکاران، 1383). ارقام گندمی که باکتری‌ها از ریزوسفر آنها تهیه شده بودند شامل شهریار، نوید، الموت، الوند، مرودشت، زرین، قیاسی، فلات، شیراز، آتیلا، مهدوی، سرداری، کراس‌آزادی، طوس، کاسپارو، فلات3، آذر2، سبلان، گاسکوژن، تریتیکاله 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 پروفسور B.N. Johri و سویه‌های 7NSK2 و MPFM1 از طرف پروفسور M. Hoft دریافت شدند.

تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها

برای تهیه سوسپانسیون، یک کلنی از کشت تازه هر جدایه در شرایط استریل به ارلن 100 میلی‌لیتری حاوی 25 میلی‌لیتر محیط کشت مایع KingB تلقیح گردید. این محیط شامل 20گرم پروتئوز پپتون، 1/5 گرم $MgSO_4$، 1/5 گرم KH_2PO_4 و 10 میلی‌لیتر گلیسرول در لیتر بود. ارلن‌ها تا زمان رسیدن به فاز سکون، در دمای28̊C و در 120 دور در دقیقه بر روی دستگاه شیکر انکوباتوردار قرار داده شدند. فاز سکون در گونه‌های مختلف با اندازه‌گیری و کنترل جذب نوری با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج540 نانومتر تعیین گردید. به‌منظور تنظیم تراکم جمعیت میکروبی یکسان در ارلن‌ها، یک آزمایش اولیه با استفاده از جدایه‌های سه گونه مورد نظر بصورت مجزا انجام گرفت، بدین‌ترتیب که در زمانهای مختلف دانسیته نوری در 540 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 S (CAS Blue Agar)

برای تهیه این محیط بر اساس روش اصلاح‌شده Alexander و Zuberer (1991) چهار محلول بطور مجزا تهیه، استریل و سپس باهم مخلوط شدند.

1- محلول معرف Fe-CAS

این محلول از اختلاط 10 میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ یک میلی‌مولار (در محلول 10میلی‌مولار اسیدکلریدریک) با 50 میلی‌لیتر محلول حاوی 60/5 میلی‌گرم CAS (1/21 میلی‌گرم درمیلی‌لیتر) تهیه شد. این مخلوط ارغوانی تیره به‌آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته به 40 میلی‌لیتر آب‌مقطر حاوی 72/8 میلی‌گرم HDTMA (1/82 میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر) اضافه شد. محلول آبی تیره حاصله اتوکلاو و تا 50 درجه سانتی‌گراد سرد شد.

2- محلول بافر

برای تهیه محلول بافر، ۳۰/۲٤ گرم PIPES [1] در ۷۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حل گردید. محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم NaCl و ۱ گرم NH_4Cl بود. pH این محلول با استفاده از محلول ۵۰ درصد KOH در

1 - 1.4-piperazinethanesulfonic acid

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.

3- محلول غذایی

حاوی ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم مانیتول، ۴۹۳ میلی‌گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱۱ میلی‌گرم $CaCl_2$، ۱/۱۷ میلی‌گرم $MnSO_4.H_2O$، ۱/۴ میلی‌گرم H_3BO_3، ۰/۰۴ میلی‌گرم $CuSO_4.5H_2O$، ۱/۲ میلی‌گرم $ZnSO_4.7H_2O$ و ۱ میلی‌گرم $Na_2MoO_4.2H_2O$ در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. این محلول پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد گردید.

4- محلول کازوآمینواسید

برای تهیه این محلول، 3 گرم کازوآمینواسید در 30 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد وسپس بوسلیه کاغذ صافی غشائی با قطر 0/45 میکرون استریل شد.

پس از آماده‌شدن چهار محلول فوق، محلول شماره 3 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[1] در محیط CAS-Agar[2]

پلیت‌های حاوی محیط CAS-آگار پس از انجماد، با تیغ استریل به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند. از سوسپانسیون تازه جدایه‌های موردمطالعه با جمعیت تنظیم‌شده (5×10^8 CFU/ml) به اندازه ۵ میکرولیتر در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری تلقیح شد. همزمان با تلقیح جدایه‌های بومی از سویه‌های PGPRخارجی 7NSK2 و GRP3 بعنوان شاهد مثبت (Sid^+) و از سویه MPFM1 بعنوان شاهد منفی (Sid^-) نیز در همان محیط کشت تلقیح انجام گرفت. پلیت‌های تلقیح‌شده 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 تشکیل‌شده در اطراف کلنی باکتری‌ها و در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ارزیابی گردید. همچنین قطر کلنی باکتری و نسبت قطرهاله به قطر کلنی نیز تعیین شد.

پس از غربال‌گری جدایه‌ها از نظر توانایی تولید سیدروفور، سویه‌های برتر انتخاب‌شده 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 سالکووسکی Salkowski انجام گرفت. برای این منظور از کشت ۷۲ ساعته جدایه‌ها در محیط مایع TSB [3] استفاده شد. بعد از سانتریفیوژ کردن در ۷۱۶۰ دور در دقیقه بمدت ۵ دقیقه، محلول رویی با معرف سالکووسکی (مخلوط ۲ میلی‌لیتر ۰/5 مولار $FeCl_3$ و ۹۸ میلی‌لیتر ۳۵درصد $HClO_4$) 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 این‌منظور از غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان در محیط کشت TSB استفاده گردید. توانایی انحلال فسفات در محیط Sperber (۱۰ گرم گلوکز، ۰/5 گرم عصاره مخمر، ۲۳/0 گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۱۴/0 گرم $CaCl_2$، ۲/5 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 ایجادشده 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) به‌منظور ارزیابی تولید سیدروفور در باکتری‌های ریزوسفری انجام گرفت، نشان داده‌شد 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 خنثی‌نمودن مقدار اضافی

1 - Spot inoculation
2- Universal CAS assay
3 - Tripticase Soy Broth

HDTMA با یک رزین جذب‌کننده، شناسایی افزودنی جایگزین و غیرسمی و استفاده از محیط کشت مناسب باکتری به‌همراه محیط CAS-آگار دریک پلیت اشاره نمود (Milagres و همکاران، ۱۹۹۹). بهرحال در این تحقیق تمام ۲۰۱ جدایه سودوموناس بومی وسویه‌های 7NSK2 و GRP3 سیدروفور تولید نمودند. هاله تشکیل‌شده در بیشتر باکتری‌ها با حاشیه‌ای کاملا واضح بود و در تعدادکمی از جدایه‌ها، حاشیه هاله تشکیل‌شده بصورت پخشیده بود. همچنین رنگ هاله از نارنجی پررنگ تا زرد متغیر بود. سویه MPFM1 که بعنوان Sid^- از آن استفاده شده بود، بر 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 ٦١ درصد بین۲۰-۱۵ میلی‌متر در روز و در ١٤ درصد جدایه‌ها بیش از ۲۰ میلی‌متر در روز بود. در گروه با توان تولید بالای سیدروفور (بیش از ۲۰ میلی‌متر در اولین روز)، ١٦ 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 ٥٦ درصد بیشترین فراوانی را داشت. بطورکلی در مورد هر سه گونه از نظر سرعت تولید سیدروفور در طی ٢٤ 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 بیشترجدایه‌های سه گونه، قطر کلنی کمتر از ۵ میلی متر و نسبت قطر هاله به قطر کلنی بیشتر از ۳ بود. در جدایه‌هایی که از نظر قطر هاله در محدوده بالا قرارداشتند، غالباً قطر کلنی بویژه در زمان‌های اولیه کمتر از ۵ میلی متر 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 ٢٤ 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 می‌شد از نظر تولید سیدروفور نسبت به سویه‌های خارجی $7NSK_2$ و GRP3 برتری نشان دادند.

گسترش قطر هاله می‌تواند بعنوان معیاری از میزان تولید سیدروفور بکار رود (Loper و Henkels، ۱۹۹۹). در شکل‌های ۱ و ۲ اندازه قطرهاله، قطر کلنی و نسبت قطر هاله به قطرکلنی برای جدایه‌های FP159 (از گونه *P. putida*)، FP93 (از گونه *P. fluorescens*) و FP45 (از گونه *P. aeruginosa*) درمقایسه با جدایه‌های خارجی 7NSK2 و GRP3 نشان داده‌شده است. قطر هاله FP93 و FP159، در تمام زمانها نسبت به بقیه جدایه‌ها بطور معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بیشتر بود (شکل۱- الف) و قطر هاله آنها در روز چهارم بترتیب به٦٠/٣ و ٤٥ میلی‌متر رسید. در همین زمان 7NSK2 و GRP3 قطر هاله‌ای به اندازه ٤١ و ۲۸ میلی‌متر داشتند. سویه 7NSK2 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 (شکل۱ - ب). سویه‌های FP93 و GRP3 از توانایی رشد خوبی در محیط CAS - آگار برخوردار بودند.

به‌رغم یکسان‌بودن 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 تشکیل‌شده تأثیر بگذارد. بنابر این نسبت قطر هاله به قطر کلنی می‌تواند بعنوان شاخص دقیق‌تری برای مقایسه توانایی تولید سیدروفور جدایه‌های مختلف بکار رود.

جدول 1- مقایسه تعداد جدایه‌ها از نظر سرعت گسترش هاله در زمان‌های مختلف

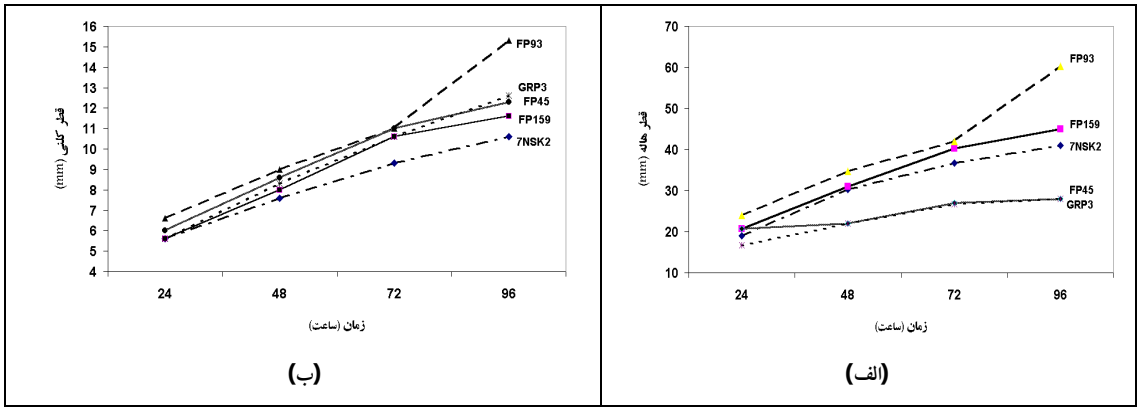
گونه باکتری	Low $Dh < 15\ mmd^{-1}$				Medium $15 < Dh < 20\ mmd^{-1}$				High $Dh > 20\ mmd^{-1}$				تعداد جدایه
	زمان (ساعت)												
	24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96	
P. putida	26	1	-	-	69	15	4	-	11	90	102	106	106
P. fluorescens	23	-	-	-	50	6	1	1	16	83	88	88	89
P. aeruginosa	1	-	-	-	4	1	-	-	1	5	6	6	6
مجموع	50	1	-	-	123	22	5	1	28	178	196	200	201

Dh: سرعت گسترش قطر هاله برحسب میلی‌متر در روز

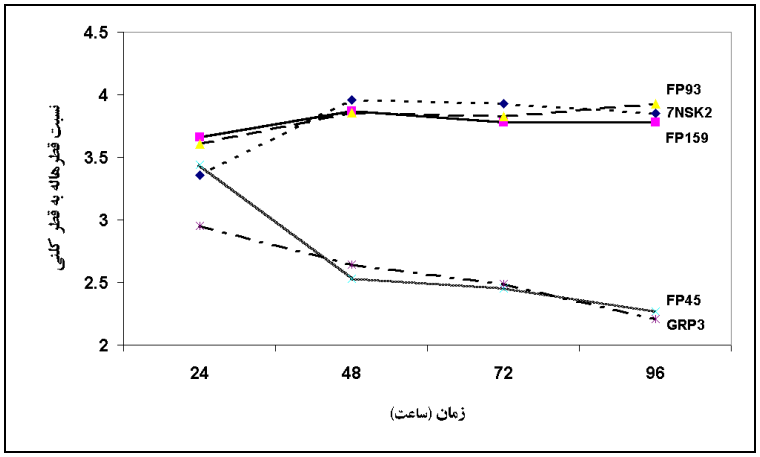
جدول 2- مقایسه تعداد جدایه‌ها از نظر قطر کلنی و نسبت قطر هاله به قطر کلنی در زمان‌های مختلف

Dh/Dc> 3				Dh/Dc < 3				Dc> 5 mm				Dc< 5 mm				
زمان (ساعت)																
96	72	48	24	96	72	48	24	96	72	48	24	96	72	48	24	گونه باکتری
46	67	69	65	60	39	37	41	106	106	105	35	-	-	1	71	*P. putida*
47	64	70	53	42	25	19	36	89	89	88	33	-	-	1	56	*P. fluorescens*
1	1	1	4	5	5	5	2	6	6	6	3	-	-	-	3	*P. aeruginosa*
94	132	140	122	107	69	61	79	201	201	199	71	-	-	2	130	مجموع

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



شکل 1- مقایسه قطر هاله و قطر کلنی جدایه‌های برتر تولیدکننده سیدروفور



شکل 2- نسبت قطر هاله به قطر کلنی جدایه‌های برتر تولیدکننده سیدروفور

جدول 3- توانایی تولید اکسین و انحلال فسفات معدنی جدایه‌های برتر تولیدکننده سیدروفور

توانایی انحلال فسفات	میزان اکسین تولید شده (mg/l) +Trp	-Trp	جدایه
-	n.d	n.d	7NSK2
+	n.d	n.d	GRP3
-	17/18	16/55	PF45
+	66/98	67/44	PF159
+	2/19	2/13	PF93

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

نسبت قطر هاله به قطر کلنی در جدایه‌های مورد بررسی از ۲/۲۱ تا ۳/۹۶ متغیر بود. در مورد جدایه‌های FP93، FP159 و 7NSK2، این نسبت تا ٤٨ 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. بعبارت 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 7NSK2 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 (7NSK2 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 سالکووسکی باکتری‌های PGPR را از نظر تولید اکسین غربال نمودند و ضمن تلقیح بذرگیاه کلم با جدایه‌های برتر، افزایش معنی‌داری در ارتفاع گیاه، قطرساقه، تعداد شاخه‌های فرعی و تعداد غلاف در بوته شدند. در تحقیق حاضر افزودن Trp به محیط رشد باکتری‌ها تأثیر کمی در افزایش تولید اکسین داشت.

از نظر توانایی انحلال فسفات‌های نامحلول، جدایه‌های PF159 و FP93 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)[1] 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[2] سبب کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی خاکزاد می‌شوند، بطوریکه Iswandi و همکاران (۱۹۸۷) نشان دادند اثر بازدارندگی ناشی از تولید سیدروفور توسط سویه سودوموناس $7NSK_2$، 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 7NSK2 توسط Hoft و همکاران (۱۹۹۱) گزارش شده است. بهرحال نتایج تحقیق حاضر نشان داد که سویه 7NSK2 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 7NSK2 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.

1 - Phosphate solubilizing bacteria
2 - Induced systemic resistance (ISR)

فهرست منابع:

1. رسولی صدقیانی، م. ح.، ح. رحیمیان، ک. خاوازی، م. ج. ملکوتی و ه. اسدی رحمانی.1384. بررسی تراکم جمعیت، جداسازی و شناسایی سودوموناس‌های فلورسنت از ریزوسفر گندم مناطق مختلف ایران. مجله علوم خاک و آب. جلد 19 شماره 2: 224-234.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 pyoverdin in suppresion of *Pythium*-induced damping –off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK$_2$. 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. 2ndEd. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
13. Hofte, M., K. Y. Seong, E. Jurkevitch, and W. Verstraete. 1991. Pyoverdin production by the plant growth beneficial *Pseudomonas* strain 7SNK$_2$: 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$_2$ 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. Kozlowksi, 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. Napoleao. 1999. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modificaction 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_3 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.