J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 43, pp. 20-30, 2008

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۴۳، صفحات ۳۰-۲۰، ۱۳۸۷

نقش سیدروفور سودوموناسهای فلورسنت در جذب روی توسط گندم با استفاده از ایزوتوپ ^{65}Zn

میرحسن رسولی‌صدقیانی[۱]، محمدجعفر ملکوتی*[۲]، کاظم خاوازی[۳]، محمد قنادی‌مراغه[۴]
۱- گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: ۱۶۵، ارومیه-ایران
۲- گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، صندوق پستی: ۳۳۶-۱۴۱۱۵، تهران-ایران
۳- بخش تحقیقات بیولوژی خاک، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، صندوق پستی: ۶۱۸۵-۱۴۱۵۵، تهران-ایران
۴- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۸۳۶-۱۴۳۹۵، تهران-ایران

چکیده: این تحقیق به منظور بررسی پتانسیل سیدروفور سویه‌های بومی سودوموناس‌های فلورسنت در جذب روی نشاندار (^{65}Zn) در سال ۱۳۸۴ انجام گرفته است. برای این منظور ۲۰۱ جدایه از گونه‌های Pseudomonas putida، P. fluorescens و P. aeruginosa از مزارع گندم مناطق مختلف ایران جداسازی شدند. توان تولید سیدروفور سویه‌ها با استفاده از محیط جامد حاوی کرم آزورل اس (CAS-agar) مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور استخراج سیدروفور، سویه‌های برتر تولید کننده سیدروفور از هر گونه انتخاب و در محیط استاندارد سوکسینات (SSM) به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸°C رشد داده شدند. سپس باکتری‌ها با سانتریفوژ ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه، ته‌نشین شدند و محلول رویی پس از صاف شدن با صافی غشائی ۰/۲۲ میکرومتر، به عنوان منبع سیدروفور در آزمایش‌ها استفاده شد. ارزیابی جذب و انتقال روی با استفاده از کمپلکس سیدروفور باکتری‌ها با ^{65}Zn(Zn-siderophore) بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و در مقایسه با سیدروفور استاندارد دسفرواکسامین (DFOB) انجام گرفت. این آزمایش در شرایط هیدروپونیک بر روی دو رقم گندم (Triticum aestivum L.) کارا از نظر تولید فیتوسیدروفورها (طبسی) و غیرکارا (یاواروس) در آزمایشگاه بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب انجام گرفت. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که در میان سیدروفور گونه‌های مورد مطالعه، کمپلکس سیدروفور P. putida بالاترین پتانسیل را در قابلیت جذب ^{65}Zn برای گندم داشت و حتی با میزان جذب شده این عنصر توسط سیدروفور استاندارد برابری می‌کرد. میزان جذب ^{65}Zn توسط گیاه ازکمپلکس این گونه در مقایسه با سیدروفور استاندارد (DFOB)، به ۸۳ درصد رسید. اثر اصلی باکتری (نوع سیدروفور) در مقدار جذب روی نشان‌دار معنی‌دار بود که ممکن است ناشی از وجود اختلاف در ساختار شیمیایی سیدروفورها باشد. مقدار روی انتقال‌یافته به اندامهای هوایی هر دو رقم گندم از کمپلکس سیدروفور P. putida با ^{65}Zn بیشتر از کمپلکس سیدروفور دو گونه دیگر سودوموناس بود. همچنین نتایج نشان داد که مقدار ^{65}Zn بیشتری در ریشه رقم یاواروس نسبت به رقم طبسی تجمع یافته و درصد کمی از آن به اندامهای هوایی انتقال یافت. توان کمپلکس سیدروفور سویه‌ها در تأمین Zn برای گندم به صورت Sid-DFOB> Sid-P. putida> Sid-P. fluorescens> Sid-P. aeruginosa کاهش یافت. با عنایت به توانمندی P. putida در تولید کمپلکس سیدروفور- Zn با بیشترین قابلیت جذب برای گندم، این گونه را می‌توان گونه تولید کننده زینکوفور (Zincophore) نیز نامگذاری نمود.

واژه‌های کلیدی: ***باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه، سودوموناس‌های فلورسنت، ^{65}Zn، سیدروفور، زینکوفور***

The Role of Fluorescent Pseudomonad's Siderophore on Zn Absorption in Wheat by Using ^{65}Zn

M.H. Rasouli Sadaghiani[1], M.J. Malakouti[*2], K. Khavazi[3], M. Ghannadi Maragheh[4]
1- Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Urmia University, P.O. Box: 165, Urmia-Iran
2- Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, P.O. Box: 14115-336, Tehran-Iran
3- Soil Biology Department, Soil and Water Research Institute, P.O. Box: 14155-6185, Tehran-Iran
4- Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O. Box: 14395-836, Tehran-Iran

Abstract: The objective of this investigation was to determine the potentials of some indigenous fluorescent Pseudomonads for siderophore production and their effects on ^{65}Zn absorption in 2005. For this purpose, 201 strains of Pseudomonas putida, P. fluorescens, and P. aeruginosa were isolated from different locations representing rhizosphere of wheat (Triticum aestivum L.). The potentials of these strains for siderophore production were evaluated by chrome azorel-S assay (CAS blue agar) through color change. High siderophore producing super-strains were selected for the extraction of siderophores. These isolates were grown in SSM (standard succinate medium) for 72 hrs at 28°C. The bacterial cells

*email: mjmalakouti@modares.ac.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۸۵/۹/۲۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۱۴

were removed by centrifugation (10000 g for 20 minutes) and the supernatant was filtered through filter membrane (0.22 μ) and used as the source of siderophore source. The evaluations of Zn uptake and translocation were carried out with the complexes of bacterial siderophores and ^{65}Zn compared with the standard siderophore Desferrioxamine in a randomized complete block design with three replications. This experiment was conducted on two wheat genotypes different in Zn-efficiency under hydroponic condition. The results revealed that among the three most effective siderophores producing strains considered, the P. putida produced a siderophore complex that showed efficiencies of 83% compared with the standard siderophore (DFOB) in the uptake of Zn and was statistically in the same group as the control. The effect of bacterial siderophores in the uptake of labeled ^{65}Zn by wheat was significant, indicating that the chemical structures of the siderophores from different strains were different. The effects of wheat variety on ^{65}Zn translocation to shoots was also significant, where the efficient Tabasi variety contained 46% more Zn in shoots than the inefficient Yavarous variety. It was concluded that the siderophore complex from P. putida was the most effective in translocation Zn to shoots, particularly in efficient Tabasi genotype. Siderophore effectiveness in Zn availability decreased in the order of Sid-DFOB> Sid-P. putida>Sid-P. fluorescens> Sid-P. aeruginosa. Due to the availability of P. putida in absorbing Zn, the siderophores of this group of bacteria can be named as zincophore.

Keywords: ***Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR), Fluorescent Pseudomonads, ^{65}Zn, Siderophore and Zincophore***

۱- مقدمه

کمبود عناصر کم مصرف در اراضی زیرکشت غلات گسترش جهانی داشته و میلیون‌ها هکتار از اراضی قابل کشت در جهان دارای کمبود یک یا چند عنصر غذایی کم مصرف هستند. فائو در گزارش جامعی اعلام کرده است که بیش از ۳۰ درصد خاک‌های این مناطق به نوعی دچار کمبود یکی از عناصر کم مصرف می‌باشند [۱ تا ۵]. همچنین نشان داده شده است که ۴۰ درصد خاک‌های مورد آزمایش در ۱۹ کشور جهان از نظر مقدار Zn دچار محدودیت می‌باشند. کمبود Zn، در غلات شایع‌ترین کمبود در بین عناصر کم مصرف است. علت اصلی این موضوع آهکی‌بودن خاکها می‌باشد که بیش از ۳۹٪ خاک‌های جهان را شامل می‌شود [۶، ۷ و ۸].

طبق ارزیابی‌های جهانی، حدود ۵۰ درصد اراضی تحت کشت گندم دچار کمبود Zn می‌باشند. در ایران نیز به دلیل آهکی بودن خاکها و pH بالای آنها، کمی مواد آلی و بی‌کربناته بودن آبهای آبیاری، کمبود Zn گسترش زیادی دارد و طبق بررسی‌های انجام شده بیش از ۴۰ درصد از مزارع زیر کشت گندم آبی ایران دچار کمبود شدید Zn می‌باشند. خاکهایی که روی قابل دسترس یا روی قابل استخراج آنها با DTPA کمتر از ۰/۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک باشد، به عنوان خاکهای دارای کمبود شدید Zn شناخته می‌شوند [۳، ۶، ۷ و ۹].

به عقیده ملکوتی و طهرانی (۱۳۸۴) و ملکوتی و همکاران (۲۰۰۶)، میزان کمبود Zn در خاکهای ایران، به ویژه اگر غنی‌سازی محصولات نیز مدنظر باشد، بیشتر از ۸۰ درصد است [۵ و ۱۰]. در گیاهان مبتلا به کمبود Zn، برخی از وظایف و فرایندهای سلولی آسیب می‌بینند که منجر به کاهش شدید رشد و عملکرد گیاه می‌شود. اثرهای نامطلوب کمبود روی، بیشتر در بافتهای مریستمی در حال تقسیم اتفاق می‌افتد در این بافتها برای حفظ و تداوم سنتز پروتئین‌ها، نیاز بسیاری به Zn وجود دارد [۱۱ و ۱۲].

پایین بودن غلظت Zn در اراضی زیرکشت غلات، نه تنها موجب کاهش عملکرد می‌شود، بلکه باعث افت کیفیت و ارزش غذایی گندم‌های تولید شده نیز می‌گردد و بدین ترتیب یک ناهنجاری پنهان تغذیه‌ای به جامعه تحمیل می‌شود. حدود ۴۰ درصد مردم جهان از کمبود عناصر ریزمغذی از جمله Zn و Fe رنج می‌برند. مصرف زیاد غذاهای دارای منشاء غلات، به عنوان عامل مهمی برای رفع کمبود Zn در انسان گزارش شده است. مصرف گندم، ذرت و برنج در کشورهای در حال توسعه بطور متوسط حدود ۹۰٪ رژیم غذایی آنها را تشکیل می‌دهد. در ایران و ترکیه نیز به دلیل مصرف بالای غذاهای غله‌ای، کمبود Zn در بین مردم این کشورها شایع است [۵ و ۱۲].

قابلیت دسترسی به عناصر غذایی برای گیاهان تحت تأثیر نوع خاک، شرایط آب و هوایی، گونه و ارقام گیاهی است. انتظار می‌رود که برخی میکروارگانیسم‌های خاکزی به دلیل توانایی در تولید سیدروفور، بتوانند گیاهان را در جذب عناصر غذایی از

جمله Fe و Zn یاری نمایند. بنابراین ممکن است بتوان با شناسایی سویه‌های مولد سیدروفور کارا، تغذیه گیاهان را بهبود بخشید. سیدروفورها ترکیبهای آلی با وزن مولکولی کم هستند که میل ترکیبی زیادی با عناصر بویژه Fe^{3+} و سایر یونهای فلزی دارند و باعث افزایش قابلیت تحرک و دسترسی به آنها می‌شوند [۱۳ تا ۱۶].

توانایی تولید سیدروفور در تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های هوازی و قارچها در شرایط کمبود آهن گزارش شده است. سیدروفورهای نوع پیووردین، کروموپپتیدهای محلول در آب به رنگهای سبز-زرد هستند که توسط سودوموناس‌های فلورسنت تولید می‌شوند [۱۷]. در تمام این سیدروفورها، کروموفور با منشا ۲ و ۳-دی‌آمینو ۶ و ۷-دی‌هیدروکسی کوئینولینولین مشابه است. سه گروه جفت دندانه‌ای کلات کننده Fe^{3+}، شامل گروه کاتکولی کروموفور، گروه هیدروکسامات N-هیدروکسی اورنی‌تین و یک α-هیدروکسی اسید مربوط به هیدروکسی آسپارتیک اسید یا یک گروه دیگر هیدروکسامات N- هیدروکسی اورنی‌نین هستند. زنجیره پپتیدی در سیدروفور سویه‌های مختلف سودوموناس‌های فلورسنت از نظر تعداد و ترکیب اسیدهای آمینه متفاوت است [۱۸].

بیشتر مطالعات محققین در رابطه با نقش سیدروفورها در جذب و انتقال آهن (^{56}Fe) انجام گرفته است. نتایج ارزیابی جمعیت میکروبی گونه‌های مختلف گیاهی از برتری تعداد سودوموناس‌های فلورسنت در اطراف ریشه، گیاهان حکایت دارد. درون این جامعه میکروبی، گونه‌های متنوعی از نظر توان تولید مقادیر مختلف سیدروفور یافت شده است. سیدروفورهای میکروبی اغلب به عنوان منبع آهن برای گیاهان بکار می‌روند [۱۶]. نتایج آزمایش‌های جذب Fe از سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌های سودوموناس در پنبه و بادام زمینی نشان داده که افزودن منابع آهن- سیدروفور (P. putida) به خاک در تأمین Fe برای این گیاهان مؤثر بوده است. Cline و همکاران (۱۹۸۴) با استفاده از سیدروفور فری‌اکسامین ب (FOB) در گیاه آفتابگردان بر علائم کلروز غلبه کردند، ولی سورگوم علایم کمبود Fe را نشان داد [۱۹]. Romheld و Marschner (۱۹۹۰) نیز نتایج مشابهی را ارائه و نشان دادند که غلظت کلروفیل در برگ‌های بادام زمینی نسبت به ذرت به هنگام استفاده از FOB بالاتر بود. به نظر می‌رسد گیاهان استراتژی I (گیاهان دولپه‌ای و تک‌لپه‌ایهای غیرگرامینه)، کارآیی بیشتری در استفاده از سیدروفورها داشته باشند [۲۰].

Walter و همکاران (۱۹۹۴b) با استفاده از منابع ایزوتوپی، ضمن مطالعه تغذیه آهن بوسیله سیدروفور P. putida در خیار و ذرت، نشان دادند که کمپلکس ^{59}Fe-pyoverdine منبع آهن نسبتاً ضعیفی برای هر دو گیاه بود و آهن را برای خیار در حدود ۴۰ برابر کمتر از ^{59}Fe-EDTA و در مورد ذرت ۶۶۵ بار کمتر از ^{59}Fe-phytosiderophore تأمین نمود. در گیاه خیار مقادیر پایین جذب ^{59}Fe-pyoverdine با مقدار احیای بسیار کم آن ارتباط نزدیکی داشت. نتایج بر این نکته تأکید داشت که تغذیه Fe بطور غیرمستقیم تحت تأثیر سیدروفور P. putida قرار گرفت و سیدروفورها از طریق بهبود تحرک و جابجایی آهن باعث افزایش انتقال آن به سطح ریشه شدند [۲۱]. در گیاهان، تولید فیتوسیدروفورها به عنوان پاسخ به کمبود Fe و Zn، تنها در گروهی از تک‌لپه‌ایها بنام خانواده گرامینه مشاهده شده است. در این خانواده تعدادی از گیاهان زراعی استراتژیک شامل گندم، جو، برنج و ذرت قرار دارند [۲۲]. فیتوسیدروفورها، لیگاندهای شیمیایی با وزن مولکولی کم هستند که کمپلکس‌های پایداری با Fe^{3+} و برخی عناصر دیگر نظیر Zn^{2+}، Cu^{2+} و Mn^{2+} تشکیل می‌دهند. این ترکیبات آمینوکربوکسیلاتی شش دندانه‌ای در جذب این عناصر به ویژه Fe و Zn نقش مؤثری دارند. بررسی نقش سیدروفور تولید شده توسط قارچ Penicillium chrysogenum در تأمین آهن برای گیاهان استراتژی I (خیار) و II (ذرت) نشان داد که سیدروفور قارچی بطور معنی‌داری وضعیت Fe این گیاهان را بهبود بخشید [۲۱ و ۲۲].

در رابطه با نقش سیدروفورها در جذب روی، اطلاعات بسیار کمتری وجود دارد؛ فقط در چند مورد ثابت پایداری Zn با سیدروفورها و نقش روی در تولید سیدروفورها ارزیابی شده است. روی یکی از عناصر ریزمغذی است و تحقیقات نشان داده که در اطراف ریشه گیاهان خاک‌های غنی از ریزمغذی‌ها که ترشحات ریشه‌ای و مواد آلی فراوانی یافت می‌شود، غلظت سیدروفورها بالا است [۲۳]. در میان این عناصر غذایی، Zn بیشترین تأثیر را در ترشح سیدروفورها دارد. در تحقیقی توسط Sharma و Johri (۲۰۰۳) نشان داده شد که تولید سیدروفور به

وسیله سودوموناس‌های فلورسنت با حضور Zn (۷۶/۹۴ mg/l) و Cu (۶۸/۸۰ mg/l) افزایش یافت، لیکن Co و Fe^{3+} (۳۷/۴۴ mg/l) در مقایسه با شرایط کنترل (۵۵/۹۷ mg/l)، سبب کاهش تولید سیدروفور شدند [۲۴]. ممکن است سیدروفورها با تشکیل دادن کمپلکس‌های پایدار با Zn در جذب آن توسط گیاهان مؤثر باشند. لذا با عنایت به ضرورت استفاده از پتانسیل بیولوژیک خاک‌های کشور، این تحقیق به منظور مطالعه نقش سیدروفور گونه‌های مختلف سودوموناس در افزایش قابلیت جذب روی در گندم با استفاده از ایزوتوپ ^{65}Zn انجام گرفت.

۲- روش کار

۲-۱ جداسازی سویه‌های سودوموناس

به منظور جداسازی و ارزیابی جمعیت باکتری‌های سودوموناس، تعداد ۵۲ نمونه مرکب از خاک اطراف ریشه در مرحله پنجه‌دهی گندم از مزارع استان‌های آذربایجان‌شرقی، آذربایجان‌غربی، زنجان، همدان، کرمانشاه، فارس، تهران، خراسان، کردستان و یزد تهیه گردید. نمونه‌ها قبل و بعد از انتقال به آزمایشگاه، در دمای ۴°C نگهداری و بلافاصله مراحل جداسازی انجام شد. ارقام گندم نمونه‌های موردنظر شامل شهریار، نوید، الموت، الوند، مرودشت، زرین، قیاسی، فلات، شیراز، آتیلا، مهدوی، سرداری، کراس‌آزادی، طوس، کاسپارو، فلات ۳، آذر ۲، سبلان، گاسکوژن، تریتیکاله و چند رقم محلی آذربایجان بودند. تعیین جمعیت باکتری‌های سودوموناس با استفاده از روش شمارش کلنی انجام شد. برای تهیه رقت‌های ده‌تایی از محلول بافر فسفات (PBS) با pH= ۷/۲ و برای شمارش باکتری از محیط کشت KingB استفاده گردید. پس از ۲۴ الی ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۸°C، پلیت‌ها با استفاده از لامپ UV از نظر وجود کلونی‌های با خاصیت پرتو افشان (فلورسنس) بررسی و کلونی‌های موردنظر شمارش شدند. پس از تخمین جمعیت باکتری‌های سودوموناس، جدایه‌های موردنظر با استفاده از همان محیط کشت خالص‌سازی شدند. آنگاه به منظور اطمینان بیشتر، جدایه‌های مذکور از نظر شکل ظاهری، تحرک در محیط نیمه جامد و آزمون گرام مورد بررسی قرار گرفتند [۲۵]. بدین‌ترتیب تعداد ۲۰۱ جدایه انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی روی محیط کشت شیبدار KingB، همچنین آب مقطر استریل در دمای ۴°C نگهداری شدند. در مرحله بعد جدایه‌ها بر طبق با آزمونهای استاندارد Bergey تا سطح گونه شناسایی و گونه‌های مربوط به Pseudomonas fluorescens، Pseudomonas putida و Pseudomonas aeruginosa شناسایی شدند. همزمان با ارزیابی جدایه‌های بومی، دو سویه PGPR خارجی شامل سویه P. sp. GRP3 و سویه P. sp. 7NSK2 بعنوان شاهد مثبت تولید کننده سیدروفور (sid^+) و سویه P. sp. MPFM1 (موتانت sid^- سویه 7NSK2) بعنوان شاهد منفی برای مقایسه جدایه‌های بومی در آزمون‌ها گنجانده شدند. سویه GRP3 اهدایی پروفسور B.N.Johri از دانشگاه کشاورزی PUSA هندوستان و سویه‌های 7NSK2 و MPFM1 اهدایی پروفسور M. Hoft از دانشگاه Gent بلژیک بودند.

۲-۲ تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها

برای تهیه سوسپانسیون، یک کلنی از کشت تازه هر جدایه در شرایط سترون به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت مایع KingB تلقیح گردید. این محیط شامل ۲۰ گرم پروتئوز پپتون، ۱/۵ گرم $MgSO_4$، ۱/۵ گرم KH_2PO_4 و ۱۰ میلی‌لیتر گلیسرول در لیتر بود. ارلن‌ها تا زمان رسیدن رشد باکتری به فاز ساکن، در دمای ۲۸°C و در ۱۲۰ دور در دقیقه بر روی دستگاه بهمزن انکوباتوردار قرار داده شدند. فاز ساکن 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 موردنظر بصورت مجزا انجام گرفت. بدین‌ترتیب که در زمانهای مختلف چگالی نوری در ۵۴۰ نانومتر و تعداد باکتری‌ها به روش شمارش کلنی تعیین شدند. سپس منحنی رشد باکتری در زمانهای مختلف برای گونه‌های موردنظر رسم و از این منحنی برای تعیین زمان رسیدن رشد جدایه‌ها به فاز سکون استفاده شد. همچنین از روی نمودار جمعیت باکتری‌ها در چگالی مختلف نوری، تعداد سلولهای باکتری 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 شد.

۲-۳ تهیه محیط کرم آزورل S-آگار (CAS Blue Agar)

به منظور بررسی توان تولید سیدروفور به وسیله جدایه‌ها، از تلقیح سوسپانسیون تنظیم شده باکتریها با جمعیت یکسان در محیط CAS-آگار استفاده شد. برای تهیه این محیط بر اساس روش اصلاح شده Alexander و Zuberer (۱۹۹۱) چهار محلول جداگانه تهیه، استریل و سپس با هم مخلوط شدند [۲۶].

۲-۳-۱ محلول معرف Fe-CAS

این محلول از اختلاط ۱۰ میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ یک میلی‌مولار (در محلول ۱۰ میلی‌متولار اسیدکلریدریک) با ۵۰ میلی‌لیتر محلول حاوی ۶۰/۵ میلی‌گرم CAS (۱/۲۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. این مخلوط ارغوانی تیره رنگ به آرامی 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 حاصل در اتوکلاو سترون و تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

۲-۳-۲ محلول بافر

برای تهیه محلول بافر، ۳۰/۲۴ گرم PIPES در ۷۵۰ میلی‌لیتر محلول نمکی حل شد. 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 ۶/۸ تنظیم گردید، سپس حجم نهایی آن به ۸۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مخلوط حاصل پس از افزودن ۱۵ گرم آگاردر اتوکلاو سترون و تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

۲-۳-۳ 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 $MoO_4.2H_2O$ در ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر بود. این محلول پس از اتوکلاو تا دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد.

۲-۳-۴ محلول کازوآمینواسید

برای تهیه این محلول، ۳ گرم کازوآمینواسید در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد، سپس با کاغذ صافی غشایی با قطر ۰/۴۵ میکرون سترون شد.

پس از آماده شدن چهار محلول نامبرده، محلول غذایی به محلول بافر و محلول کازوآمینواسید اضافه شد. سپس با بهم‌زدن آرام بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-CAS به آنها اضافه و به مقدار ۲۵ میلی لیتر در پلیت‌ها پخش گردید.

۲-۴ ارزیابی توان تولید سیدروفور جدایه‌ها با روش تلقیح قطره‌گذاری در محیط CAS-Agar

در این تحقیق ۲۰۱ جدایه، شامل گونه‌های P. fluorescens، P. putida و P. aeruginosa از لحاظ توانایی تولید سیدروفور مورد ارزیابی قرار گرفتند. پلیت‌های حاوی محیط CAS-آگار پس از انجماد، با تیغ سترون شده به چهار قسمت مساوی تقسیم شدند. از سوسپانسیون تازه جدایه‌های مورد مطالعه (۲۰۱ باکتری جدا شده) با جمعیت تنظیم شده (5×10^8 CFU/ml) به اندازه ۵ میکرولیتر در وسط هر قسمت با روش قطره‌گذاری تلقیح شد. پلیت‌های تلقیح شده در دمای ۲۸°C 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.

۲-۵ مطالعه نقش سیدروفور گونه‌های مختلف Pseudomonas در جذب روی با استفاده از ایزوتوپ نشان‌دار ^{65}Zn

در این آزمایش از هر یک از گونه‌های سودوموناس، یک جدایه نماینده با توان بالای تولید سیدروفور انتخاب و از کمپلکس سیدروفور این ۳ جدایه با ^{65}Zn استفاده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- سویه‌های مورد استفاده برای استخراج سیدروفور و تشکیل کمپلکس ^{65}Zn-siderophore.

شماره سویه	گونه باکتری	سرعت تولید سیدروفور	محل جداسازی
FP73	P. fluorescens	۲۱ mm/day	آذربایجان‌غربی ـ سلماس
FP159	P. putida	۲۱ mm/day	خراسان ـ فریمان
FP35	P. aeruginosa	۱۸ mm/day	کرمانشاه ـ سراب نیلوفر

آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و در مقایسه با سیدروفور خالص دسفرواکسامین (DFOB, Sigma Co.) در آزمایشگاههای مؤسسه تحقیقات خاک و آب و بخش رادیوایزوتوپ سازمان انرژی اتمی ایران انجام گرفت.

۲-۵-۱ استخراج سیدروفور باکتری‌ها

برای استخراج سیدروفور از روش Meyer و Abdallah (۱۹۷۸) استفاده گردید [۱۷]. بدین منظور ابتدا باکتری‌ها در محیط SSM (Standard Succinate Medium) به مدت ۷۲ ساعت در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت در بهمزن- انکوباتور با دمای ۲۸^oC رشد داده شدند. محیط SSM شامل ۳ گرم KH_2PO_4، ۶ گرم K_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4$، ۱ گرم $(NH_4)_2SO_4$ و ۴ گرم Succinic acid در هر لیتر و pH آن روی ۷ تنظیم گردید. سپس به منظور جداسازی باکتری‌ها از محیط کشت، محیط فوق به مدت ۲۰ دقیقه با استفاده از سانتریفوژ (Sigma; C-13) با دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه و دمای ۲۸^oC سانتریفوژ شد. به منظور اطمینان بیشتر از عدم وجود باکتری در محلول رویی، این محلول از صافی ۰/۲۲ میکرومتر عبور داده شد. بدین ترتیب محلول بدون باکتری حاصل به عنوان منبع سیدروفور در آزمایش استفاده شد.

۲-۵-۲ کاشت گندم در محیط هیدروپونیک

در این آزمایش از دو رقم گندم، رقم طبسی به عنوان رقم کارا در تولید فیتوسیدروفور (Efficient) و رقم یاواروس به عنوان رقم غیرکارا (Inefficient) استفاده شد [۱۵]. مراحل رشد اولیه بذرهای گندم در شن سترون شده انجام گرفت و با محلول اشباع سولفات کلسیم آبیاری شدند. سپس در روز ششم به محیط هیدروپونیک با تهویه پیوسته منتقل گردیدند. در این آزمایش از محلول غذایی بدون روی Tolay و همکاران (۲۰۰۱) استفاده گردید [۲۷]. محلول غذایی کامل (Zn+)، شامل $Ca(NO_3)_2$ (۲/۰۰ میلی‌مولار)، KH_2PO_4 (۰/۲۵ میلی‌مولار)، KCl (۰/۱۰ میلی‌مولار)، K_2SO_4 (۰/۸۸ میلی‌مولار)، $MgSO_4$ (۱/۰۰ میلی‌مولار)، H_3BO_3 (۱/۰۰ میکرومولار)، $CuSO_4$ (۰/۲۰ میکرومولار)، $(NH_4)_6MoO_{24}$ (۰/۲۰ میکرومولار)، $ZnSO_4$ (۱/۰۰ میکرومولار) و Fe-EDTA (۱۰۰ میکرومولار) بود و pH آن در ۵/۶ تنظیم شد. در محلول غذایی با محدودیت روی (Zn-) نیز تمام عناصر غذایی به استثنای Zn حضور داشتند، pH آن در ۷/۱ تنظیم شد. محلول‌های غذایی در مراحل اولیه رشد هر هفته و در مراحل آخر دوره رشد هر سه روز تعویض شدند. بوته‌های گندم در اتاقک کشت در دسته‌های ۱۵ تایی به مدت ۱۲ روز در محیط هیدروپونیک با تهویه پیوسته رشد داده شدند. طول دوره شب و روز به ترتیب ۸ و ۱۶ ساعت بود.

۲-۵-۳ نحوه تشکیل کمپلکس سیدروفور-^{65}Zn

تشکیل کمپلکس ^{65}Zn با سیدروفورها در ۸۵ میلی‌لیتر محلول غذایی بدون عناصر میکرو و با حضور ۱۰ میلی‌مولار بافر MES و pH ۵/۶ انجام گرفت. عنصر رادیوآکتیو ^{65}Zn از منبع ^{65}ZnO و با فعالیت ویژه $۱/۲۸\times۱۰^{۸}Bq\ mol^{-1}Zn$ استفاده شد. منبع اکسید روی نشان‌دار ابتدا در اسید کلریدریک غلیظ حل شده و بصورت $^{65}ZnCl_2$ در غلظت ۱ میکرومول به محلول غذایی افزوده شد. پس از افزودن ۱۵ میلی‌لیتر محلول سیدروفوری و عنصر رادیوآکتیو، محلول حاصل (۱۰۰ میلی‌لیتر محلول غذایی بدون عناصر میکرو و حاوی سیدروفور و ^{65}Zn) به مدت ۱۶ ساعت در بهمزن با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه بهم زده شد. در محلول غذایی غلظت سیدروفورها ۱۰ درصد بیشتر از غلظت Zn بود.

۲-۵-۴ اندازه‌گیری جذب و کمپلکس سیدروفور- ^{65}Zn توسط گندم

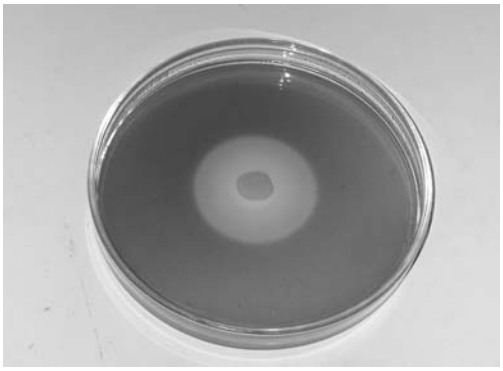
جذب و انتقال ^{65}Zn از طریق سیدروفور سودوموناس‌ها و همچنین سیدروفور استاندارد DFOB با انتقال سیستم ریشه‌ای گندم‌های کشت شده در محیط هیدروپونیک به محلولهای غذایی بررسی گردید. گندم‌ها در دسته‌های ۸ تایی در ظروف شیشه‌ای (۵۰۰ میلی‌لیتری) اسید شویی‌شده حاوی ۱۰۰میلی‌لیتر محلول غذایی و کمپلکس ^{65}Zn-siderophore قرار داده شدند. پس از ۶ ساعت، گیاهان چندین بار به ترتیب با آب مقطر سترون شده، محلول ۱۰۰ میکرومول Na_2EDTA و مجدداً با آب مقطر شسته شدند [۲۸]. هر گیاه به قسمت‌های ریشه و اندام هوایی تفکیک و توزین شد. اندامهای هوایی و ریشه بطور مجزا در داخل پلاستیکها قرار داده شد و شمارش ^{65}Zn در کل اندامها با روش اسپکترومتری گاما با آشکارساز ژرمانیوم با توان تفکیک بالا (High Resolution Germanium Spectrometry: HRGS) انجام گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱ ارزیابی تولید سیدروفور در محیط CAS-آگار

از کل ۵۲ نمونه خاک اطراف ریشه ارقام مختلف گندم در مناطق یاد شده، ۲۰۱ جدایه منتسب به گروه سودوموناس‌های فلورسنت جداسازی گردیدند. سویه‌های جدا شده در برابر اشعه UV، خاصیت پرتو افشانی (فلورسانس) از خود نشان داده و به رنگ‌های سبز، آبی و زرد و با شدت‌های مختلف پرتو افشانی مشاهده گردیدند. در حال حاضر عمومی‌ترین روش برای تشخیص تولید سیدروفور، استفاده از محیط کروم آزورل S(CAS) می‌باشد که توسط Schwyn و Neilands (۱۹۸۷) ارائه شده است [۲۹]. اساس این سنجش، رقابت برای پیوند با 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 [۳۰].

طبق گزارش Schwyn و Neilands (۱۹۸۷) ماده HDTMA موجود در ساختار کمپلکس سه‌تایی برای برخی از باکتری‌ها به ویژه باکتری‌های گرم مثبت و قارچها، سمی است و خاصیت بازدارندگی رشد دارد. همچنین در تحقیقی که توسط Alexander و Zuberer (۱۹۹۱) به منظور ارزیابی تولید سیدروفور در باکتری‌های اطراف ریشه انجام گرفت، نشان داده شد که ۷۱ الی ۷۹ درصد از جمعیت میکروبی موجود در خاک اطراف ریشه قادر به رشد در محیط CAS-آگار نبودند [۲۶]. در این تحقیق تمام ۲۰۱ جدایه سودوموناس بومی و سویه‌های 7NSK2 و GRP3 قادر به رشد در محیط CAS- آگار و تولید سیدروفور بودند. هاله تشکیل شده در بیشتر سویه‌ها دارای حاشیه‌ای کاملاً واضح بود (شکل ۱) و در تعداد کمی از آنها، حاشیه هاله تشکیل شده حالت پخشیده داشت. 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 نشد.



شکل ۱- هاله سیدروفوری باکتری Pseudomonas در محیط آبی CAS-آگار.

۳-۲ جذب روی توسط گیاه از منابع سیدروفوری ^{65}Zn-siderophore

۳-۲-۱ تأثیر سیدروفور گونه‌های مختلف Pseudomonas در مقدار ^{65}Zn اندام‌های هوایی

نتایج حاصل از ارزیابی امکان جذب روی از کمپلکس ^{65}Zn با سیدروفور سودوموناس و مقایسه آن با کمپلکس ^{65}Zn-DFOB بصورت فعالیت عنصر رادیوآکتیو (بکرل بر گرم وزن خشک برگ یا ریشه؛ Bq/g Dwt) در جدول ۲ آورده شده است. مقایسه میانگین‌ها نشان داد که مقدار فعالیت ^{65}Zn اندامهای هوایی در تیمار ^{65}Zn-DFOB بیشتر از کمپلکس تشکیل شده با سه گونه putida، fluorescens و aeruginosa بود. پایین‌ترین فعالیت ^{65}Zn در اندامهای هوایی مربوط به سیدروفور aeruginosa (۳۶/۴۱ بکرل در گرم وزن خشک) بود، در حالیکه فعالیت ^{65}Zn در مورد کمپلکس روی با سیدروفور استاندارد و سیدروفور putida، به ترتیب ۶۶٪ و ۳۹٪ بیشتر از میزان فعالیت سیدروفور aeruginosa بود. بنابراین میزان فعالیت ^{65}Zn مربوط به سیدروفورهای مختلف یا بعبارت دیگر توانایی سیدروفورها در تأمین ^{65}Zn به گیاه از روند کاهشی زیر تبعیت نمود:

Sid-DFOB> Sid- putida> Sid-fluorescens > Sid-aeruginosa

جدول ۲- میزان فعالیت ^{65}Zn در اندام‌های هوایی و ریشه‌های گندم.

سیدروفور	فعالیت ^{65}Zn (Bq/gDWt)	
	^{65}Zn اندام هوایی	^{65}Zn ریشه
Sid-DFOB	۶۰/۶۴ a	۱۱/۹۴c
Sid-putida	۵۰/۷۹ ab	۳۰/۵۷b
Sid-fluorescens	۳۸/۵۹ ab	۴۲/۲۱ab
Sid-aeruginosa	۳۶/۴۱ b	۴۶/۷۳a
$LSD_{0.05}$	۲۴/۲۱	۱۲/۵۱

سیدروفورهای میکروبی به عنوان عوامل کلات کننده یونهای فلزی، سبب افزایش دسترسی گیاهان به این عناصر می‌شوند. گیاهان از بین سیدروفورهای میکروبی می‌توانند هیدروکساماتها، فری‌کروم (Ferrichrome)، RA (Rhodotorulic acid)، FOB (Ferrioxamine) اگروباکتین (Agrobactin) و کاتکول- هیدروکسامات (Catecholate-Hydroxamate) تولید شده توسط Pseudomonas را مورد استفاده قرار دهند [۱۵].

Crowley و همکاران (۱۹۸۸) با بررسی جذب آهن به واسطه سیدروفورهای باکتریایی و قارچی، سیستم انتقال Fe- siderophore را در چاودار تشریح و نشان دادند که سیدروفورها در جذب آهن توسط گیاه نقش دارند [۳۱] و در ضمن، یک حالت اختصاصی نیز ویژه‌ای بین گونه گیاه و سیدروفورهای مختلف گزارش شده است.

اثر رقم گندم در میزان فعالیت ^{65}Zn اندامهای هوایی در سطح ۱ درصد معنی‌دار شد.

۳-۲-۲ تأثیر سیدروفور گونه‌های مختلف Pseudomonas در مقدار ^{65}Zn ریشه‌ها

فعالیت ^{65}Zn در ریشه‌های گندم اختلاف آماری معنی‌داری در سطح ۵ درصد بین کمپلکس روی با سیدروفورهای مورد مطالعه نشان داد. کمپلکس سیدروفورهای P. aeruginosa و P. fluorescens بالاترین مقدار ^{65}Zn را در ریشه‌ها تجمع دادند (جدول ۲). سیدروفور استاندارد با توجه به اینکه بیشترین مقدار ^{65}Zn را به اندام‌های هوایی انتقال داده بود، باعث تجمع کمترین مقدار ^{65}Zn در ریشه‌ها شد (جدول ۲). در تغذیه گیاهان گرامینه با استفاده از خاصیت کمپلکس کنندگی سیدروفورها، نقش این ترکیبات بیشتر به دلیل توانایی آنها در انتقال یونها به سطوح ریشه است که از این طریق یونهای بیشتری در اختیار فیتوسیدروفورهای ترشح شده از ریشه گیاه قرار می‌گیرد و نهایتاً جذب آنها افزایش می‌یابد [۲۱]. نتایج بیشتر آزمایش‌ها بر این نکته تأکید دارند که سیدروفور سودوموناس‌های فلورسنت مستقیماً در تغذیه Zn گیاهان نقش ندارند ولی ممکن است بطور غیرمستقیم با افزایش تأمین Zn در سطح ریشه و فضای بین سلولهای ریشه در تغذیه Zn مؤثر باشند.

۳-۲-۳ اثرهای متقابل بین رقم و باکتری در فعالیت ^{65}Zn

نتایج اثرهای متقابل رقم و باکتری در جدول ۳ و تأثیر کمپلکس‌های سیدروفوری بر فعالیت ^{65}Zn در جداول ۴ و ۵ آورده شده است. همانطور که در جداول نشان داده شده است، در رقم طبسی (کارا) بیشترین ^{65}Zn در اندامهای هوایی در تیمار Sid-DFOB مشاهده گردید، ولی در Sid-putida نیز مقدار و فعالیت ^{65}Zn بالا بود و این تیمار با سیدروفور استاندارد در یک گروه آماری قرار گرفت.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس فعالیت ^{65}Zn در اندام‌های هوایی و ریشه‌ها.

میانگین مربعات			
منابع تغییر	درجه آزادی	^{65}Zn اندام هوایی	^{65}Zn ریشه
رقم	۱	۱۱/۱۶۰ ns	۱۱۲/۱۲۶ ns
سیدروفور باکتری	۳	۷۶۵/۳۷۸*	۱۴۴۵/۷۱۸***
رقم*سیدروفور باکتری	۳	۸۲/۹۱۰ ns	۳۸۶/۰۹۷***
اشتباه	۱۶	۱۷۵/۳۵۷	۴۶/۲۹۸

ns *، ** و ***: به ترتیب غیرمعنی‌دار در سطح ۵٪، ۱٪ و ۰/۱٪

جدول ۴- اثر کمپلکس‌های مختلف سیدرو بر فعالیت ^{65}Zn در اندامهای هوایی و ریشه رقم نان طبسی (کارا).

سیدروفور	اندام هوایی ^{65}Zn (Bq/g DWt)	ریشه ^{65}Zn (Bq/g DWt)
Sid-DFOB	۶۳/۲۴ a	۱۱/۰۰ c
Sid-P. putida	۵۱/۴۱ abc	۲۶/۷۶ b
Sid-P. fluorescens	۳۲/۵۸ c	۳۰/۵۴ b
Sid-P. aeruginosa	۳۶/۴۷ bc	۵۴/۴۹ a
$LSD_{0.05}$	۲۴/۲۱	۱۲/۵۱

جدول ۵- اثر کمپلکس‌های مختلف سیدروفوری بر فعالیت ^{65}Zn در اندامهای هوایی و ریشه رقم دوروم یاواروس (غیرکارا).

سیدروفور	اندام هوایی ^{65}Zn (Bq/g DWt)	ریشه ^{65}Zn (Bq/g DWt)
Sid-DFOB	۵۸/۰۳ ab	۱۲/۸۷ c
Sid-P. putida	۵۰/۱۷ abc	۳۴/۳۸ b
Sid-P. fluorescens	۴۴/۶۰ abc	۵۳/۸۸ a
Sid-P. aeruginosa	۳۶/۳۵ bc	۳۸/۹۷ b
$LSD_{0.05}$	۲۴/۲۱	۱۲/۵۱

در رقم طبسی (Zn-efficient) در مقایسه با رقم یاواروس (Zn-inefficient) فعالیت ^{65}Zn بالاتر بود. رقم طبسی از کارایی بالایی در ترشح فیتوسیدروفورها در شرایط کمبود آهن و روی برخوردار است و رقم یاواروس توانایی ترشح فیتوسیدروفور پایینی دارد [۱۵]. نتایج این تحقیق نشان داد که در هر حال رقم کارای طبسی، مقدار روی بیشتری را از منابع سیدروفوری جذب کرده است (جداول ۳ و ۴). ولی در سایر شاخص‌های اندازه‌گیری شده، اثر رقم معنی‌دار نشد.

اختلاف در فعالیت ^{65}Zn در اندامهای هوایی گندم را می‌توان به ثابت پایداری متفاوت سیدروفورهای مختلف با Zn نسبت داد. ثابت پایداری (log k) DFOB که توسط اکتینومیستها تولید می‌شود [۱۸]، با Zn^{2+} برابر با ۳/۷ می‌باشد و ثابت پایداری فیتوسیدروفور اسید موژینئیک (MA) با Zn^{2+} برابر ۸/۶ است [۳۲]. شاید به دلیل پایین بودن ثابت پایداری سیدروفورهای مورد آزمایش با Zn^{2+} در مقایسه با فیتوسیدروفورهای رقم طبسی (کارا)، امکان واکنش تبادل لیگاندی فراهم شده و در نتیجه مقدار ^{65}Zn در ریشه‌ها و اندامهای هوایی این رقم گندم بالا رفته است. بحث دیگری که در رابطه با تأمین Zn بوسیله سیدروفورها مطرح است، فرضیه تبادل لیگاندی (Ligand exchange) است که توسط Yehuda و همکاران (۱۹۹۶) مطرح گردیده است [۲۳]. در این فرضیه که در مورد آهن بیان شده، گفته می‌شود که Fe از منابع سیدروفوری در یک واکنش تبادلی با فیتوسیدروفورها شرکت کرده و نهایتاً Fe بصورت کمپلکس شده با فیتوسیدروفورها، جذب می‌شود. این فرضیه ممکن است درباره Zn نیز صادق باشد و بتواند بر نقش غیرمستقیم سیدروفورها در جذب Zn دلالت نماید. تحقیقات نشان داده که سیدروفورها با Fe^{3+} و Zn^{2+} کمپلکس برقرار می‌نمایند، اما ثابت پایداری (log K) آنها با Fe^{3+} (۲۴/۲) بیشتر از Zn^{2+} (۳/۷) است [۳۲]. به نظر می‌رسد در جذب مقادیر بالای ^{65}Zn توسط گندم پدیده تبادل لیگاندی نقش داشته باشد، زیرا با توجه به پایین بودن ثابت پایداری سیدروفور با Zn^{2} امکان این واکنش نیز بیشتر است. بنابراین بایستی در رقم‌های کارا در تولید فیتوسیدروفور مانند رقم طبسی، میزان جذب Zn بالاتر باشد که نتایج این آزمایش نیز احتمال وجود فرضیه تبادل لیگاندی را تأیید نمود. ولی رقم یاواروس علی‌رغم توانایی پایین تولید فیتوسیدروفورها، مقدار Zn قابل قبولی را جذب نمود و بایستی مکانیسم‌های دیگری غیر از تبادل لیگاندی در تأمین Zn بواسطه سیدروفورها نقش داشته باشند.

کمپلکس سیدروفور putida با ^{65}Zn فعالیت بیشتری را در اندامهای هوایی هر دو رقم طبسی و یاواروس ایجاد کرد. بنابراین این سیدروفور در مقایسه با سیدروفور سایر گونه‌ها از توانایی بالاتری در افزایش جذب و انتقال ^{65}Zn برخوردار بود. همچنین نتایج نشان داد که مقدار بیشتری ^{65}Zn در ریشه رقم یاواروس نسبت به رقم طبسی تجمع یافت و درصد کمی از آن به اندامهای هوایی انتقال یافت. مشابه چنین نتایجی قبلاً نیز گزارش و مشاهده شده بود که مقادیر بالایی Zn در ریشه رقم دوروم تجمع یافته است [۱۵]. به طور کلی با عنایت به نتایج فوق چنین جمع‌بندی می‌گردد که توانایی کمپلکس سیدروفور سویه‌ها در تأمین Zn به صورت Sid-DFOB>Sid-P.putida>Sid-P.fluorescens>Sid-P.aeruginosa کاهش یافت. با عنایت به توانمندی گونه P. putida در تولید سیدروفور، این گونه را می‌توان گونه تولید کننده زینکوفور نیز نامگذاری کرد. بر اساس نتایج این تحقیق تأمین Zn گیاهان به واسطه سیدروفورهای میکروبی وابستگی زیادی به نوع و گونه گیاه از نظر کارایی برای جذب Zn و نوع سیدروفور میکروبی دارد. لذا برای نتیجه‌گیری دقیق‌تر، بایستی تعداد زیادی گیاه کارا و غیرکارا با سیدروفور سویه‌های متعددی از سودوموناس‌ها در آزمایش‌ها گنجانده شوند.

References:

1. M. Sillanpaa "Micronutrients and the nutrient status of soils: A global study," FAO Soils Bulletin No. 48. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. pp. 75-82 (1982).

2. R. M. Welch, W. H. Allaway, W. A. House, and J. Kubota "Geographic distribution of trace element problems," In: Micronutrients in Agriculture. J.J. Mortvedt, F.R. Cox, L.M. Shuman, and R.M. Welch (eds.). SSSA Book Series No.4. Madison, WI. pp. 31-57 (1991).

3. م.ج. ملکوتی و م.ح. داودی "روی در کشاورزی- عنصری فراموش شده در چرخه حیات گیاه، دام و انسان،" انتسارات سنا. معاونت امور باغبانی، وزارت جهاد کشاورزی. ۲۰۹ صفحه. تهران، ایران (۱۳۸۱) .

4. M. J. Malakouti "The role of zinc in plant growth and enhancing animal and human health," Regional Expert Consultation in Plant, Animal and Human Nutrition: Interaction and Impact, Damascus, Syria. (2003).

5. M. J. Malakouti, A. Malakouti, I. Bybordi and E Khamesi "Zinc (Zn) is the neglected elements in the life cycle of plant, animal and human health (9th edition)," Technical bulletin No. 475. Sana Publication Co., Ministry of Jihad-e-Agriculture. Tehran, Iran. (2006).

6. م.ج. ملکوتی "تغذیه متعادل گندم راهی به سوی خودکفایی در کشور و تأمین سلامت جامعه (مجموعه مقالات)،" ۵۴۴ صفحه. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت کشاورزی. کرج. ایران (۱۳۷۹).

7. B. J. Alloway "Zinc in soils and crops nutrition," International Zinc Association (IZA). Brussels, Belgium (2004).

8. S. Sonmez and M. Kaplan "Comparison of various analysis methods for determination of iron chlorosis in apple trees," J. plant Nutr. 27: 2007-2018 (2004).

9. I. Cakmak, A. Yılmaz, M. Kalaycı, H. Ekiz, B. Torun, B. Erenoglu, and H. J. Braun "Zinc deficiency as a critical problem in wheat production in Central Anatolia". Plant and Soil, 180: 165-172 (1996).

10. م.ج. ملکوتی، م.م. طهرانی "کشاورزی پایدار و افزایش عملکرد با بهینه‌سازی مصرف کود در ایران (چاپ سوم با بازنگری کامل،" انتشارات سنا، تهران، ایران (۱۳۸۴).

11. K. Kitagishi, H. Obata, and T. Kondo "Effect of zinc defciency on 80S ribosome content of meristematic tissues of rice plant," Soil Sci. Plant Nutr. 33:423-430 (1987). I. Cakmak, H. Marschner, and F. Bangert "Effect of zinc nutritional status on growth, protein metabolism and levels of indole-3- acetic acid and other phytohormones in bean

12. Phaseolus vulgaris L.)". J. Exp. Bot. 40:405-412 (1989).

13. R. Becker, E. Fritz, and R. Manteuffel "Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. Plant Physiol," 108: 269–275 (1995).

14. H. Boukhalfa and A. L. Crumbliss "Chemical aspects of siderophore mediated iron transport," Biometals 15: 325-339 (2002).

15. م.ح. رسولی صدقیانی "بررسی نقش فیتوسیدروفورها و سودوموناس‌های تولید کننده سیدروفور در تأمین آهن و روی مورد نیاز ارقام گندم،" پایان‌نامه دکتری گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس. تهران، ایران (۱۳۸۴).

16. م.ح. رسولی صدقیانی، ک. خاوازی، م.ج. ملکوتی "باکتری‌های تولید کننده سیدروفور و امکان تأمین آهن و روی مورد نیاز گیاهان،" نشریه فنی شماره ۴۲۷، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران، ایران (۱۳۸۴).

17. J. M. Meyer and M. A. Abdallah "The fluorscent pigment of Pseudomonas fluorescens: biosynthsis, purification and physicochemical properties," J. Gen. Microbiol. 107: 319-328 (1978).

18. L. L. Barton, and B. C. Hemming "Iron chelation in plants and soil microorganisms," Academic Press, USA (1993).

19. G. R. Cline, C. P. Reid, P. E. Powell and P. J. Szaniszlo "Effects of a hydroxamate siderophore on iron absorption by sunflower and sorghum," Plant Physiol., 76: 36–39 (1984).

20. V. Romheld and H. Marschner "Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron phytosiderophores," Plant and Soil, 123: 147-153 (1990).

21. A. Walter, V. Romheld, H. Marschner, and D. E. Crowley "Iron nutrition of cucumber and maize: Effect of Pseudomonas putida YC3 and its siderophore," Soil Biol. Biochem.., 26: 1023-1031 (1994b).

22. H. Marschner "Mineral nutrition of higher plants," Academic Press, London. (1995).

23. Z. Yehuda, M. Shenker, V. Romheld, H. Marschner, Y. Hadar, and Y. Chen "The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants," Plant Physiol., 112: 1273-1280 (1996).

24. A. Sharma, B. N. Johri, A. K. Sharma and B. R. Glick "Plant growth-promoting bacterium Pseudomonas sp. Strain GRP3 influences iron acquisition in Mung bean," Soil Biol. Biochem., 35: 887-894 (2003).

25. N. W. Schaad "Laboratory guide for identification of plant phathogenic bacteria," 3rd Ed. APS Press (2001).

26. D. B. Alexander and D. A. Zuberer "Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria," Biol. Fertil. Soils, 12: 39-45 (1991).

27. I. Tolay, B. Erenoglu, V. Romheld, H. J. Braun and I. Cakmak "Phytosiderophore release in Aegilops tauschii and Triticum species under zinc and iron deficiencies," J. Exp. Bot., 52: 1093-1099 (2001).

28. G. A. Johnson., A. Lopez and N. V. Foster "Reduction and transport of Fe from siderophores," Plant and Soil, 241: 27–33 (2002).

29. B. Schwyn, and J. B. Neilands "Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal," Biochem, 160: 47-56 (1987).

30. A. M. F. Milagres, A. Machuca, and D. Napoleao "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 (1999).

31. D. E., Crowley, C. P. P. Reid, and P. J. Szaniszlo "Utilization of microbial siderophores in iron acquisition by oat," Plant Physiol., 87: 680-685 (1988).

32. M. Shenker, Y. Hader, and Y. Chen "Kinetics of iron complexing and exchange in solutions by rhizoferrin, a fungal siderophore," Soil Sci. Soc. Am. J., 63: 1681-1687 (1999).