نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۳۸۹، ص. ۱۶۵-۱۵۴

Journal of Water and Soil
Vol. 24, No. 1, Mar-Apr 2010, p. 154-165

نقش آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی در کاهش اثرات منفی شوری بر رشد کلزا

عبدالرضا اخگر[1*] – کاظم خاوازی[2]

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۴
تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۲۲

چکیده

در این تحقیق به منظور پی بردن به نقش آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات منفی شوری بر گیاه کلزا، در یک آزمون گلدانی، سویه *Pseudomonas fluorescens* strain P12 که یک باکتری ریزوسفری مفید و دارای توان تولید ACC دآمیناز است با سویه موتانت آن (Pm12) که از طریق شیمیایی و با استفاده ار ماده جهش زای اتیل‌متان سولفونات (EMS) فاقد فعالیت آنزیم ACC دآمیناز شده بود مقایسه گردید. نتایج بدست آمده از آزمون مقایسهٔ کاربرد باکتریP12 با باکتری موتانت‌آن (Pm12)، نشان داد که سویه تیپ وحشی توانست هم در شرایط شور و هم در شرایط غیر شور کلیه شاخص‌های رشد کلزا شامل وزن تر و خشک اندام‌هوایی، وزن خشک ریشه، طول اندام‌هوایی و مقدار سبزینگی برگ را نسبت به سویه موتانت به طور معنی‌داری افزایش دهد. همچنین براساس نتایج بدست آمده از این آزمون، گیاهان مایه‌زنی‌شده با P12 نسبت به گیاهان مایه‌زنی‌شده با Pm12 مقدار سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم بیشتری جذب کردند. این افزایش جذب در گیاهان تیمار شده با سویه P12 می‌تواند حاصل افزایش رشد ریشه و در نتیجه افزایش سطح جذب ریشه باشد. تحقیق حاضر، از طریق مقایسه رفتار باکتری تیپ وحشی P12 و موتانت Pm12 ، بطور مستقیم نشان داد که آنزیم ACC دآمیناز عامل توانایی سویه *P. fluorescens* P12 در افزایش رشد گیاهچه‌های کلزا و همچنین افزایش تحمل آن در حضور سطوح مختلف شوری به عنوان عامل بازدارنده رشد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ACC دآمیناز، سودوموناس، شوری، کلزا

مقدمه

در کشاورزی کنترل سطح اتیلن در گیاه از اهمیت زیادی برخوردار است. کنترل سطح اتیلن در گیاهان زراعی بخصوص در مواقعی که گیاه در معرض تنش قرار می‌گیرد می‌تواند از خسارت اقتصادی ناشی از افزایش غلظت اتیلن که باعث کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود جلوگیری کند. استراتژی‌های متداول در کنترل سطح اتیلن در گیاهان شامل استفاده از بازدارنده‌های شیمیای بیوسنتز و فعالیت اتیلن، تهیهٔ رقم‌های موتانت (جهش‌یافته) گیاهی که به سطح بالای اتیلن حساسیت کمتری داشته باشند، تهیه گیاهان تراریخته‌ای که در شرایط استرس اتیلن کمتری تولید کنند و اخیراً استفاده از برخی باکتری‌های محرک رشد گیاه[3] که قادرند سطح اتیلن درون گیاه را کاهش دهند می‌باشد (۱۳).

برخی باکتری‌های ریزوسفری خاک از طریق مکانیسم‌هایی که با هورمون گیاهی اتیلن در ارتباط اند می‌توانند باعث افزایش رشد گیاه شوند. در این رابطه میتوان به تولید ریزوبیتوکسین[4] توسط برخی سویه‌های ریزوبیومی (۲۰ و ۲۱) و تولید آنزیم ACC دآمیناز توسط برخی سویه‌های PGPR (۱۰) اشاره کرد. تولید آنزیم ACC دآمیناز توسط برخی سویه‌های PGPR عموماً در شرایط اعمال تنشهای محیطی بر گیاه اهمیت پیدا می‌کند و نتیجه نهایی آن، برآیند اثرات متقابل بسیار پیچیده این آنزیم با هورمون‌های گیاهی و خصوصاً اکسین (IAA) و اتیلن می‌باشد.

باکتری‌هایی با توانایی تولید آنزیم ACC دآمیناز می‌توانند گیاهان را در برابر اثرات مضر تنشهای محیطی چون فلزات سنگین (۲ و ۳)، غرقاب (۱۱)، پاتوژنهای گیاهی (۲۶)، خشکی (۱۶) و شوری (۱۷) محافظت کنند.

هال و همکاران (۱۳) در تحقیقی نشان دادند *Pseudomonas putida* GR12-2 که یک باکتری ریزوسفری مفید و دارای توان تولید ACC دآمیناز است، موجب افزایش رشد ریشه گیاهچه‌های کلزا، کاهو، گوجه فرنگی و گندم شد.

۱- استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه ولی عصر رفسنجان
(* - نویسنده مسئول: Email: arakhgar@yahoo.com)
۲- استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهران

3 - PGPR

4 - Rhizobitoxin

گلیک و همکاران (۹) با مقایسه تأثیر مایه زنی سویه وحشی و موتانت باکتری *P. putida* GR12-2 بر کلزا نشان دادند که سویه وحشی در هر دو نوع روش مایه زنی (بذر و خاک) باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در طول ریشه، وزن خشک و وزن‌تر ریشه‌های کلزا گردید، لیکن سویه موتانت که فاقد فعالیت ACC دآمیناز بود تأثیر مشخصی بر هیچیک از شاخص‌های رشد نداشت. برد و همکاران (۵ و ۶) نشان دادند که کاربرد باکتری دارای توان مصرف ACC به نام *Kluyvera ascorbata* SUD165، رشد گیاهچه‌های کلزا، گوجه‌فرنگی و خردل هندی را که با غلظتهای سمی از نیکل، سرب و روی تیمارشده بودند، بهبود بخشید. بلیموف و همکاران (۲) نیز جهت بررسی تأثیر برخی سویه‌های دارای توان تولید ACC دآمیناز بر کاهش اثرات مضر ناشی از آلودگی خاک به فلزات سنگین، از ۱۵ سویه باکتریایی واجد صفت تولید ACC دآمیناز استفاده کردند. نتایج نشان داد که اثر سمیت کادمیوم (۳۰۰ µM کلرید کادمیوم در محلول غذایی) بر گیاهچه‌های شلغم روغنی مایه زنی‌شده با باکتری‌های مورد آزمایش و همچنین بازدارنده‌های اتیلن (AVG[1] و کاتیون نقره) کاهش یافت. گریکو و گلیک (۱۱) بمنظور بررسی اثر مایه‌زنی باکتری‌های دارای توان تولید ACC دآمیناز بر کاهش اثرات منفی غرقاب در گیاهان، از چند باکتری واجد و فاقد این صفت جهت مایه زنی بذرهای گوجه فرنگی استفاده کردند. آنها نشان دادند گیاهان گوجه فرنگی که با باکتری‌های دارای توان تولید ACC دآمیناز مایه‌زنی شده بودند نسبت به گیاهان مایه زنی نشده و یا مایه‌زنی شده با باکتری‌های فاقد این صفت از مقاومت بالاتری نسبت به تنش غرقاب برخوردار بودند. مایاک و همکاران (۱۶) تأثیر مایه‌زنی گوجه فرنگی و فلفل با باکتری *Achromobacter piechaudii* ARV8 که قادر به استفاده از ACC بعنوان تنها منبع نیتروژن بود را تحت شرایط تنش رطوبتی (خشکی) بررسی کردند. آنها در این تحقیق مشاهده کردند که باکتری مذکور وزن خشک و تر هر دو گیاه را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. همچنین آنها نشان دادند که متعاقب ایجاد تنش خشکی تولید اتیلن در گیاهچه‌های گوجه فرنگی مایه‌زنی‌شده با باکتری مذکور کاهش یافت. در تحقیقی دیگر مایاک و همکاران (۱۷) از باکتری *A. piechaudii* ARV8 جهت بررسی تأثیر آن بر ایجاد مقاومت به شوری در گیاهچه‌های گوجه فرنگی استفاده کردند. آنها در این تحقیق تعدادی از گیاهچه‌های گوجه فرنگی کاشته شده در ورمیکولیت را ۱۰ روز پس از کشت با سوسپانسیون باکتریایی تیمار کردند و تعدادی را هم بعنوان شاهد در نظر گرفتند. سپس گیاهچه‌های گوجه فرنگی را با محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از سدیم کلرید (۰ ، ۴۳، ۸۶، ۱۲۰، ۱۷۲، ۲۰۷ میلی-مولار) آبیاری نمودند. نتایج نشان داد که گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری، رشد بیشتری نسبت به تیمار بدون باکتری (شاهد) داشتند. به‌عبارت دیگر باکتری مذکور توانسته بود وزن خشک و تر گیاه را افزایش دهد. این افزایش برای هر دو تیمار آبیاری با نمک و بدون نمک مشاهده گردید.

با عنایت به اینکه تحقیقات فوق جملگی نقش باکتری‌های دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در کاهش تأثیرات منفی تنش بر گیاه را به توانایی تولید آنزیم توسط آن باکتری‌ها نسبت داده‌اند این سوال مطرح میگردد که آیا این آنزیم ACC دآمیناز است که چنین نقشی را ایفا می‌کند؟ در راستای پاسخ به این سوال و به بیان بهتر تعیین نقش آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات منفی تنش شوری به عنوان یکی از مهمترین عوامل بازدارنده رشد گیاه بود که برنامه این تحقیق شکل گرفت. اثبات این موضوع ما را متقاعدتر خواهد ساخت تا در هنگام کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه بویژه در شرایط تنش شوری این خصوصیت باکتریایی را محور اصلی انتخاب قرار دهیم.

مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری جهت تولید موتانت فاقد توانایی تولید ACC دآمیناز

بدین منظور از باکتری *Pseudomonas fluorescens* P12 که یک باکتری ریزوسفری مفید و دارای توان تولید ACC دآمیناز است و در آزمایش‌های قبلی نشان داده شده که قادر است رشد کلزا را در حضور غلظت بالای نمک نسبت به شاهد به مقدار قابل توجهی افزایش دهد(۱) جهت تولید موتانت استفاده شد.

ایجاد جهش در باکتری *Pseudomonas fluorescens* P12

برای تهیه موتانت باکتری از روش تروکسلر و همکاران (۲۵) با کمی تغییرات استفاده شد. در این آزمایش ابتدا از جدایهٔ P12 که بر روی محیط نوترینت آگار کشت داده شده بود به مقدار اندکی برداشته و به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع NYB (۲۵ گرم در لیتر نوترینت براث + ۵ گرم در لیتر عصارهٔ مخمر) مایه‌زنی گردید. ارلن حاوی محیط کشت NYB مایه‌زنی شده به مدت ۶ ساعت در ۲۸ درجه سانتی‌گراد با ۱۴۰ دور در دقیقه تکان داده شد. آنگاه یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به درون یک لولهٔ میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و ۱۰ میکرولیتر از ماده جهش زای EMS[2] نیز بدان افزوده شد. محتویات درون لولهٔ میکروسانتریفیوژ ابتدا به‌شدت ورتکس و سپس به مدت یک ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت وقوع جهش نگه داشته شد. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون مذکور در دور ۶۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول روئی دور ریخته شد. آنگاه توده سلولی باقی مانده در ته لولهٔ میکروسانتریفیوژ دوبار و هربار با یک میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی شسته شد. پس از آن به توده سلولی یک میلی‌لیتر محیط NYB اضافه و

1 - Aminoethoxyvinylglycine

2 - Ethyl Methan Sulfonate

محتویات درون لوله میکروسانتریفیوژ به درون یک ارلن محتوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط تازه NYB منتقل گردید. ارلن مذکور به مدت یک شب در دمای اتاق و با ۱۴۰ دور در دقیقه تکان داده شد. پس از سپری شدن این مدت، از سوسپانسیون حاصل سری رقت (10^{-1} تا 10^{-7}) تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از رقتهای 10^{-4} تا 10^{-7} بطور جداگانه هر کدام بر روی ۱۵ پلیت پخش شدند. کلیهٔ پلیت‌ها برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند تا تک کلنی‌ها رشد نمایند. آن سری از پلیتهای ۱۵ تایی که تعداد کلنی در هر پلیت حدود ۴۰ عدد بود برای ادامهٔ آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

غربالگری مقدماتی کلنی‌ها

به‌منظور غربالگری مقدماتی کلنی‌های بدست آمده در مرحله قبل، بر اساس توانایی آنها در مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن، ابتدا تعداد ۲۵ پلیت دارای محیط کشت جامد NA بوسیلهٔ یک رپلیکای سترون ۱۸ شانه علامت‌گذاری شدند. سپس هریک از کلنی‌های بدست آمده در جاهای علامت‌گذاری شده در پلیت‌های جدید به صورت نقطه‌ای (لکه‌گذاری) کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ تا ۷۲ ساعت از کشت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، کلنی‌های باکتریایی رشد یافته بر روی پلیت‌های اصلی[1] حاصل، جهت ارزیابی توان مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد استفاده قرار گرفتند. بدین منظور ابتدا ۶۰ پلیت حاوی محیط کشت جامد DF (۷)، با ۱۸ گرم در لیتر آگار بدون نیتروژن[2] تهیه شد. آنگاه روی نیمی از پلیتهای حاوی محیط کشت مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از ACC ۰/۵ مولار استریل پخش گردید. سپس با استفاده از رپلیکا کلنی‌های رشد یافته درون پلیت‌های اصلی به طور متناظر بر سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد DF و DF + ACC منتقل گردیدند. پلیت‌های اخیر به مدت ۴ تا ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کلنی‌هایی که روی محیط کشت جامد DF + ACC نیز همانند محیط کشت جامد DF رشد نکرده بودند بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت جامد king B بطور جداگانه کشت داده شدند تا در مرحله بعدی کار، باکتری جهش‌یافته احتمالی غربال گردد. در این مرحله مجموعاً ۱۵۰۰ کلنی باکتریایی مورد بررسی و غربالگری مقدماتی قرار گرفت. از بین این تعداد کلنی، ۳۷ کلنی بدست آمد که در محیط جامد واجد ACC قادر به رشد نبودند.

بررسی رشد باکتری‌های غربال شده و منتخب در محیط‌های مایع DF ، DF + ACC و $DF + (NH_4)_2SO_4$

برای اطمینان از عدم توان مصرف ACC توسط باکتری‌های غربال شده در بخش قبلی و نیز بررسی رشد آنها در محیط حداقل DF واجد نیتروژن بسهولت قابل استفاده، این باکتری‌ها به همراه سویه تیپ وحشی P12 بطور جداگانه درون ارلن‌های حاوی محیط‌های مایع DF ، DF + ACC و $DF + (NH_4)_2SO_4$ رشد داده شدند. سپس ارلن‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. آنگاه جذب نوری سوسپانسیون‌های حاصل از رشد باکتری‌های مذکور در سه محیط فوق در طول موج ۴۰۵ نانومتر تعیین و با سوسپانسیون‌های مربوط به سویه P12 مقایسه گردیدند. باکتری که در محیط DF + ACC همانند محیط DFرشد نکرده لیکن در محیط $DF + (NH_4)_2SO_4$ به اندازه سویه P12 رشد کرده بود بعنوان سویه موتانت در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و مقدار تولید اکسین باکتری‌های P12 و Pm12

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دآمیناز از روش پنروز و گلیک (۲۲) که روش تغییر یافتهٔ هونما و شیمونورا (۱۴) است استفاده شد. اساس این روش اندازه‌گیری مقدار α- کتوبوتیرات تولید شده توسط آنزیم ACC دآمیناز درعصاره باکتریایی می‌باشد. جهت اندازه‌گیری مقدار تولید اکسین باکتری‌ها از روش بنت و همکاران (۴) با کمی تغییرات استفاده شد.

تعیین منحنی رشد باکتری‌های P12 و Pm12

جهت تعیین منحنی رشد ابتدا هریک از باکتری‌ها بر روی محیط جامد NA کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری شدند تا رشد نمایند. آنگاه یک سرلوپ از هر باکتری به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع NB مایه‌زنی و به مدت ۲۴ ساعت با ۱۲۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق تکان داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر سوسپانسیون باکتریایی به ارلن حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محیط NB در ۱۲ تکرار مایه‌زنی و ارلن‌ها با ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق تکان داده شدند. آنگاه جذب نور سوسپانسیون‌ها به عنوان معیاری از رشد باکتری در زمانهای ۴، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت (برای هر باکتری در هر زمان ۲ تکرار) و در ۶۰۰ نانومتر قرائت گردیدند و با استفاده از اعداد حاصل، منحنی رشد هر باکتری ترسیم شد.

تعیین الگوی ژنتیکی سویه‌های P12 و Pm12 با استفاده از تکنیک BOX-PCR

انگشت نگاری[3] BOX-PCR باکتری‌های P12 و Pm12 بر

1 - Master Plate
2 - Agar N Free

3 - Finger printing

طبق روش رادمیکر و دی‌بروجن(۲۳) و با استفاده از پرایمر BOX A1R با توالی '5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' انجام گرفت.

جهت استخراج DNA ژنومی از روش لیز قلیایی[1] استفاده شد. ابتدا یک کلنی از هر باکتری در ۲۰µl از بافر لیز کننده (محلول ۲۵٪ SDS در سود ۰/۰۵ مولار) درون لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری حل گردید. آنگاه لوله‌های اپندورف به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰ تا ۹۵ درجه سانتیگراد قرارداده شدند. پس از حرارت دادن، لوله‌های اپندورف بلافاصله بر روی یخ قرار داده شدند تا سرد شوند. آنگاه ۱۸۰µl آب دوبار تقطیر سترون به لوله‌های اپندورف افزوده شد تا محتویات درون آنها به مقدار ۱۰ بار رقیق شوند. در آخر این لوله‌ها در دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. لوله‌های اپندورف محتوی DNA باکتریایی تا زمان استفاده درون یخچال نگهداری شدند.

PCR در مخلوط واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۵ µl سوسپانسیون متلاشی شده باکتری، ۲/۵ µl بافر پی‌سی‌آر 10X ، ۷/۵ µl از مخلوط dNTPs (2mM)، ۰/۲۵ µl از پرایمر (100µM)، ۳/۷۵ µl از محلول $MgCl_2$ (25 mM) و ۱/۲۵ واحد از Taq پلیمراز (5u/µl) انجام شد.

برنامه حرارتی مورد استفاده جهت PCR نیز شامل یک سیکل در 95^{oC} برای ۷ دقیقه (جهت واسرشت‌سازی اولیه)، متعاقباً ۳۰ سیکل در 90^{oC} برای ۳۰ ثانیه، 95^{oC} برای ۶۰ ثانیه، 52^{oC} برای ۶۰ ثانیه، 65^{oC} برای ۸ دقیقه و در آخر یک سیکل در 65^{oC} برای ۱۶ دقیقه (بمنظور انکوبه کردن نهایی) بود.

الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ ٪ حاوی اتیدیوم بروماید انجام شد. مقدار ۱۰µl از هر نمونه PCR به همراه ۲ µl از بافر لودینگ[2] درون چاهکهای تعبیه شده در ژل ریخته و سپس جریان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ ولت برقرار گردید. ژل حاصل از الکتروفورز در مقابل اشعه UV قرار گرفته و عکس‌برداری انجام شد.

آزمون گلخانه‌ای

این آزمون بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی با دو سطح باکتری (P12 و موتانت آن Pm12) و ۶ سطح شوری (ECهای ۱، ۴ ، ۶ ، ۸ ، ۱۰ ، ۱۲ دسی زیمنس بر متر) در ۳ تکرار انجام گرفت.

ابتدا دو باکتری P12 و Pm12 روی محیط جامد King B کشت داده شدند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری‌ها، یک کلنی از هر باکتری به درون ۲۵ میلی‌لیتر از محیط TSB مایه‌زنی و در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت با ۱۴۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. برای یکسان کردن تراکم جمعیت باکتری‌ها، جذب نوری مایه تلقیح حاصل با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر یک تنظیم گردید. بذر کلزا (*Brassica napus*) رقم هیولا ۳۰۸ از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر فراهم گردید. جهت سترون سطحی، بذرها به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد غوطه‌ور شدند. به‌منظور حذف هیپوکلریت سدیم، بذرها ۱۰ بار با آب مقطر سترون شسته شدند.

در این آزمون از گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر دهانهٔ ۱۲ سانتی‌متر حاوی ۴۰۰ گرم شن شسته شده با اسید و استریل شده در آون استفاده شد. همچنین جهت شور کردن بستر کشت در سطوح EC برابر ۴ ، ۶ ، ۸ ، ۱۰ و ۱۲ دسی زیمنس بر متر از یک محلول غلیظ NaCl استفاده گردید. در حالیکه رطوبت شن درون گلدان‌ها در حدود رطوبت FC بود، کاشت بذرها انجام گرفت. در هر گلدان تعداد ۸ عدد بذر کلزا در شرایط سترون کاشته شد و هنگام کاشت، هر بذر با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری مورد نظر مایه‌زنی گردید. پس از گذشت ۵ روز از کشت، در هر گلدان تعداد ۴ گیاهچه که از نظر اندازه همانند بودند نگه داشته شدند و بقیه گیاهچه‌ها از گلدان‌ها خارج گردیدند. گلدان‌های کشت شده به مدت یک ماه در اتاقک رشد با دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی گراد و زمان روشنایی ۱۲ ساعت با شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها در هفتهٔ اول هر ۲ روز یک بار و بعد از آن روزانه و با محلول غذایی هوگلند انجام گرفت.

پس از گذشت یک ماه از کشت، ابتدا بخش هوایی گیاهچه‌ها از سطح خاک گلدان‌ها قطع و طول اندام هوایی و وزن تر آنها تعیین گردید. آنگاه جداسازی ریشه‌ها از شن درون گلدان‌ها انجام گرفت و پس از بررسی مورفولوژی ریشه‌ها و عکس‌برداری از آنها، بخش هوایی و ریشه بطور جداگانه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه‌ها و میزان سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم بخش هوایی گیاهان اندازه‌گیری شد. میزان سدیم و پتاسیم با استفاده از روش فلیم فتومتری و کلسیم و منیزیم با استفاده از روش اتمیک ابزوبشن اسپکتروفتومتری(AAS[3]) تعیین گردید.

تجزیه‌های آماری

تجزیه واریانس کلیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

1 - Alkaline lysis
2 - Loading buffer
3 - Atomic Absorption Spectrophotometer

نتایج

تهیهٔ موتانت فاقد توان تولید ACC دآمیناز از باکتری *Pseudomonas fluorescence* P12

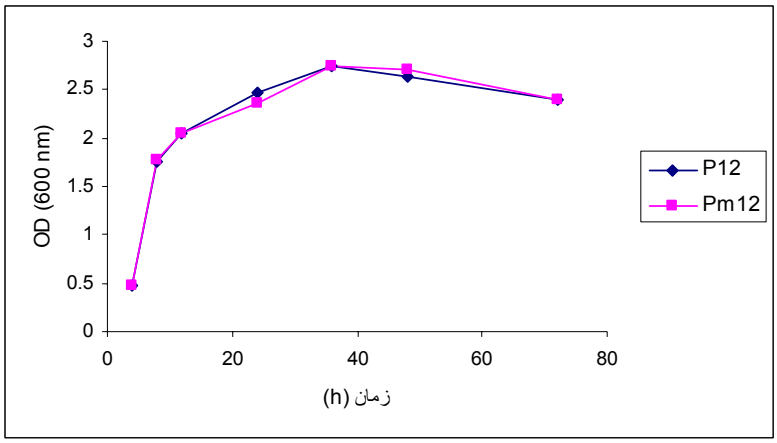
جهت تولید سویه موتانت از سویهٔ P12 در مجموع ۱۵۰۰ کلنی از سویهٔ مذکور که در معرض مادهٔ جهش‌زای EMS قرار گرفته بودند بررسی شدند. از بین این تعداد، ۳۷ کلنی در محیط جامد DF حاوی ACC همانند محیط جامد DF که فاقد هرگونه منبع نیتروژن بود رشد نکردند. این بدان معنی است که این باکتری‌ها نتوانسته بودند از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کنند. از این رو این باکتری‌ها جهت بررسی بیشتر در سه محیط مایع DF ، DF + ACC و DF + $(NH_4)_2$ SO_4 مایه‌زنی شدند. کشت باکتری‌ها در این سه محیط نشان داد که از بین ۳۷ باکتری مذکور تعداد ۳۳ باکتری علاوه بر اینکه در محیط DF حاوی ACC همانند محیط DF رشد نکردند قادر به رشد در محیط DF + $(NH_4)_2$ SO_4 نیز نبودند. این عدم رشد احتمالاً می‌توانست ناشی از صدمه‌ای باشد که مادهٔ جهش‌زا بر یک یا چند ژن مربوط به مسیرهای متابولیک ضروری مثل تولید اسیدهای آمینه ضروری وارد کرده بود. همچنین ۳ باکتری دیگر، در محیط مایع DF حاوی ACC نسبت به باکتری تیپ وحشی P12 (به عنوان شاهد) رشد اندکی داشتند. به عبارت دیگر، توان این باکتری‌ها در تولید ACC دآمیناز کمتر ولی صفر نشده بود و فقط در یک مورد، باکتری علاوه بر اینکه در محیط DF حاوی ACC همانند محیط DF که فاقد هرگونه منبع نیتروژن بود رشد نکرد، در محیط DF حاوی $(NH_4)_2$ SO_4 به اندازه باکتری تیپ وحشی قادر به رشد بود. از این رو باکتری مذکور به صورت Pm12 نامگذاری و جهت بررسی برخی خصوصیات مهم آن، و مقایسه با خصوصیات باکتری تیپ وحشی مورد آزمون قرار گرفت.

مقایسه باکتری موتانت (Pm12) با باکتری تیپ وحشی (P12) از نظر مقدار فعالیت آنزیم ACC دآمیناز، تولید اکسین، منحنی رشد و الگوی ژنتیکی با استفاده از انگشت نگاری BOX-PCR

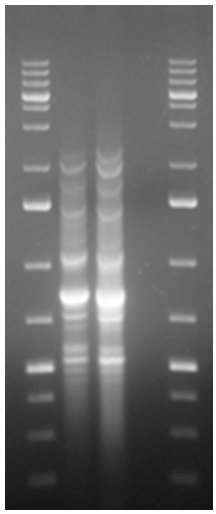
در حالی که مقدار فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتری P12 برابر با ۴/۶۱ میکرومول α– کتوبوتیرات بر میلی‌گرم پروتئین در ساعت بود، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتری Pm12 نشان داد که این باکتری توانایی تولید آنزیم را بطور کامل از دست داده و از این نظر دچار جهش شده بود. اندازه‌گیری مقدار اکسین تولید شده توسط Pm12 و P12 در محیط TSB نشان داد که این دو باکتری از این نظر هیچ تفاوتی با یکدیگر نداشتند، به عبارت دیگر این خصوصیت در باکتری موتانت بدون تغییر مانده بود.

مقایسهٔ منحنی رشد باکتری موتانت Pm12 با سویهٔ تیپ وحشی P12 نشان داد که سرعت رشد باکتری موتانت نسبت به باکتری تیپ وحشی تغییر نکرده و منحنی رشد آن مشابه منحنی رشد باکتری تیپ وحشی بود (شکل ۱).

همچنین مقایسه ژنوم باکتری موتانت Pm12 با سویهٔ تیپ وحشی P12 از طریق مقایسه الگوی انگشت نگاری BOX-PCR نشان داد که این دو باکتری از این نظر نیز با یکدیگر تفاوتی نداشتند (شکل ۲).



(شکل ۱)- مقایسهٔ منحنی رشد باکتری موتانت Pm12 با سویهٔ تیپ وحشی P12



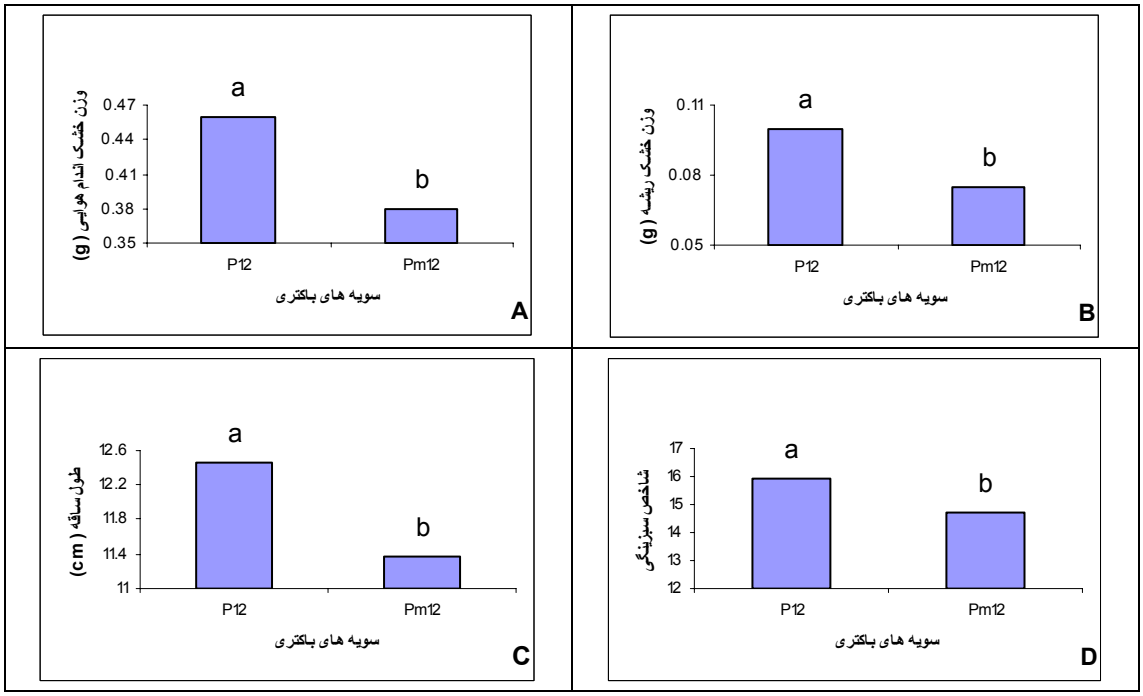
(شکل۲)- مقایسه ژنوم باکتری موتانت Pm12 با سویهٔ تیپ وحشی P12 از طریق انگشت نگاری BOX-PCR

از چپ به راست به‌ترتیب مارکر(M)، باکتری تیپ وحشی(P12)، باکتری موتانت(Pm12)، شاهد منفی(B) و مارکر(M)

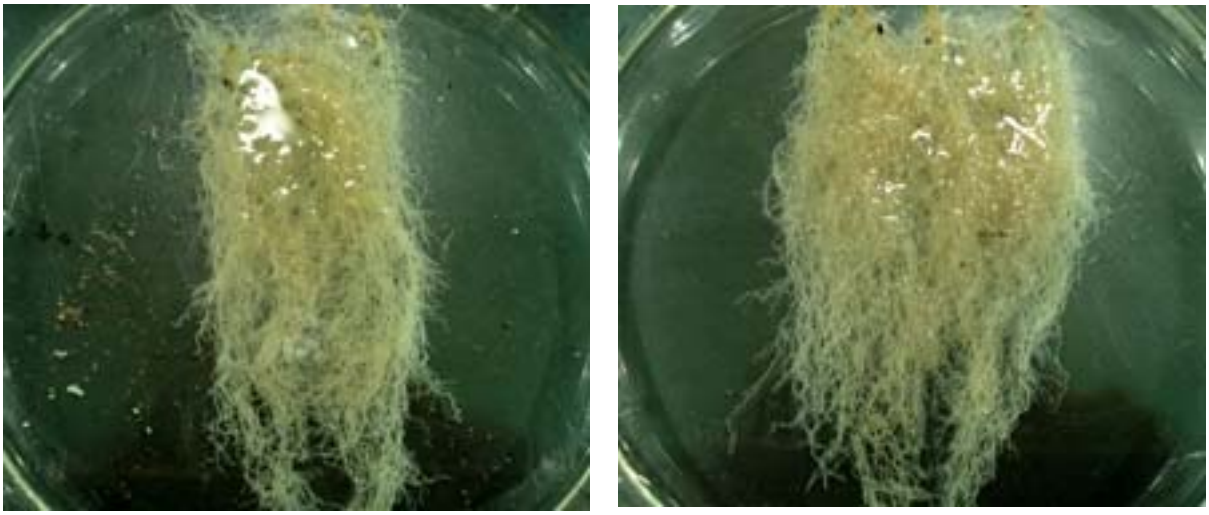
مقایسهٔ سویه P12 با موتانت فاقد توان تولید ACC دآمیناز (Pm12) از نظر کاهش تأثیرات شوری بر رشد کلزا

نتایج جدول تجزیه واریانس نشان داد که بین باکتری P12 و سویه موتانت (Pm12) از نظر تأثیر بر شاخص‌های رشد گیاهچه‌های کلزا شامل وزن تر اندام‌هوایی، وزن خشک اندام‌هوایی، وزن خشک ریشه، طول اندام‌هوایی، مقدار سبزینگی برگ به‌عنوان معیاری از مقدار کلروفیل (در سطح ۱٪) اختلاف معنی‌داری وجود دارد. همچنین سطوح مختلف شوری تأثیر معنی‌داری در سطح ۱٪ بر شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده داشتند. نمودارهای شکل ۳، مقایسهٔ میانگین اثرات اصلی دو سویه P12 و Pm12 را در حضور غلظت‌های نمک بر شاخص‌های رشد کلزا نشان می‌دهند. همانطور که مشاهده می‌شود مایه‌زنی کلزا با سویهٔ P12 در مقایسه با سویه موتانت Pm12 باعث افزایش معنی‌داری در تمام شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده، گردیده است، بطوریکه کاربرد سویهٔ P12 دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در مقایسه با باکتری موتانت Pm12 که فاقد این توانایی است باعث افزایش وزن خشک اندام‌هوایی به مقدار ۲۱/۲ ٪ ، وزن خشک ریشه ۳۳/۵ ٪ طول اندام‌هوایی ۹/۶ ٪ و مقدار سبزینگی برگ ۸/۴ ٪ شده است.

بررسی مرفولوژی ریشه نیز نشان داد که تراکم و انبوهی ریشه گیاهچه‌های کلزای تیمار شده با سویه P12 در مقایسه با Pm12 بیشتر بوده و تعداد ریشه‌های جانبی و تارهای کشنده آنها افزایش یافته بودند (شکل ۴).



(شکل ۳)- مقایسهٔ میانگین شاخصهای رشد در گیاهان کلزای تیمار شده با باکتری‌های P12 و Pm12 در حضور غلظت بالای نمک (وزن خشک اندام هوایی (A)، وزن خشک ریشه (B)، طول ساقه (C)، شاخص سبزینگی برگ (D))



(شکل ٤)- از راست به چپ بترتیب مورفولوژی ریشه گیاهچه‌های کلزای تیمار شده با باکتری P2 و Pm12 در سطح شوری S3

(جدول ۱)- مقایسه میانگین اثر شوری بر شاخصهای رشد کلزا

سطوح شوری ($dS.m^{-1}$)	وزن تر اندام‌هوایی(mg)	وزن خشک اندام‌هوایی(mg)	وزن خشک ریشه(mg)	طول ساقه(mm)	شاخص سبزینگی برگ
S0(EC=1)	۵۸۴۰/۰A	۵۷۴۱/۷A	۱۲۳۳/۳A	۱۵/۰A	۱۵/۶A
S1(EC=4)	۵۵۶۳/۳AB	۵۰۵۱/۷B	۹۹۵/۰B	۱۳۷/۳B	۱۶/۱A
S2(EC=6)	۵۴۵۶/۷B	۴۵۸۸/۳C	۹۷۶/۷B	۱۲۲/۲C	۱۵/۹A
S3(EC=8)	۴۵۴۳/۳C	۳۸۸۰/۰D	۷۷۳/۳C	۱۱۰/۷D	۱۶/۱A
S4(EC=10)	۳۸۶۳/۳D	۳۲۳۱/۷E	۶۹۰/۰C	۹۹/۲E	۱۵/۲A
S5(EC=12)	۳۲۹۸/۳E	۲۷۱۶/۷F	۵۵۰/۰D	۹۰/۳F	۱۳/۰B

*- در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک هستند فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

مقایسهٔ میانگین اثرات کلی سطوح مختلف شوری بر شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده (جدول ۱) نشان داد که کلیه شاخص‌های رشد با افزایش شوری کاهش یافتند. این کاهش در اکثر موارد از نظر آماری معنی‌دار بود.

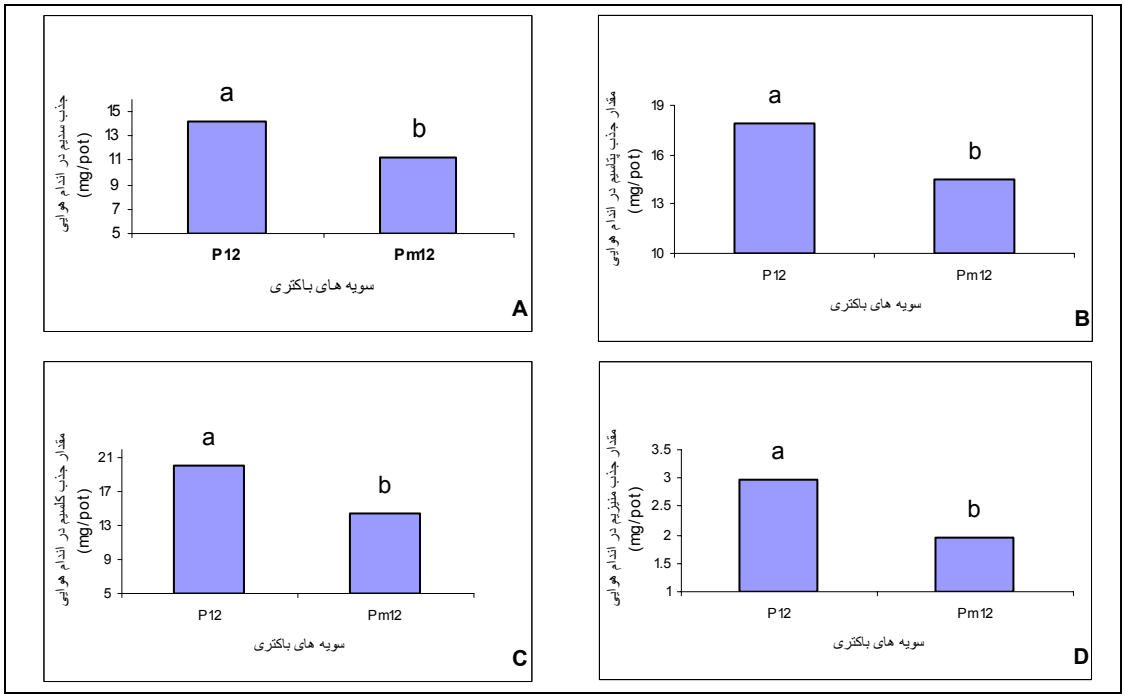
مقایسهٔ کاربرد باکتری P12 با موتانت Pm12 از نظر تأثیر بر جذب عناصر توسط کلزا

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تأثیر دو باکتری P12 و Pm12 و نیز شوری بر جذب عناصر توسط گیاهچه‌های کلزا در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. بین دو باکتری P12 و Pm12 از نظر جذب عناصر تفاوت معنی‌داری وجود داشت. کاربرد سویهٔ P12 در مقایسه با باکتری موتانت Pm12 باعث افزایش جذب سدیم به مقدار ۲۵/۶٪ ، پتاسیم ۲۳/۴٪ ، کلسیم ۳۹/۸٪ ، منیزیم ۵۳/۱٪ شد (شکل ۵).

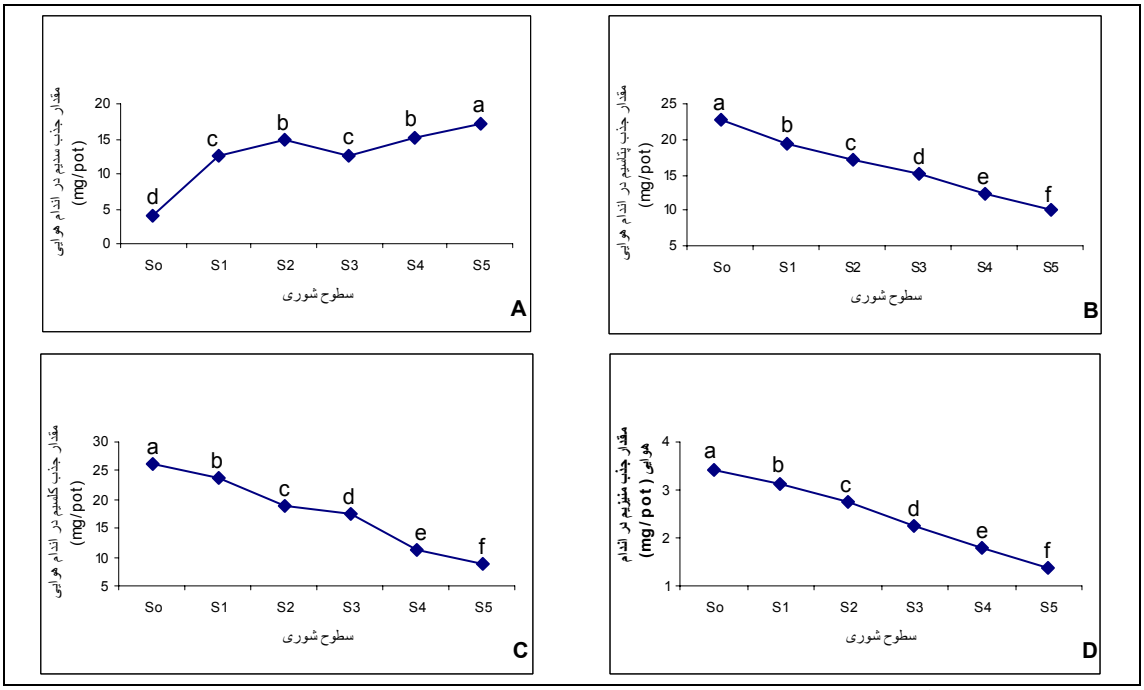
همچنین افزایش شوری باعث افزایش جذب سدیم و کاهش جذب پتاسیم، کلسیم و منیزیم در اندام هوایی کلزا گردید (شکل ۶).

بحث

یک راه قابل اعتماد برای مشخص کردن تأثیر یک خصوصیت PGPR بر رشد گیاه، مقایسه گیاهان تیمار شده با سویه تیپ وحشی و سویه جهش‌یافته‌ای است که فاقد آن خصوصیت بوده لیکن از نظر خصوصیات دیگر شبیه به تیپ وحشی باشد. براین اساس و برای پی بردن به نقش آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات منفی شوری بر گیاه کلزا، در تحقیق حاضر از باکتری *Pseudomonas fluorescens* strain P12 که یک باکتری ریزوسفری مفید و دارای توان تولید ACC دآمیناز است و در آزمایش‌های قبلی نشان داده شده بود که قادر است رشد کلزا را در حضور غلظت بالای نمک نسبت به شاهد به مقدار قابل توجهی افزایش دهد (۱)، جهت تهیه موتانت فاقد توان تولید آنزیم ACC دآمیناز استفاده شد.



(شکل ۵)- مقایسهٔ میانگین جذب عناصر در بخش هوایی گیاهچه‌های کلزای تیمار شده با باکتری‌های P12 و Pm12 در حضور غلظت بالای نمک (سدیم(A)، پتاسیم(B)، کلسیم(C)، منیزیم(D))



(شکل ٦)- مقایسهٔ میانگین تأثیر سطوح مختلف شوری بر جذب عناصردر بخش هوایی گیاهچه‌های کلزا (سدیم(A)، پتاسیم(B)، کلسیم(C)، منیزیم(D))

تا به امروز محققینی که در مطالعـات خـود از موتانـت‌هـای فاقـد آنزیم ACC دآمیناز استفاده کرده‌اند، این موتانت‌هـا را بـه یکـی از دو

روش شیمیایی یا ژنتیکی تهیه نموده‌اند. برای مثال گلیک و همکاران (۹) به روش شیمیایی و با استفاده از ماده جهش‌زای نیتروزوگوانیدین[1] از باکتری *Pseudomonas putida* GR12-2 دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز، موتانت‌هایی که فاقد این توانایی بودند تهیه نمودند. در حالی که لی و همکاران (۱۵) تهیه موتانت فاقد توانایی تولید آنزیم را از طریق جایگزین کردن ژن ACC دآمیناز *Enterobacter Cloacae* UW4 با یک ژن ACC دآمیناز غیر فعال که محتوی یک ژن مقاومت به تتراسیکلین بود انجام دادند (لازم به ذکر است که اخیرا و در پی تعیین توالی 16S rDNA و پروفیل‌های متابولیک مشخص شد که باکتری *E. cloacae* در واقع *P. putida* است). در تحقیق حاضر به دلیل اینکه وکتور حاوی ژن غیر فعال ACC دآمیناز در دسترس نبود جهت تهیه موتانت از روش شیمیایی و با استفاده از ماده جهش‌زای اتیل‌متان سولفونات[2] (EMS) استفاده گردید. نیتروزوگوانیدین و اتیل‌متان سولفونات هر دو جزو دسته Alkylating Agents بوده ایجاد موتاسیون نقطه‌ای می‌نمایند.

در این تحقیق از EMS جهت ایجاد موتاسیون استفاده شد و موتانت Pm12 حاصل بررسی ۱۵۰۰ کلنی بود که در معرض این ماده جهش‌زا قرار گرفته بودند. باکتری Pm12 قادر بود که در محیط DF + $(NH_4)_2 SO_4$ به خوبی و به اندازه سویه تیپ وحشی P12 رشد کند. رشد مناسب Pm12 در محیط حداقل DF حاوی $(NH_4)_2SO_4$ به عنوان منبع نیتروژن می‌تواند حاکی از این باشد که هیچ‌یک از خصوصیات مهم متابولیک این باکتری در اثر مجاورت با ماده جهش‌زا EMS دستخوش تغییر نشده است. گلیک و همکاران (۹) نیز در توجیه یکسان بودن موتانت‌های فاقد آنزیم ACC دآمیناز حاصل از موتاسیون شیمیایی با باکتری تیپ وحشی چنین استدلال کردند که چون موتانت‌های بدست‌آمده از این روش به راحتی قادر به تکثیر در محیط حداقل DF حاوی $(NH_4)_2SO_4$ بودند لذا این نشان می‌دهد که هیچ موتاسیونی در مسیرهای بیوسنتیک ضروری موتانت‌ها بوقوع نپیوسته است. با این حال و جهت اطمینان بیشتر از تشابه باکتری موتانت با تیپ وحشی، دو خصوصیت مهم و موثر بر نتایج آزمون گلدانی نهایی، یعنی سرعت رشد و تولید اکسین باکتری موتانت تعیین و با باکتری تیپ وحشی مقایسه شد. سرعت رشد باکتری می‌تواند در پتانسیل کلنیزاسیون آن موثر باشد و مقدار تولید اکسین نیز می‌تواند بر رشد گیاه تأثیرگذار باشد. بهرحال نتایج نشان داد که موتانت تهیه شده دارای منحنی رشد مشابهی با تیپ وحشی بود و مقدار تولید اکسین دو باکتری نیز کاملا شبیه یکدیگر بودند. همچنین علاوه بر موارد فوق، الگوی انگشت نگاری ژنوم باکتری‌های P12 و Pm12 با استفاده از تکنیک BOX-PCR نیز با یکدیگر مقایسه شد. عناصر BOX توالی‌های حفاظت شده و تکراری هستند که در سرتاسر ژنوم باکتری‌ها بصورت مستقیم یا معکوس پخش شده‌اند. معمولاً از انگشت نگاری BOX-PCR جهت تفکیک ایزوله ها در درون یک گونه استفاده می‌شود. در تحقیق حاضر از این تکنیک برای مقایسه ژنوم دو باکتری P12 و Pm12 استفاده شد. یکسان بودن الگوی انگشت نگاری BOX-PCR دو باکتری نشان داد که ماده جهش‌زای EMS هیچ گونه تغییر کلی روی ژنوم باکتری موتانت ایجاد نکرده است.

در آزمون گلدانی، سویه برتر P12 به عنوان سویه تیپ وحشی با سویه Pm12 که با ایجاد جهش فاقد فعالیت آنزیم ACC دآمیناز شده بود مقایسه گردید. هدف از این مقایسه تعیین نقش ACC دآمیناز باکتریایی در افزایش تحمل به شوری در گیاه کلزا بود.

در این آزمون، نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری شاخص‌های رشد شامل وزن تر و خشک اندام‌هوایی، وزن خشک ریشه، طول اندام‌هوایی و مقدار سبزینگی برگ به عنوان معیاری از مقدار کلروفیل نشان داد که سویه P12 توانست شاخص‌های رشد کلزا را نسبت به سویه موتانت (Pm12) به طور معنی‌داری افزایش دهد. این افزایش حاکی از نقش آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات منفی ناشی از تنش شوری و به عبارت دیگر افزایش تحمل گیاه به شوری است. بنابراین می‌توان چنین نتیجه گیری کرد که افزایش رشد کلزا در شرایط تنش شوری توسط باکتری *P. fluorescens* P12 نسبت به موتانت آن بواسطه توانایی آن در تولید آنزیم ACC دآمیناز است که می‌تواند تولید اتیلن در ریشه‌های کلزا را کاهش دهد.

مایاک و همکاران (۱۷) نشان دادند که باکتری *Achromobacter Piechoudii* ARV8 که یک باکتری محرک رشد گیاه دارای آنزیم ACC دآمیناز است توانست وزن تر و خشک نهال‌های گوجه‌فرنگی را در حضور ۱۷۲ میلی‌مول در لیتر نمک NaCl بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد. به عقیده این محققین تأثیر باکتری درکاهش اثرات تنش شوری بر گیاه بواسطه تأثیری است که این باکتری بر کاهش اتیلن داشته است.

ساراواناکومار و سمپایان (۲۴) با ارزیابی تأثیر چهار سویه *سودوموناس فلورسنس* بر ایجاد مقاومت گیاهان بادام‌زمینی در مقابل تنش شوری نشان داند که سویه *P. fluorescens* TDK1 که در بین سویه‌های دیگر *سودوموناس فلورسنس* مورد آزمایش تنها سویه دارای توان تولید ACC دآمیناز بود بیشترین تأثیر را بر افزایش پارامترهای رشد گیاهچه‌های بادام‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی و پارامترهای محصول در کشت مزرعه‌ای و تحت شرایط خاک شور داشت. آنها در این تحقیق چنین نتیجه گیری کردند که احتمالاً توانایی سویه TDK1 نسبت به سایر سویه‌ها در افزایش مقاومت بادام‌زمینی مرهون توانایی آن سویه در تولید آنزیم ACC دآمیناز بوده است.

نتایج این آزمون همچنین نشان داد که بهبود شاخص‌های رشد

1 - Nitrosoguanidine
2 - Ethyl Methan Sulfonate

گیاهچه‌های کلزای تیمار شده با سویه P12 نسبت به سویه موتانت (Pm12) منحصر به شرایط شور نبوده و در شرایط غیر شور (سطح So) نیز این تفاوت دیده میشود. این نتیجه با نتایج حاصل از تحقیقات گلیک و همکاران (۸) مطابقت دارد. آنها به منظور تعیین نقش ACC دآمیناز باکتریایی بر رشد گیاه در شرایط خاک غیر شور و سترون شده، تأثیر *Pseudomonas putida* GR12-2 که یک باکتری ریزوسفری محرک رشد و دارای آنزیم ACC دآمیناز است و موتانت‌های فاقد این آنزیم را بر رشد گیاه کلزا بررسی کردند. آنها براساس نتایج حاصل از این تحقیق گزارش کردند که موتانت‌های باکتری مذکور که فاقد فعالیت ACC دآمیناز بودند توانایی خود را در افزایش رشد کلزا از دست داده بودند.

مقایسه میانگین شاخص‌های رشد اندازه‌گیری شده در سطوح مختلف شوری نیز نشان داد که همبستگی بالایی بین کاهش مقادیر شاخص‌های رشد کلزا با افزایش شوری وجود داشت.

گوتیرز و همکاران (۱۲) گزارش کردند که تأثیر شوری (NaCl) بر برخی شاخص‌های رشد کلزا و از جمله ارتفاع گیاه در EC بالاتر از ۶ اتفاق می‌افتد، در حالیکه در تحقیق حاضر نشان داده شد که افزایش EC از ابتدا باعث کاهش شاخص‌های رشد (بجز مقدار کلروفیل) در گیاه کلزا گردید. البته این نکته قابل ذکر است که بذر کلزای انتخاب شده برای آزمون‌های این تحقیق Hyola 308 بود که نسبت به سایر بذرهای اصلاح شده موجود از مقاومت کمتری به شوری برخوردار است.

براساس نتایج بدست آمده از این تحقیق بین دو گیاه مایه‌زنی شده با P12 و Pm12 از نظر جذب عناصر تفاوت وجود داشت. گیاهان مایه‌زنی شده با سویه P12 نسبت به باکتری موتانت سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم بیشتری جذب نمودند. مایاک و همکاران(۱۷) نشان دادند مایه‌زنی گیاه در شرایط تنش شوری با باکتری *Achromobacter piechaudii* ARV8 که یک باکتری دارای توان تولید ACC دآمیناز است، جذب پتاسیم را افزایش داد. افزایش جذب سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم در گیاهان تیمار شده با سویه P12 نسبت به موتانت آن (Pm12) می‌تواند نتیجه افزایش رشد ریشه و به عبارت دیگر افزایش سطح جذب ریشه در گیاهان مایه‌زنی شده با سویه P12 باشد. بیشتر بودن مقدار سدیم در اندام هوایی کلزای تیمار شده با سویه P12 این احتمال که ممکن است باکتری اثر مفید خود را در شرایط تنش شوری، از طریق کاهش جذب سدیم اعمال کرده باشد منتفی می‌سازد.

همچنین مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف شوری بر جذب عناصر توسط گیاهچه‌های کلزا نشان داد که با افزایش شوری از سطح So به S5 مقدار جذب سدیم افزایش و مقدار جذب پتاسیم، کلسیم و منیزیم کاهش یافت. بنظر می‌رسد افزایش یونهای سدیم باعث کاهش قدرت رقابت کاتیونهای دیگردر اشغال فضای دونان اطراف ریشه شده، امکان جذب آنها را کمتر کرده است. نیل و همکاران (۱۹) نیز نشان دادند که در شرایط شور جذب سدیم افزایش و جذب کلسیم و پتاسیم کاهش می‌یابد. تجمع کلر و سدیم در بخش‌های هوایی گیاه در معرض تنش شوری به عنوان یک سازوکار تنظیم اسمزی برای گیاه محسوب می‌شود (۱۸).

تحقیق حاضر، از طریق مقایسه رفتار باکتری تیپ وحشی *P. fluorescens* P12 و موتانت Pm12 *P. fluorescens*، بطور مستقیم نشان داد که آنزیم ACC دآمیناز عامل توانایی سویه *P. fluorescens* P12 در افزایش رشد گیاه کلزا و همچنین افزایش تحمل آن در حضور سطوح مختلف شوری به عنوان عامل بازدارنده رشد می‌باشد.

منابع

۱- اخگر ع.ر. ۱۳۸۷. جداسازی، شناسایی و بررسی کارآیی باکتری‌های ریزوسفری دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات تنش شوری بر رشد کلزا. پایان‌نامه دوره دکتری، دانشگاه تهران.

2- Belimov A.A., Safronova V.I., Sergeyeva T.A., Egorova T.N., Matveyeva V.A., Tsyganov V.E., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A., Kluge C., Preisfeld A., Dietz K.J., and Stepanok V.V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soil and containing *1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase*. Can. J. Microbiol. 47: 642-652.

3- Belimov A.A., Hotzeas N., Safronova V.I., Demchinskaya S.V., Piluzza G., Bullitta S., and Glick B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth- promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. *Czern*.). Soil Biol. Biochem., 37:241-250.

4- Bent E., Tuzan S. Chanway C.P., and Enebak S. 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 47: 793-800.

5- Burd G.I., Dixon D.G., and Glick B.R. 1998. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in plant seedlings. Appl. Environ. Microbiol., 64: 3663-3668.

6- Burd G.I., Dixon D.G., and Glick B.R. 2000. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol., 46:245-247.

7- Dworkin M., and Foster J. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen J. Bacteriol., 75:592-601.

8- Glick B.R., Jacobson C.B., Schwarze M.M.K., and Pasternak J.J. 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12–2 do not stimulate canola root elongation. Can. J. Microbiol. 40: 911–915.
9- Glick B.R., Liu C., Ghosh S., and Dumbroff E.B. 1997. Early development of canola seedlings in the presence of the root elongation. Soil Biol. Biochem. 29: 1233-1239.
10- Glick B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacteria enzyme ACC *deaminase*. FEMS Microbiol. Let. 251: 1-7
11- Grichko V.P., and Glick B.R. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiol. Biochem. 39: 11-17.
12- Gutierrez F.H., Scheiner J.D., and Lavado R.S. 1994. Some effects of soil salinity on growth, development and yield of rapeseed (*Brassica napus* L.). J. Agronomy and Crop Science 172: 182-187.
13- Hall J.A., Peirson D., Ghosh S., and Glick B.R. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 . Israel J. Plant Sci. 44: 37- 42.
14- Honma M., and Shimomura T. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agric. Biol. Chem. 42: 1825–1831.
15- Li J., Ovakim D.H., Charles T.C., and Glick B.R. 2000. An ACC deaminase minus mutant of *Entrobacter cloacea* UW4 no longer promotes root elongation.Curr. Microbiol., 41:101-105.
16- Mayak S., Tirosh T., and Glick B.R. 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and pepers. Plant Science., 66:525-530.
17- Mayak S., Tirosh T., and Glick B.R. 2004b. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plant to salt stress. Plant Physiol. Biochem., 42:565-572.
18- Munns R. 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soils some dogmas and hypotheses. Plant Cell Environ., 16:15–24.
19- Neel, J.P.S., Alloush, G., Belesky, A.D.P., Clapham, W.M., 2002. Influence of rhizosphere ionic strength on mineral composition, dry matter yield and nutritive value of forage chicory. J. Agron. Crop Sci. 188: 398–407.
20- Owens L.D., and Wright D.A. 1965b. Production of the soybean-chlorosis toxin by *Rhizobium japonicum* in pour culture. Plant Physiol. 40: 931-933.
21- Owens L.D., Thompson J.F., Pitcher R.G., and Williams T. 1972. Structure of rhizobitoxine, an antimetabolic enol-ether amino acid from *Rhizobium japonicum*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. pp. 714.
22- Penrose D.M., and Glick B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Plant Physiol. 118:10-15.
23- Rademaker J.L.W., and De Bruijn F.J. 1997. Characterization and classification of microbs by rep-PCR genomic fingerpriting and computer-assisted pattern analysis. In: DNA markers: Protocols and Overivews. pp. 151-171. J.Wiley and Sons. New York.
24- Saravanakumar D., and Samiyappan R. 2007. Acc deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) Plants, Journal of Appli. Microbiol., 102:1283-1292.
25- Troxler J., Azelvander P., Zala M., Defago G., and Haas D. 1997. Conjugative transfer of chromosomal genes between *Fluorescent pesudomonads* in the rhizosphere of wheat. Applied Environ. Microbiol., 63:213-219.
26- Wang C., Wang D., and Zhou Q. 2004. Colonization and persistence of a plant growth promoting bacterium *pseudomonas fluorescens* strain CS85, on roots of cotton seedlings. Can. J. Microbiol., 50:475-481.

Journal of Water and Soil
Vol. 24, No. 1, Mar-Apr 2010, p. 154-165

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۴، شماره ۱، فروردین - اردیبهشت ۱۳۸۹، ص. ۱۶۵-۱۵۴

The roll of bacterial ACC deaminase enzyme on the alleviation of negative effects of salinity on canola growth

A. Akhgar[1*] – K. Khavazi[2]

Abstract

In this study a greenhouse experiment was conducted to evaluate the role of ACC deaminase enzyme on alleviation of salinity stress of canola plant. Canola plants were exposed to *Pseudomonas fluorescens* strain P12 which contains a rhizobacter capable of producing *Pseudomonas fluorescens* in comparison with plants exposed to mutant Pm12 unable to produce the required enzyme. The mutant was chemically produced using Ethyl Methane Sulfonate (EMS). Comparison of wild strain P12 with its mutant Pm12 indicated that under both saline and non-saline conditions, strain P12 significantly enhanced canola growth parameters including shoot fresh and dry weight, root dry weight, shoot length and green area index. In addition, canola plants inoculated with strain P12 absorbed higher rates of sodium, potassium, calcium, and magnesium, which can be attributed to enhanced roots growth. However, comparing strains P12 with Pm12 indicated that the production of ACC deaminase enzyme by P12 enhanced canola salinity tolerance and consequently, its growth.

Keywords: ACC deaminase, *Pseudomonas* sp., Salinity, Canola

1 - Assistant prof. of Soil Science, Department, Vali-Asr University
(* - Corresponding author Email: arakhgar@yahoo.com)
2- Assistant prof., Soil and Water Research Institute