نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۰، ص. ۴۱-۲۹

Journal of Water and Soil
Vol. 25, No. 1, Mar-Apr 2011, p. 29-41

جداسازی، شناسایی و بررسی کارآیی باکتری‌های ریزوسفری دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات تنش شوری بر رشد کلزا

عبدالرضا اخگر[1*]- کاظم خاوازی[2]- نازنین خاکی پور[3]

تاریخ دریافت:۸۸/۸/۳
تاریخ پذیرش:۸۹/۱۰/۱۸

چکیده

هدف از این تحقیق، شناسایی سویه یا سویه‌هایی از باکتری‌های PGPR دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز است که قادر باشند اثرات مضر شوری بر رشد گیاه را تا حد قابل‌ملاحظه‌ای کاهش دهند. بدین منظور تعداد ۲۱ نمونه مرکب خاک به‌همراه ریشه گیاه کلزا از ۲۱ منطقه تحت کشت آن در اراضی عمدتاً شور استان‌های قم و قزوین تهیه شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، تعداد ۱۰۵ کلونی باکتریایی از رقت‌های بالای خاک ریزوسفری کلزا بصورت تصادفی جداسازی و خالص‌سازی شدند. براساس توانایی رشد جدایه‌ها در محیط حداقل DF حاوی ACC بعنوان تنها منبع نیتروژن مشخص گردید که از بین ۱۰۵ جدایه منتخب تعداد ۱۵ جدایه دارای توان تولید ACC دآمیناز بودند. شناسایی این جدایه‌ها با استفاده از معیارهای مندرج در کتاب سیستماتیک باکتریولوژی Bergey انجام گرفت. بر مبنای آزمون‌های تعیین جنس و گونه، ۱۴ جدایه در گروه سودوموناس-های فلورسنت و متعلق به گونه سودوموناس فلورسنس بودند. نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دآمیناز سویه‌ها نشان داد که فعالیت این آنزیم در سویه‌های مورد آزمایش متفاوت بوده و از ۱/۴۳ تا ۸/۱۷ میکرومول α- کتوبوتیرات بر میلی‌گرم در ساعت تغییر می‌کرد. همچنین میزان اکسین تولید شده توسط سویه‌ها در محیط کشت TSB بین ۰/۸ تا ۲/۱۷ میکرومول در میلی‌لیتر نوسان داشت. در این تحقیق تاثیر سویه‌های منتخب بر کاهش اثرات منفی شوری بر رشد گیاهچه‌های کلزا از طریق انجام یک آزمون گلدانی بررسی و نشان داده شد که در شرایط شور کاربرد سویه‌های مورد آزمایش باعث افزایش مقادیر وزن تر اندام‌هوایی، وزن خشک اندام‌هوایی، طول ساقه، وزن خشک ریشه و طول ریشه گیاهچه‌های کلزا در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد (بدون تلقیح) گردید. در بین سویه‌های مورد آزمایش، سویهٔ P12 بیشترین تاثیر را بر شاخص‌های رشد داشت، به‌طوری که باعث ایجاد اختلاف معنی‌دار با شاهد و نیز اکثر سویه‌های مورد آزمایش شد. در این آزمون همبستگی بالایی بین طول ریشه و وزن خشک ریشه با مقادیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتری‌ها مشاهده گردید. همچنین مقایسهٔ میانگین تاثیر دو سطح شوری S1 ($EC=6\ dS.m^{-1}$) و S2 ($EC=8\ dS.m^{-1}$) بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های کلزا نشان داد که افزایش شوری از ۶ به ۸ دسی زیمنس بر متر با کاهش معنی دار وزن تر اندام‌هوایی و طول ساقه همراه بود.

واژه‌های کلیدی: Pseudomonas، ACC دآمیناز، کلزا، شوری

مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند از دو راه مستقیم و غیرمستقیم بر رشد و نمو گیاه اثر مفید داشته باشند. افزایش غیرمستقیم رشد گیاه زمانی اتفاق می‌افتد که این باکتری‌ها برخی از اثرات مضر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (اغلب قارچ‌ها) را بااستفاده از یک یا چندین مکانیسم حذف و یا تعدیل نمایند در صورتی که افزایش مستقیم رشد گیاه معمولاً مستلزم تولید یک ترکیب خاص و موثر بر رشد گیاه و یا تسهیل در جذب عناصرغذایی مورد نیاز گیاه توسط این باکتری‌ها است (۱۴).

برای اولین بار لیفشیتز و همکاران (۲۷) نشان دادند که PGPR[4]ها قادرند مستقیماً رشد گیاهان را افزایش دهند. مکانیسم‌هایی که باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند از طریق آنها مستقیماً باعث بهبود و افزایش رشد و عملکرد گیاه شوند عبارتند از: ۱- تثبیت نیتروژن، ۲- حل فسفات‌های کم‌محلول، ۳- تأمین آهن از طریق تولید سیدروفورهای میکروبی، ۴- تولید فیتوهورمون‌هایی

۱- استادیار گروه خاکشناسی دانشگاه ولی عصر رفسنجان
(*- نویسنده مسئول: Email:arakhgar@yahoo.com)
۲- استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک وآب
۳- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد سوادکوه

4- Plant growth promoting rhizobacteria

چون اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و جیبرلین‌ها، ۵- کاهش اتیلن (۲۵).

در چند دهه گذشته توانایی تولید ۱- آمینوسیکلوپروپان - ۱- کربوکسیلات (ACC) دآمیناز توسط باکتری‌ها، به عنوان مکانیسم جدیدی برای افزایش رشد گیاه مطرح شده است (۲۴ و۳۵). به عقیده پنروز و گلیک (۳۶) هر باکتری که دارای فعالیت آنزیم ACC دآمیناز بیش از ۲۰ نانومول α-کتوبوتیرات بر میلی‌گرم در ساعت باشد PGPR بوده و می‌تواند شاخص‌های رشد گیاه را افزایش دهد. تلقیح گیاه با باکتری‌هایی که قادر به تولید آنزیم ACC دآمیناز هستند می‌تواند در کاهش سطح اتیلن تنشی در گیاه و در نتیجه کاهش اثرات منفی آن موثر باشند، باکتری‌هایی با چنین توانایی می‌توانند گیاهان را در برابر اثرات مضّر تنش‌های محیطی چون فلزات سنگین (۵ و ۶)، غرقاب (۱۹)، پاتوژن‌های گیاهی (۴۲)، خشکی (۳۱) و شوری (۳۲) محافظت کنند.

با عنایت به محدودیت اراضی غیر شور وگسترش روزافزون اراضی شور، برای استفاده از حداکثر پتانسیل خاک‌ها بناچار بایستی از اراضی شور و لب شور جهت کشت کلزا استفاده شود. بدیهی است که کشت کلزا در اراضی شور باعث اعمال تنش بر گیاه و کاهش عملکرد می‌شود. تنش حاصل از شوری، یکی از تنش‌هایی است که پتانسیل تولید اراضی کشاورزی را کاهش می‌دهد. این تنش و مبارزه با آن از عمده مسائلی است که بشر از هزاران سال پیش تا کنون با آن دست به گریبان بوده است، به‌طوری که می‌توان آن را یکی از علل کاهش قابلیت استفاده اراضی برای تولید محصولات کشاورزی دانست. کلزا (*Brassica napus* L.) از جمله گیاهان روغنی است که از حیث تحمل به شوری تا حدودی مشابه با گندم می‌باشد (۱)، لیکن درصد کاهش عملکرد آن پس از حد آستانه، نسبت به گیاهانی که آستانه تحمل مشابهی دارند، شدیدتر است (۳۰).

نظر به پتانسیل باکتری‌های دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات زیانبار تنش‌های محیطی از جمله شوری بر رشد گیاهان، وجود مشکل تنش شوری در بسیاری از خاک‌های زیر کشت و ضرورت استفاده از راهکارهای بیولوژیک برای مقابله با این قبیل تنش‌ها به منظور دستیابی به تولید بهینه محصولات زراعی، توان کلزا برای رشد در خاکهای نسبتاً شور و لزوم توسعه سطح زیر کشت آن در این خاک‌ها برای تولید هر چه افزون‌تر روغن گیاهی، برنامه این تحقیق طراحی گردید. هدف از تحقیق حاضر شناسایی سویه یا سویه‌هایی از باکتری‌های PGPR دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز است که قادر باشند اثرات مضر شوری بر رشد گیاه را تا حد قابل ملاحظه‌ای کاهش دهند.

مواد و روش ها

نمونه‌برداری از ریزوسفر گیاه کلزا

بدین منظور تعداد ۲۱ نمونه مرکب خاک به همراه ریشه گیاه کلزا از ۲۱ منطقه تحت کشت کلزا در اراضی عمدتاً شور استان‌های قم و قزوین تهیه و نمونه‌ها جهت جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوسفری به آزمایشگاه منتقل شدند. جدول۱ شوری نمونه‌های خاک بر حسب دسی‌زیمنس‌برمتر را نشان میدهد.

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوسفری مورد نظر

پس از تهیه سری رقّت از خاک ریزوسفری به همراه ریشه و کشت بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت NA[1]، مجموعاً تعداد ۱۰۵ کلنی از بالاترین رقّت‌های هر نمونه کشت شده انتخاب و جهت خالص‌سازی مجدداً بر روی محیط جامد NA کشت داده شدند. پس از اطمینان کامل از خلوص جدایه‌های فوق، باکتری‌ها تا زمان استفاده بعدی بر روی محیط کشت شیبدار در یخچال نگهداری شدند.

غربالگری جدایه‌ها از نظر توانایی مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن

توانایی جدایه‌ها در مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن با استفاده از روش تغییر یافته گلیک و همکاران (۱۳) تعیین گردید. بدین منظور ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های کشت داده شده در TSB[2] به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط حداقل DF (۱۱)، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط حداقل DF حاوی ۳ میلی مولار ACC و۲۰ میلی‌لیتر از محیط حداقل DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم منتقل و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر با دمای ۲۸°C و ۱۸۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. آنگاه جذب نور[3] این محیط‌ها بعنوان معیاری از رشد باکتری در طول موج ۴۰۵ nm اندازه‌گیری شد.

شناسایی جدایه‌ها

شناسایی جدایه‌های دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز با استفاده از نتایج آزمونهای میکروسکوپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مندرج در کتاب برگی انجام گرفت (۲۶). آزمون‌ها تعیین جنس برای جدایه‌ها شامل تعیین واکنش گرم با استفاده از محلول ۳٪ KOH ، رنگ‌آمیزی گرم، O/F ، توانایی تثبیت نیتروژن، کشت روی محیط YMA[4] ، تحرک و بررسی خاصیت فلورسنس بود. برای تعیین گونه جدایه‌ها از آزمونهای پیشنهاد شده توسط بوسیس و همکاران (۲۰۰۰) شامل هیدرولیز آرژینین، اکسیداز، کاتالاز، رشد جدایه‌ها در دمای ۴۱ و ۴ درجه سانتی‌گراد، هیدرولیز ژلاتین، توان استفاده از قندهای ترهالوز و آرابینوز، تولید لوان و احیای نیترات استفاده شد.

1- Nutrient agar
2- Tryptic soybean broth
3- Absorbance
4- Yeast manitol agar

جدول۱ – EC نمونه‌های خاک بر حسب دسی‌زیمنس‌برمتر

شماره خاک	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱
EC(dS/m)	۴/۶	۲/۵	۷/۳	۹/۹	۹/۶	۶/۵	۴/۵	۷/۳	۷/۱	۵/۶	۳/۱	۲/۵	۲/۲	۷/۹	۳/۵	۵/۲	۳/۹	۱۱	۱/۸	۰/۹	۲/۳

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دآمیناز جدایه‌ها

بدین منظور از روش پنروز و گلیک (۳۶) استفاده شد. در این روش ابتدا هر باکتری در محیط کشت غنی TSB کشت گردید. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصل به ۳۰ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل گردیده و به مدت ۱۲ ساعت بر روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ^{oC} ۲۸ قرار داده شد. سپس محتویات ارلن به لوله سانتریفوژ منتقل و برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰g و در دمای ^{oC} ۴ سانتریفیوژ گردید. سلول‌های باقی مانده در ته لوله پس از شستشو با محیط حداقل DF در ۷/۵ میلی‌لیتر از همان محیط حل شدند و کل محتویات به ارلن ۵۰ میلی‌لیتری استریل منتقل گردید. سپس مقدار ۴۵ میکرولیتر از محلول ۰/۵ مولار ACC که از قبل تهیه شده بود، به سوسپانسیون باکتریایی فوق اضافه و برای مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ^{o}C ۳۰ قرارداده شد تا فعالیت آنزیم القاء شود. سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g و در دمای ^{o}C ۴ سانتریفیوژ و سلول‌های باقی مانده در ته لوله با ۵ میلی‌لیتر از Tris-HCl یک دهم مولار (۷/۶ pH) شسته شدند. سلول‌های باقی مانده در ته لوله در یک میلی‌لیتر از محلول شستشوی فوق حل و کل محتویات به لوله میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید و برای مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g و دمای ^{oC} ۴ سانتریفیوژ، و محلول روئی دور ریخته شد. پس از اینکه سلول‌های باقی مانده در ته لوله در ۶۰۰ میکرولیتر از Tris-HCl یک دهم مولار (۸/۵ pH) حل شدند مقدار ۳۰ میکرولیتر تولوئن به آن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه بشدت ورتکس گردیدند. آنگاه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق بطور جداگانه به سه لوله میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل گردید (یک لوله بعنوان شاهد و دو لوله برای دو تکرار هرجدایه باکتری) و۱۰۰ میکرولیتر نیز برای تعیین مقدار پروتئین سلولی کنار گذاشته شد. مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول ACC نیم مولار به هر یک از لوله‌های میکروسانتریفیوژ محتوی ۲۰۰ میکرولیتر ازسلولهای تولوئنی شده اضافه شد. لوله ها ابتدا ورتکس و سپس برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ^{oC} ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنگاه یک میلی‌لیتر HCl ۰/۵۶ مولار به هر لوله اضافه و محلول نهایی درون هر لوله با استفاده از ورتکس مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g و در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول روئی درون هر لوله میکروسانتریفیوژ برداشته و با ۸۰۰ میکرولیتر از HCl ۰/۵۶ مولار، درون یک لوله آزمایش کوچک ورتکس گردید. سیصد میکرولیتر از محلول ۲،۴– دی‌نیتروفنیل ئیدرازین (محلول ۰/۲ درصد ۲،۴– دی‌نیتروفنیل ئیدرازین در HCl ۲ مولار) به هر لوله اضافه و ورتکس گردید. محتویات هرلوله برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{oC} ۳۰ نگهداری شد. پس از آن به محلول فوق ۲ میلی‌لیتر سود (NaOH) ۲ مولار اضافه و مخلوط گردید تا یکنواخت شود. در پایان هم مقدار جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید (برای تهیه محلولهای استاندارد از آلفا– کتوبوتیرات استفاده شد).

جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین در عصاره باکتری‌های مورد آزمایش از روش برادفورد (۸) استفاده گردید. بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی تولوئنی شده هر جدایه که قبلاً جهت انجام این آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود با ۱۰۰ میکرولیتر از سود ۰/۱ نرمال مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن مخلوطها، ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه به درون لوله‌های آزمایش کوچک منتقل و حجم آنها با استفاده از بافر Tris-HCl 0.1M با pH برابر ۸/۵ در ۱۰۰ میکرولیتر تنظیم گردید. آنگاه ۵ میلی‌لیتر از معرف کوماسی بلو رقیق شده (محلول۱ :۴ در آب مقطر و فیلتر شده با واتمن شماره۱) به لوله‌های آزمایش اضافه و محتویات درون لوله‌ها پس از ورتکس شدن برای ۵ تا۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. در آخر جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت گردید. در این آزمایش منحنی استاندارد به کمک محلولهای استاندارد از BSA[1] و در غلظتهای ۰/۱، ۰/۲، ... ، ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید.

اندازه‌گیری تولید اکسین جدایه‌ها

بدین منظور از روش بنت و همکاران (۷) با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB کشت داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هریک از جدایه‌ها مجددا به ۲۰ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل و برای مدت ۷۲ ساعت در ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تکان داده شدند. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون‌های مذکور در ۱۰۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. آنگاه یک میلی‌لیتر از محلول روئی با ۴

1- Bovine serum albumin

میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی[1] (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$, 0.5M) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسهٔ دانسیته نوری سوسپانسیون آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظتهای ۰، ۵،۱۰،۲۰ و۳۰ میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید (IAA) محاسبه شد.

آزمون گلخانه‌ای: بررسی تأثیر جدایه‌های دارای توان تولید ACC دآمیناز بر کاهش اثرات شوری

این آزمون بصورت فاکتوریل و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۲ سطح شوری (EC های ۶ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) و ۹ سطح باکتری (۸ تیمار باکتری و یک تیمار بدون تلقیح به عنوان شاهد) و ۳ تکرار انجام گرفت.

تهیهٔ مایه تلقیح

بر مبنای نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و تولید اکسین جدایه‌ها، تعداد ۸ سویه از بین ۱۵ سویه دارای توان تولید آنزیم انتخاب و بر 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 کشت مایع TSB تلقیح و در دمای اتاق با ۱۴۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. همزمان یک ارلن تلقیح نشده از همان محیط کشت نیز بر روی شیکر قرار داده شد. برای یکسان کردن جمعیت باکتری‌های کشت داده شده، تراکم باکتری در هر سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر برابر یک تنظیم گردید. این سوسپانسیون‌ها به عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

استریل سطحی بذرها

بذر کلزا (*Brassica napus*) رقم هیولا ۳۰۸ از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر فراهم گردید. جهت استریل سطحی، بذرها به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و به مدت ۱۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد غوطه‌ور شدند. بمنظور حذف هیپوکلریت سدیم، بذرها ۱۰ بار با آب مقطر استریل شسته شدند.

کشت در گلدان‌ها

جهت کشت کلزا از گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر دهانهٔ ۱۲ سانتی‌متر محتوی ۴۰۰ گرم شن شسته شده با اسید و استریل شده در آون استفاده گردید. در این آزمون برای شور کردن بستر کشت در سطوح EC برابر ۶ و ۸ دسی‌زیمنس‌برمتر از یک محلول غلیظ NaCl استفاده شد. در هر گلدان تعداد ۱۰ عدد بذر کلزا در شرایط استریل کاشته شد و هنگام کاشت، هر بذر با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری موردنظر تلقیح گردید. برای گلدان‌های شاهد از ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون باکتری استفاده شد. پس از گذشت ۳ روز از کاشت، در هر گلدان تعداد ۶ گیاهچه که از حیث اندازه مشابه بودند نگه داشته شدند و بقیهٔ گیاهچه‌ها از گلدان‌ها خارج گردیدند. گلدان‌های کشت شده به مدت ۱۷ روز در اتاقک رشد با دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد و زمان روشنایی ۱۲ ساعت با شدت نور ۱۰۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها بصورت روزانه و با محلول غذایی هوگلند[2] انجام گرفت. در هفدهمین روز پس از کشت، ابتدا بخش‌هوایی نهال‌های کلزا از سطح خاک گلدان‌ها قطع و طول اندام هوایی، وزن تر و وزن خشک آنها اندازه‌گیری شد. سپس جداسازی ریشه‌ها از شن درون گلدان‌ها انجام گرفت و پس از بررسی مرفولوژی ریشه‌ها و عکسبرداری، طول و سپس وزن خشک ریشه‌ها 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.

نتایج

جداسازی و شناسایی جدایه‌های دارای توان تولید ACCدآمیناز

غربالگری جدایه‌ها از نظر توانایی مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن نشان داد که از بین ۱۰۵ جدایه تعداد ۱۵ جدایه قادر بودند که در محیط واجد ACC رشد کنند و بقیه جدایه‌ها فاقد این توانایی بودند. بر مبنای نتایج آزمونهای تعیین جنس و گونه جدایه‌های مذکور بجز جدایه ۴۸ تحت عنوان *P. fluorescens* نامگذاری شدند. جدایه ۴۸ با وجود دارا بودن واکنشهای کاتالاز و اکسیداز، به این دلیل که قادر به هیدرولیز آرژنین نبود ابتدا بنام *P. cichorii* نامگذاری شد ولی چون آزمون‌های بعدی بر روی این جدایه مانند رشد در دمای 4^{oC} ، ذوب ژلاتین، توانایی تشکیل لوان از سوکروز و آزمون احیای نیترات با نتایج مندرج درکتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی مطابقت نداشت لذا جدایه مذکور به صورت *Pseudomonas*

1- Salkowski reagent

2- Hogland

sp. معرفی گردید.

مقادیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و اکسین سویه‌های مورد آزمایش

مقادیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و مقدار تولید اکسین جدایه‌ها در جدول ۲ آمده است. همانطورکه نتایج نشان می‌دهند، فعالیت آنزیم ACC دآمیناز تولید شده توسط جدایه‌های مورد آزمایش متفاوت بوده و در دامنه‌ای از ۱/۴۳ تا ۸/۱۷ میکرومول آلفا- کتوبوتیرات برمیلی‌گرم در ساعت تغییر می‌کرد. همچنین تمامی سویه‌ها قادر به تولید اکسین بودند. مقدار تولید اکسین در محیط کشت TSB و بدون افزودن ال- تریپتوفان در بین سویه‌ها متفاوت بوده و در دامنه‌ای از ۰/۸ تا ۲/۳۸ میکروگرم در میلی‌لیتر تغییر می‌کرد.

بررسی تاثیر سویه‌های منتخب بر کاهش اثرات منفی شوری در گیاهچه‌های کلزا

بر پایهٔ داده‌های بدست آمده از نتایج تعیین فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و تولید اکسین، از بین ۱۵ سویه دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز تعداد ۸ سویه انتخاب و جهت تعیین تاثیر آنها بر تعدیل اثرات شوری ($EC = ۶$ و ۸ $dS.m^{-1}$) بکار برده شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر سویه‌های مورد آزمایش بر تمامی شاخصهای گیاه کلزا در سطح ۱٪ معنی‌دار بود. نتایج تجزیه واریانس همچنین نشان داد که تاثیر فاکتور شوری بر وزن تر اندام‌هوایی در سطح ۵٪ و طول ساقه در سطح ۱٪ معنی‌داری بود. اثرات متقابل سویه × شوری نیز صرفاً بر وزن خشک ریشه و طول ریشه (در سطح ۵٪) معنی‌دار بود (جدول ۳).

جدول ۲- مقادیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و IAA سویه‌های مورد آزمایش

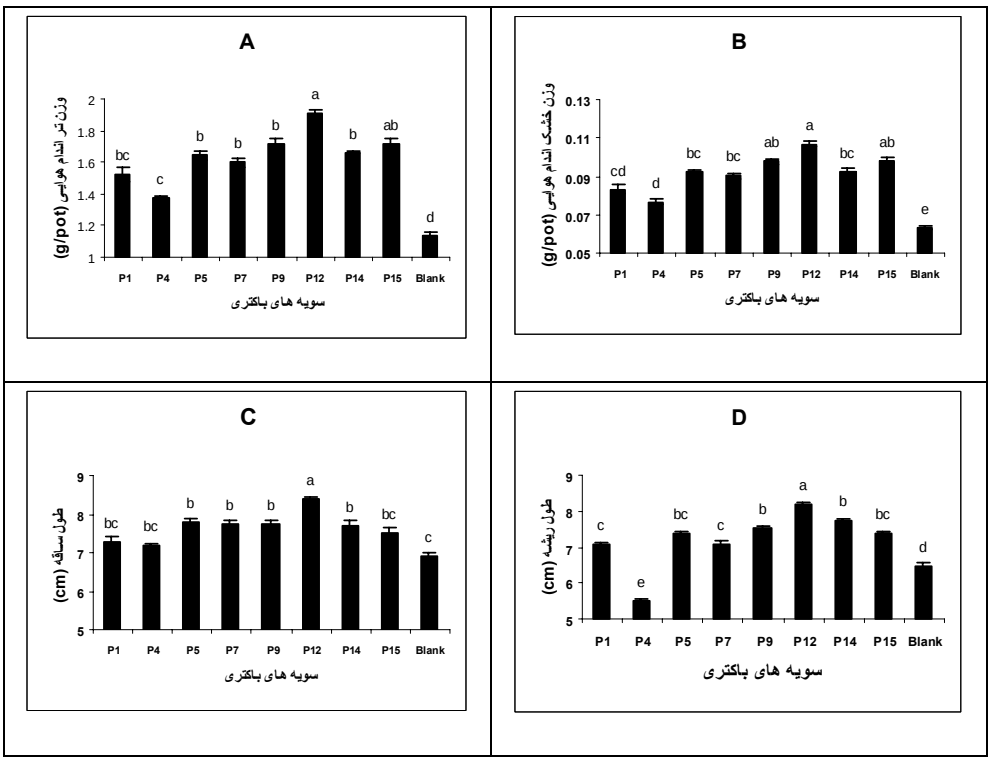
شماره جدایه	سویه	فعالیت ACC دآمیناز ($\mu moles.mg^{-1}.h^{-1}$)	مقدار تولید IAA $\mu g.ml^{-1}$
۲	*P . fluorescens* strain P1	۳/۴۵	۱/۳۵
۶	*P. fluorescens* strain P2	۳/۵۸	۱/۹۹
۲۶	*P. fluorescens* strain P3	۲/۱۰	۱/۵۲
۲۹	*P. fluorescens* strain P4	۸/۱۷	۲/۳۸
۴۵	*P. fluorescens* strain P5	۲/۴۷	۱/۵۷
۴۸	*Pseudomonas sp* strain P6	۴/۲۵	۱/۵۲
۵۸	*P. fluorescens* strain P7	۱/۴۳	۱/۳۰
۶۲	*P. fluorescens* strain P8	۱/۴۸	۰/۸۰
۶۷	*P. fluorescens* strain P9	۴/۴۵	۰/۹۳
۶۸	*P. fluorescens* strain P10	۲/۳۷	۱/۵۷
۷۱	*P. fluorescens* strain P11	۴/۳۳	۰/۹۵
۷۷	*P. fluorescens* strain P12	۴/۶۱	۱/۲۰
۸۲	*P. fluorescens* strain P13	۳/۵۶	۱/۴۲
۸۸	*P. fluorescens* strain P14	۳/۶۶	۲/۱۷
۹۹	*P. fluorescens* strain P15	۱/۹۱	۱/۹۶

جدول ۳- تجربه واریانس اثر باکتریهای مختلف و سطوح شوری بر شاخصهای رشد کلزا

		میانگین مربعات				
منابع تغییر	درجه آزادی	وزن تر اندام‌هوایی	وزن خشک اندام‌هوایی	وزن خشک ریشه	طول ریشه	طول ساقه
سویه	۸	۰/۲۹۶۳۰۲۱۷**	۰/۰۰۱۰۱۷۶۶**	^{ns}۰/۰۰۰۰۲۳۵۱	۳/۶۲۱۶۶۶۶۷**	۰/۱۲۹۱۶۶۶۷**
شوری	۱	۰/۱۳۴۴۴۰۵۸*	^{ns}۰/۰۰۰۰۲۸۳۱	^{ns}۰/۰۰۰۰۰۷۹۴	^{ns}۰/۰۶۰۰۰۰۰۰	۵/۱۶۴۶۲۹۶۳**
اثر متقابل	۸	^{ns}۰/۰۳۰۸۸۳۹۵	^{ns}۰/۰۰۰۰۹۵۰۲	۰/۰۰۰۰۳۱۳۳*	۰/۱۸۵۸۳۳۳۳*	^{ns}۰/۳۹۰۴۶۲۹۶
خطا	۳۶	۰/۰۲۶۲۰۹۴۹	۰/۰۰۰۰۸۲۱۶	۰/۰۰۰۰۱۳۱۱	۰/۰۷۷۰۳۷۰۴	۰/۲۴۸۷۰۳۷۰
CV	–	۱۰/۲۰۲۰۶	۱۰/۱۸۵۱۰	۱۸/۹۸۴۴۰	۳/۸۷۸۸۸۱	۶/۵۷۶۲۲۹۰

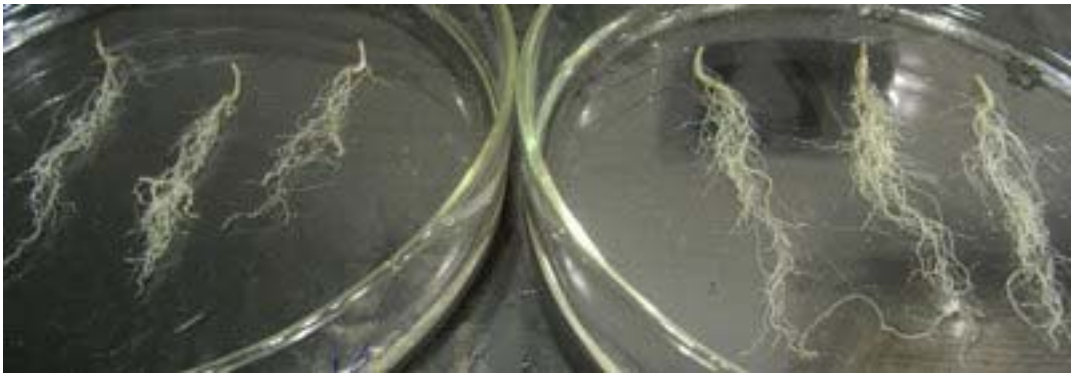
** ، *و ns – به ترتیب معنی دار در سطح ۱ درصد، ۵ درصد و غیر معنی دار

شکل۱ مقایسهٔ میانگین وزن تر اندام‌هوایی، وزن خشک اندام‌هوایی، طول ساقه و طول ریشه گیاهان کلزای تیمار شده با باکتری‌های مختلف و تحت شرایط شور را نشان می‌دهند. همانطور که مشاهده می‌شود، در مجموع دو سطح شوری (۸ $dS.m^{-1}$ و ۶ = EC) تمام سویه‌ها بجز P4 شاخص‌های رشد گیاهان تیمار شده را نسبت به شاهد افزایش داده‌اند و بجز در مورد طول ساقه و آن هم برای دو سویه P1 وP15 افزایش شاخص‌های رشد نسبت به شاهد از نظر آماری در سطح ۵٪ معنی‌دار بودند. در بین سویه‌های مورد آزمایش، سویهٔ P12 بیشترین تاثیر را بر شاخص‌های رشد داشت. بطوری که باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری با شاهد و همچنین اکثر سویه‌های مورد آزمایش شد. سویهٔ P12 وزن تر اندام‌هوایی، وزن خشک اندام‌هوایی، طول ساقه و طول ریشه را نسبت به شاهد به ترتیب ۶۷/۴ ، ۶۸/۷ ، ۲۱/۷ و ۲۶/۸ درصد افزایش داد.



شکل ۱- مقایسهٔ میانگین وزن تر اندام‌هوایی(A)، وزن خشک اندام‌هوایی(B)، طول ساقه(C) و طول ریشه(D) گیاهان کلزای تیمار شده با باکتری‌های مورد آزمایش

*- میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک هستند فاقد اختلاف معنی‌دار به روش دانگن می‌باشند.



شکل۲- از راست به چپ بترتیب مورفولوژی ریشه نهال‌های تیمار شده با باکتری P12 و شاهد بدون تلقیح درسطح شوری S2

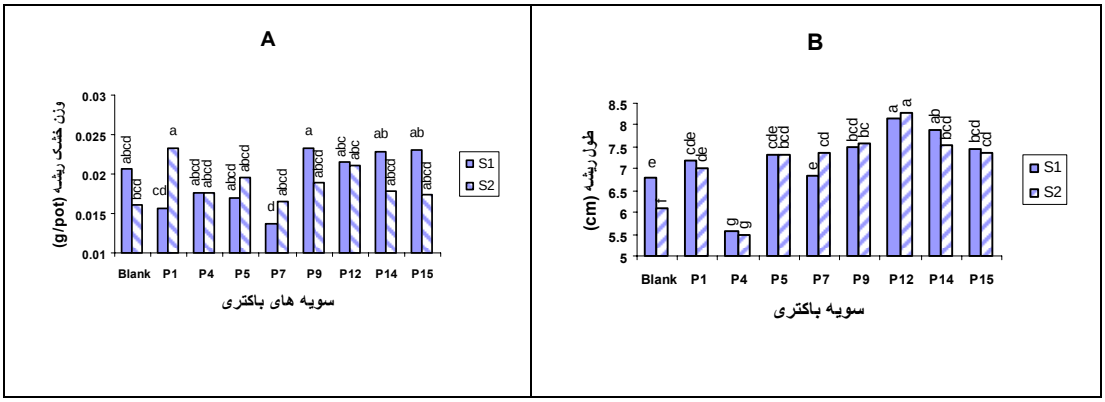
مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که وزن خشک ریشه در گیاهچه‌های کلزای تیمار شده با سویه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشت. با این وجود بررسی مرفولوژی ریشه نشان داد که گیاهان تیمار شده با سویه‌های مورد آزمایش در مقایسه با شاهد از طول، تراکم و انبوهی بیشتری برخوردار بودند، بطوری که بنظر می‌رسید تلقیح از طریق افزایش تعداد ریشه‌های جانبی و تارهای کشنده باعث افزایش سطح جذب ریشه‌ها نسبت به شاهد شده بود (شکل ۲).

مقایسهٔ میانگین وزن خشک ریشه گیاهان تیمارشده با سویه‌های مختلف باکتری در دو سطح شوری S1 و S2 (به ترتیب $dS.m^{-1}$ EC=6 و EC=8) نشان داد که بجز در مورد سویهٔ P1 ، در سایر سویه‌ها، بین وزن خشک ریشه در دو سطح شوری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. در تیمار کیاهان با سویه‌های P4، P9، P12، P14، P15 و همچنین در تیمار شاهد (بدون تلقیح) افزایش شوری از سطح S1 به S2 باعث کاهش وزن خشک ریشه و در بقیهٔ سویه‌ها موجب افزایش جزئی آن گردید. لیکن این افزایش معنی‌دار نشده نشد (شکل ۳a).

مقایسه میانگین طول ریشه در تیمارهای مختلف باکتری در دو سطح شوری S1 و S2 نشان داد که در تیمار شاهد (بدون باکتری) افزایش شوری از EC شش به هشت باعث کاهش معنی داری در طول ریشه شد (۱۱/۴ درصد). این در حالی بود که در تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های مختلف این کاهش به مراتب کمتر و در برخی موارد حتی باعث اندکی افزایش در طول ریشه شد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود بجز در سویهٔ P7 و تیمار شاهد، بین طول ریشه در دو سطح شوری اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (شکل ۳b).

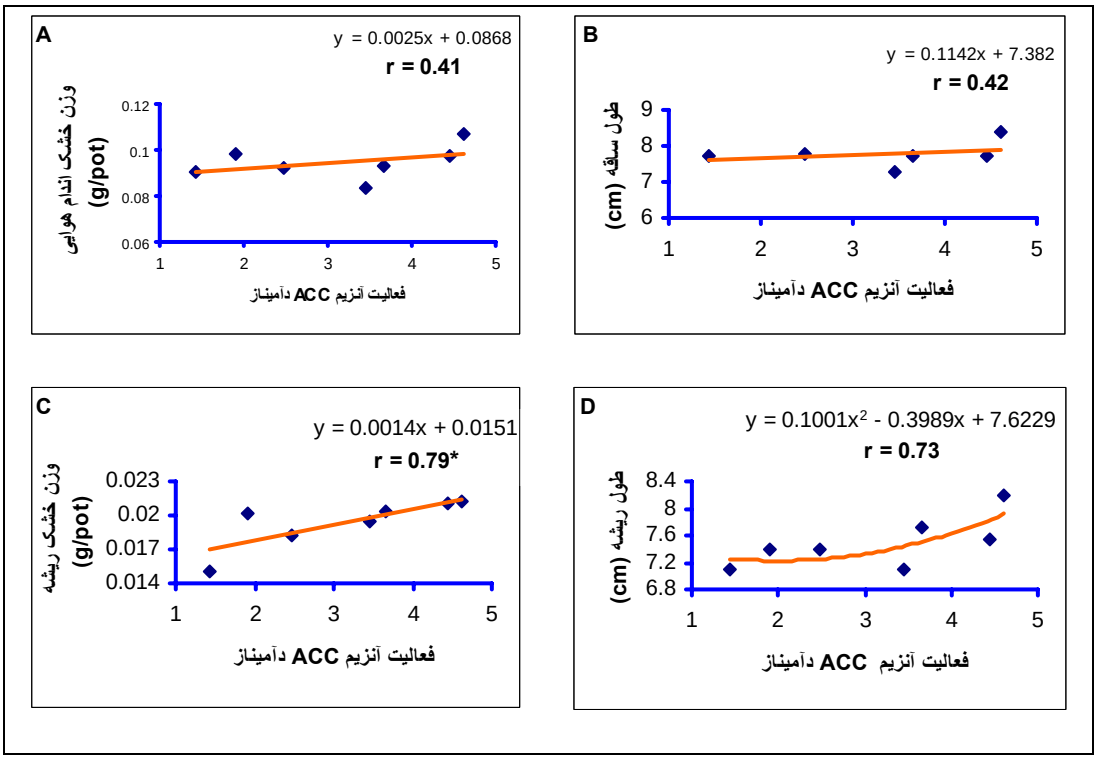
ضریب همبستگی (r) بین مقادیر وزن خشک اندام‌هوایی، طول ساقه، وزن خشک ریشه و طول ریشه گیاهان کلزای تیمار شده بوسیله باکتری‌ها (بجز سویه P4) با مقادیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتری‌ها تعیین گردید (شکل ۴). براساس این نتایج بین طول ریشه و وزن خشک ریشه با مقدار فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتری‌ها همبستگی بالایی وجود داشت (بترتیب ۰/۷۳ و ۰/۷۹*). همچنین بین وزن خشک اندام هوایی (r=۰/۴۱) و طول ساقه (r=۰/۴۲) با فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی همبستگی مثبت مشاهده شد. در مورد رابطه بین طول ریشه با مقدار فعالیت آنزیم ACC دآمیناز، چندین نوع معادله (خطی، لگاریتمی، نمایی، درجه۲ و...) بررسی شد و نهایتاً منحنی با معادله درجه ۲ بهترین همبستگی را نشان داد. این بدان معنا است که طول ریشه کلزای کشت شده در شرایط شور با توان ۲ مقدار فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتری مورد استفاده رابطه مستقیم داشت. از طرف دیگر ضریب همبستگی (r) بین وزن خشک ریشه و همچنین طول ریشه گیاهان تیمار شده با وزن خشک اندام‌هوایی نیز تعیین گردید. نتایج نشان داد که طول ریشه نسبت به وزن خشک ریشه همبستگی بالاتری با وزن خشک اندام‌هوایی گیاه (بترتیب ۰/۷۵ و ۰/۵۴) داشت. بنابراین بنظر میرسد طول ریشه شاخص مناسبتری جهت نشان دادن تاثیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی بر رشد گیاه باشد.

مقایسهٔ میانگین تاثیر دو سطح شوری S1 ($EC=6\ dS.m^{-1}$) و S2 ($EC=8\ dS.m^{-1}$) بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده در گیاهچه‌های کلزا (جدول ۴) نشان داد که افزایش شوری از ۶ به ۸ دسی زیمنس بر متر با کاهش معنی دار وزن تر اندام‌هوایی و طول ساقه همراه بود. در مورد وزن خشک اندام‌هوایی و طول ریشه اگرچه افزایش شوری از ۶ به ۸ دسی‌زیمنس بر متر باعث کاهش مقادیر این شاخص‌ها شد لیکن این کاهش از نظر آماری معنی‌دار نشد.



شکل ۳- مقایسه میانگین وزن خشک ریشه و طول ریشه نهال‌های کلزای تیمار شده با باکتری‌های مورد آزمایش در دو سطح شوری S1 و S2

*- میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک هستند فاقد اختلاف معنی‌دار به روش دانگن می‌باشند.



شکل٤- خطوط رگرسیون بین فعالیت آنزیم ACC دآمیناز با وزن خشک اندام‌هوایی (A)، طول ساقه(B)، وزن خشک ریشه(C) و طول ریشه(D) کلزا

جدول ٤- مقایسه میانگین سطوح شوری بر شاخصهای رشد کلزا

سطح شوری	وزن تر اندام‌هوایی (g/pot)	وزن خشک اندام هوایی (g/pot)	وزن خشک ریشه (g/pot)	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)
S1(EC=6)	A۱/۶۳۷	A۰/۰۹۰	A۰/۰۱۹	A۷/۱۸۹	A۷/۸۹۳
S2(EC=8)	B۱/۵۳۷	A۰/۰۸۸	A۰/۰۱۹	A۷/۱۲۲	B۷/۲۷۴

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک هستند فاقد اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

بحث

با در نظر داشتن ویژگی توان بالای کلنیزاسیون ریشه در انتخاب باکتری‌های مورد نظر، تعداد ۱۰۵ کلونی باکتری از رقت‌های بالای خاک ریزوسفری کلزا بصورت تصادفی خالص‌سازی شدند. نتیجهٔ کشت این ۱۰۵ جدایه روی محیط حداقل حاوی ACC ، نشان داد که ۱۵ جدایه دارای توان استفاده از ACC بعنوان تنها منبع نیتروژن بودند. رشد قابل ملاحظه این جدایه‌ها در محیط DF حاوی ACC در مقایسه با محلول DF بعنوان شاهد منفی می‌تواند حاکی از این امر باشد که این جدایه‌ها با دارا بودن آنزیم ACC دآمیناز توانسته‌اند ACC را هیدرولیز و از آن بعنوان منبع نیتروژن استفاده کنند (۲۲). وجود آنزیم ACC دآمیناز در تعداد زیادی از باکتری‌های محرک رشد گیاه و همچنین تعدادی از مخمرها و قارچها گزارش شده است (۲۳، ۳۱ و ۳۹). پس از غربالگری باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر کلزا بر مبنای توان آنها در مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن، شناسایی این جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های میکروسکوپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مندرج در کتاب برگی انجام گرفت. نتایج نشان داد که هر ۱۵ جدایه به گروه سودوموناس‌های فلورسنت تعلق داشتند. از بین این ۱۵ جدایه ۱۴ جدایه متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* بودند و جدایه ۴۸ به دلیل عدم مطابقت کامل با ویژگیهای عنوان شده برای گونه‌های این جنس به عنوان گونه شناسایی نشده (*Pseudomonas* sp.) در نظر گرفته شد. سودوموناس‌های فلورسنت گروه مهمی از سودوموناس‌ها هستند که بواسطهٔ توانائیشان در تولید رنگدانه‌های زرد – سبز محلول در آب بنام پیوردین‌ها (PVDs) که بعنوان سیدروفور عمل می‌کنند قابل شناسایی هستند (۳۳). سودوموناس‌های فلورسنت خاک‌زی بواسطهٔ داشتن خصوصیاتی چون تنوع کاتابولیکی، توانایی بالا در کلینزاسیون ریشه و قابلیت آنها در تولید محدوده وسیعی از آنزیم‌ها و مواد متابولیک از اهمیت خاصی برخوردارند و از مهمترین و پر شمارترین اعضای

جمعیت باکتریایی ریزسفر محسوب می‌شوند (۳۸).

فعالیت آنزیم ACC دآمیناز سویه‌های واجد این خصوصیت از طریق اندازه‌گیری غلظت α- کتوبوتیرات تولید شده بر واحد پروتئین سلولی در ساعت انجام گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم ACC دآمیناز تولید شده توسط سویه‌های مورد آزمایش در دامنه‌ای از ۱/۴۳ تا ۸/۱۷ میکرومول α- کتوبوتیرات بر میلی گرم در ساعت تغییر می‌کرد و بیشترین مقدار فعالیت آنزیم متعلق به سویه P4 بود. فعالیت آنزیم ACC دآمیناز توسط برخی محققین در تعدادی از باکتری‌های ریزوسفری و همچنین تعدادی از باکتری‌های نوترکیبی که ژن ACC دآمیناز را دریافت کرده بودند تعیین گردیده است (۵، ۱۹، ۲۸، ۲۹ و ۳۹).

۱۵ سویه سودوموناس فلورسنس دارای آنزیم ACC دآمیناز از نظر توان تولید اکسین نیز مورد بررسی قرار گرفتند. تعیین توانایی تولید اکسین سویه‌های مذکور در محیط کشت TSB و بدون افزودن تریپتوفان انجام گرفت. این محیط از نظر ترکیب شیمیایی بگونه‌ای است که به شرایط محیط پیرامون ریشه‌های گیاه که متاثر از ترشحات ریشه‌ای است نزدیکتر می‌باشد. نتایج نشان دادند که هر ۱۵ سویه مورد آزمایش قادر به تولید IAA بودند. گزارش شده است که ۸۰ درصد از باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر گیاهان مختلف قادر به تولید IAA هستند (۱۰). در تحقیق حاضر میزان تولید اکسین توسط سویه‌ها در محیط کشت TSB بین ۰/۸ تا ۲/۳۸ میکرومول در میلی‌لیتر متغیر بود که بیشترین مقدار توسط سویه P4 تولید می‌شد. تولید اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت یک خصوصیت بارز برای اکثر این باکتری‌ها است (۳).

شوری خاک یک معضل جهانی برای کشاورزی و بخصوص برای کشت آبی گیاهان زراعی می‌باشد، چرا که شوری خاک یک عامل بازدارنده رشد برای اکثر گیاهان است (۹). گزارش شده است که تنش شوری تولید اتیلن در گیاهان را افزایش می‌دهد (۱۲). از طرف دیگر مشخص شده که سطوح بالای اتیلن تاثیر تعدادی از تنش‌های محیطی را شدیدتر می‌کند (۲). در مواردی نشان داده شده است که حذف اتیلن تولید شده در نتیجه تنش، تاثیر تنش بر گیاه را کاهش می‌دهد (۱۷). یک راه جهت کاهش تولید اتیلن تنشی، تلقیح گیاه با یک باکتری دارای توان تولید ACC دآمیناز است. تولید اتیلن در شرایط تنش باعث کند شدن رشد ریشه و نهایتا رشد گیاه و نیز پیری در گیاهان می‌شود (۲۸ و ۴۰). سویه‌های PGPR که آنزیم ACC دآمیناز را در اختیار دارند می‌توانند از طریق این آنزیم پیش‌ساز اتیلن یعنی ACC را شکسته و بدین وسیله باعث کاهش سطح اتیلن در گیاهچه‌های در حال رشد یا گیاهان در معرض تنش شوند (۱۵، ۲۲، ۳۲، ۳۹ و ۴۰). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه که دارای آنزیم ACC دآمیناز باشند، می‌توانند از طریق کمک به تشکیل ریشه‌های بلندتر باعث افزایش بقای گیاهچه‌های گیاه بخصوص در چند روز اول بعد از کشت و در شرایط تنش‌های مختلف شوند (۱۹ و ۴۱). بعلاوه گیاهانی که با باکتری‌های PGPR دارای آنزیم ACC دآمیناز تیمار می‌شوند بطور چشمگیری نسبت به اثرات مضر اتیلن که متعاقب وقوع شرایط تنش تولید می‌شود مقاوم‌ترند (۳۱،۴۱،۱۸ و ۳۲) در هریک از این موارد باکتری‌های PGPR دارای آنزیم ACC دآمیناز سطح ACC در گیاهان تحت تنش را کاهش داده باعث می‌شوند که مقدار تولید اتیلن تنشی و متعاقباً خسارت ناشی از آن محدود گردد.

در تحقیق حاضر کوشش شد تا با اجرای یک آزمون گلدانی، تاثیر کاربرد سویه‌های سودوموناس فلورسنس دارای آنزیم ACC دآمیناز بر کاهش اثرات منفی شوری در گیاهچه‌های کلزا سنجیده شود. از این رو برپایه داده‌های منتج از آزمون‌های تعیین فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و تولید اکسین تعداد ۸ سویه انتخاب و در این آزمون گلدانی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج این آزمون نشان داد که تیمار گیاهان کلزا با این سویه‌ها در مجموع دو سطح شوری (EC = 6 and 8 $dS.m^{-1}$) باعث افزایش وزن تر اندام‌هوایی، وزن خشک اندام‌هوایی، طول ساقه، طول ریشه و وزن خشک ریشه نسبت به شاهد بدون تلقیح شدند. همچنین در بین سویه‌های مورد آزمایش، سویهٔ P12 بیشترین تاثیر را بر شاخص‌های رشد داشت، بطوری که باعث ایجاد اختلاف معنی‌داری با اکثر سویه‌های مورد آزمایش شد. افزایش شاخص‌های رشد گیاه را میتوان به توانایی این باکتری‌ها درتولید ACC دآمیناز نسبت داد. این باکتری‌ها بواسطه داشتن فعالیت آنزیم ACC دآمیناز، سطح اتیلن تنشی در گیاه را کاهش داده و باعث افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش شوری شده اند.

نتایج این تحقیق با یافته‌های حاصل از تحقیقات گذشته مطابقت دارد. گلیک و همکاران (۱۵) نشان دادند که باکتری *Pseudomonas putida* GR12-2 که یک باکتری PGPR و دارای آنزیم ACC دآمیناز است رشد گیاهچه‌های کلزا را در حضور غلظت بالای نمک (NaCl) افزایش داد. آنها نشان دادند که کاربرد این باکتری باعث افزایش طول ریشه، وزن خشک ریشه، طول اندام‌هوایی و وزن خشک اندام‌هوایی شد.

مایاک و همکاران (۳۲) نشان دادند که باکتری *Achromobacter Piechoudii* ARV8 که یک باکتری PGPR و دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز است توانست وزن تر و خشک نهال‌های گوجه‌فرنگی را در حضور ۱۷۲ میلی‌مول‌درلیتر نمک NaCl بطور قابل ملاحظه‌ای افزایش دهد. به عقیده مایاک و همکاران تأثیر باکتری درکاهش اثرات تنش شوری بر گیاه بواسطه تأثیری است که این باکتری بر کاهش اتیلن داشته است.

همچنین ساراواناکومار و سامی‌یاپان (۳۸) نیز گزارش کردند سویه *P. fluorescens* واجد توان تولید ACC دآمیناز در مقایسه با سایر سویه‌های فلورسنس مورد آزمایش که فاقد این آنزیم بودند در حضور

غلظت بالای نمک تاثیر قابل ملاحظه‌ای بر افزایش شاخص‌های رشد نهال‌های بادام‌زمینی داشت.

نکته قابل توجه اینکه در بین سویه های مورد آزمایش در این آزمون، سویه P4 بیشترین مقدار فعالیت آنزیم ACC دآمیناز را به خود اختصاص داده بود ($\mu mole.mg^{-1}.h^{-1}$ ۸/۱۷) و سویه P12 با مقدار فعالیت آنزیم برابر با $\mu mole.mg^{-1}.h^{-1}$ ۴/۶۱ بعد از سویه P4 قرار می‌گرفت. از آنجا که بسیاری از محققین، مهمترین عامل افزایش تحمل گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های PGPR در مقابل تنش‌های محیطی و از جمله غلظت بالای نمک را تولید ACC دآمیناز توسط این باکتری‌ها می‌دانند، لذا انتظار می‌رفت که سویه P4 بیشترین تاثیر را بر افزایش تحمل گیاه به شوری داشته باشد ولی همانطور که نتایج نشان دادند نه تنها سویه P4 بیشترین تاثیر را بر افزایش شاخص‌های رشد گیاه نداشت بلکه نسبت به سایر سویه‌ها نیز تاثیر آن کمتر بود. در این خصوص می‌توان دو فرضیه را مطرح کرد اول اینکه تولید مقادیر بالاتر اکسین در سویه P4 نسبت به سایر سویه‌ها ممکن است از طریق افزایش تولید ACC و به تبع آن اتیلن تنشی در گیاه باعث کاهش رشد ریشه و متعاقب آن کاهش رشد اندام‌های‌هوایی شده باشد. بررسی مورفولوژی ریشه گیاهان تیمار شده با سویه P4 نیز نشان داد که طول ریشه و همچنین تراکم و انبوهی ریشه‌های جانبی در این تیمار نسبت به سایر تیمارها و حتی در مواردی شاهد بدون تلقیح کمتر بود. ثابت شده است که مقادیر بالای اکسین باکتریایی می‌تواند یک عامل بازدارنده در رشد ریشه و در نتیجه رشد گیاه باشد. چنانچه IAA باکتریایی، مقدار IAA درون بافت‌های ریشه را به بیش از حد مورد نیاز خود افزایش دهد ممکن است با تحریک فعالیت آنزیم ACC سنتاز و افزایش میزان ACC (پیش ماده اتیلن) پس از جوانه زنی بذر، رشد و توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان متوقف شود (۱۶). از طرف دیگر تولید اکسین در سویه P12 در حد متوسط بود و لذا ممکن است کمتر بودن تولید اکسین در سویه P12 نسبت به P4 و بیشتر بودن فعالیت آنزیم ACC دآمیناز آن نسبت به سایر سویه‌ها بجز P4 باعث ایجاد یک تعادل مثبت در جهت کاهش تولید ACC در گیاه و افزایش رشد ریشه شده باشد. دوم اینکه ممکن است سویه P4 به رغم تولید اکسین زیادتر و فعالیت آنزیم ACC دآمیناز بالاتر، از طریق تولید احتمالی یک متابولیت مضر که در شرایط تنش تولید آن تحریک شده باشد گیاهچه‌های کلزا را تحت تاثیر قرار داده و در نتیجه باعث کاهش رشد ریشه و مقادیر سایر شاخص‌های رشد نسبت به گیاهچه‌های کلزای تیمار شده با سویه‌های دیگر شده باشد.

نتایج همبستگی (r) بین شاخصهای رشد گیاهان تیمار شده توسط سویه‌های باکتری با مقادیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتری‌های مورد آزمایش نشان داد که بین وزن خشک ریشه و طول ریشه با مقدار فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتریهای همبستگی بالایی وجود داشت (بترتیب* ۰/۷۹ و ۰/۷۳). همبستگی بالای بین وزن خشک ریشه و طول ریشه با مقادیر فعالیت آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی تلویحاً نشان میدهد که این آنزیم در کم کردن مقادیر اتیلن تنشی و در نتیجه افزایش رشد ریشه گیاه نقشی اساسی دارد. از طرف دیگر همبستگی بالای بین طول ریشه (۰/۷۵) و وزن خشک ریشه (۰/۵۴) با وزن خشک اندام‌هوایی گیاه و همچنین همبستگی بین وزن خشک اندام هوایی (r=۰/۴۱) و طول ساقه (r=۰/۴۲) با فعالیت آنزیم ACC دآمیناز نشان میدهد که تاثیر مثبت آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی بر رشد اندام هوایی و بعبارت دیگر رشد گیاه از طریق تاثیری است که این آنزیم بر رشد وتوسعه سیستم ریشه‌ای دارد. لازم به ذکر است که به عقیده پنروز و گلیک (۳۶) بالا بودن میزان فعالیت ACC دآمیناز، ضرورتاً به معنی تاثیر بیشتر آن سویه در افزایش رشد گیاه نمی‌باشد. امروزه محققین سنتز باکتریایی هورمون گیاهی IAA و تنظیم باکتریایی تولید اتیلن در گیاهچه‌های جوان را مهمترین مکانیسم باکتری‌های PGPR در تحریک رشد گیاهان می‌دانند. تنظیم باکتریایی تولید اتیلن در گیاه، از یک سو تحت تأثیر فعالیت آنزیم ۱- آمینو سیکلو پروپان-۱-کربوکسیلات دآمیناز (ACC دآمیناز) باکتریایی و از سوی دیگر متأثر از هورمون گیاهی IAA است (۱۶). همانطور که اشاره شد باکتری‌های مورد آزمایش علاوه بر آنزیم ACC دآمیناز، اکسین نیز تولید می‌کردند. بدیهی است که تاثیر مثبت سویه‌ها بر رشد کلزا حاصل اثرات هریک بطور جداگانه و اثرات پیچیده متقابل این دو ویژگی است. مدل ارائه شده توسط گلیک و همکاران (۱۶) اثر متقابل آنزیم ACC دآمیناز و اکسین باکتریایی بر کاهش تولید اتیلن و افزایش رشد ریشه گیاهان تلقیح شده با این باکتریها را بخوبی توضیح میدهد. در این مدل ارتباط بین اتیلن و IAA و چگونگی تاثیر آنزیم ACC دآمیناز بر کاهش اثر بازدارندگی IAA (از طریق تجمع اتیلن) شرح داده شده است.

نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که افزایش شوری از ۶ به ۸ وزن تر اندام‌هوایی و طول ساقه گیاهچه‌های کلزا را بطور معنی‌داری کاهش داد. اگرچه کلزا (*Brassica napus*) جزء مهمترین گیاهان روغنی جهان است ولی اطلاعات زیادی در مورد تأثیر شوری خاک بر رشد و عملکرد آن وجود ندارد. آزمایشات مزرعه‌ای که بمنظور بررسی تأثیر شوری روی صرفاً عملکرد دانه (بدون تعیین سایر شاخصهای رشد) انجام گرفته نشان می‌دهند که هم کلزا و هم خردل هندی (*Brassica Juncea*) به شوری نسبتاً مقاوم هستند (۴ و ۲۱). گوتیرز و همکاران (۲۰) در تحقیقی تأثیر افزایش غلظت نمک در خاک بر روی تندش، رشد ریشه و اندام‌های هوایی و همچنین ترکیب دانهٔ یک رقم کلزا (*Brassica napus*) را بررسی کردند. بدین منظور آنها با استفاده از نمک NaCl خاک‌هایی با ECهای مختلف (۲/۳ تا ۱۰/۳ دسی‌زیمنس‌برمتر) تهیه نمودند. نتایج آزمایش نشان داد که تندش بذر در EC بالاتر از ۶ دسی‌زیمنس‌برمتر به طور چشمگیری کاهش یافت.

همچنین در خاک‌هایی با EC بالاتر از ۶ دسی‌زیمنس‌برمتر ظهور برگ‌ها به تأخیر افتاد. علاوه بر این، افزایش سطح شوری ارتفاع گیاه، تعداد غلاف و تعداد دانه در گیاه را کاهش داد، لیکن این کاهش تعداد دانه با افزایش وزن دانه‌ها جبران شد. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد شوری بالاتر از ۶ دسی‌زیمنس‌برمتر اثر منفی بر رشد ریشه داشت.

مدیریت روشهای بیولوژیک، شامل شناسایی مکانیسمهای گیاهان در تحمل به شوری و غربالگری و اصلاح ارقام جدید، از راهکارهای مهم کاهش اثرات مضر شوری در کشاورزی بوده است (۳۷). امروزه استفاده از مهندسی ژنتیک در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به شوری، کاربرد باکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) و نیز استفاده از قارچهای مایکورایزا به منظور تسهیل رشد گیاهان زراعی در خاکهای شور مورد توجه فراوان قرار گرفته است.

منابع

1- Adolphe D. 1980. Canola rapeseed corn. Agriculture Canada CPS Food, Ltd. University of Saskatchewan.
2- Abeles F.B., Morgan D.W., and Saltveit M.E. 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd (Ed). Academic Press, New York.
3- Ahmad F., Ahmad L., and Saghir M. 2005. Indole acetic acid production by the indogenous isolates of *Azotobacter* and *Pseudomonas fluorescens* in the presence and absence of tryptophan. Turk. J. Biol. 29-34.
4- Banuelos G.S., Meek D.W., and Hoffman G.J. 1990. The influence of selenium, salinity, and boron on selenium uptake in wild mustard. Plant and Soil, 127: 201-206.
5- 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.
6- 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.
7- 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.
8- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-258.
9- Cuartero J., and Fernandez-Munoz R. 1999. Tomato and salinity. Sci. Hort. 78: 83-125.
10- Dobbelaera S., Vanderleyden J., and Okon Y. 2003. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22: 107-149.
11- Dworkin M., and Foster J. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. J. Bacteriol. 75:592-601.
12- Feng J., and Barker A.V. 1992. Ethylene evolution and ammonium accumulation by tomato plants under water and salinity stresses. Part II. J. Plant Nutr. 15: 2471-2490.
13- Glick B.R., Karaturovic D.M., and Newell P.C. 1995. A novel for rapid isolation of plant growth-promoting pseudomonads. Can. J. Microbiol. 41: 533-536.
14- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.
15- 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.
16- Glick B.R., Penrose D.M., and Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth- promoting bacteria. J. Theor. Biol. 190: 63-68.
17- Glick B.R. 2004. Bacteria ACC deaminase and the alleviation of plant stress. Adv. Appl. Microbiol. 56: 291-312.
18- Grichko V.P., and Glick B.R. 2000. Identification of DNA sequence that regulate the expression of the enterobater cloacae VW4 1-aminocyclopropane-1-deaminoase gene. Can. J. Microbiol. 46: 1159-1165.
19- 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.
20- 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. Agron. Crop Sci. 172: 182-187.
21- Holm H.M. 1978. Soil salinity crop tolerance testing. Proceeding of the meeting of the subcommission on salt affected soils at the 11th International Soil Science Society Congress. Edmonton, Canada. 11-30.
22- Jacobson C.B., Pasternak J.J., and Glick B.R. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Can. J. Microbiol. 40: 1019-1025.
23- Jia Y.J., Ito H., and Honma M. 2000. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase induced by ACC

synthesized and accumulated in *Penicillium citrinum* intracellular spaces. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 299-305.
24- Klee H.J., Hayford M.B., Kretzmer K.A., Barry G.F., and Kishore G.M. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. Plant Cell. 3: 1187-1193.
25- Kloepper J.W., Lifshittz R., and Zablotowicz R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enchancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7: 39-43.
26- Krieg N.R. 1984. Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology. Vol (1). Williams & Wilkins Press.
27- Lifshitz R., Kloepper J.W., Kozlowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E.M., and Zaleska I. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Can. J. Microbiol. 33: 390-395.
28- Ma W., Sebestianova B.R., Sebestian J., Burd G.I., Guinel F.C. and Glick B.R. 2003a. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. Antonie Van Leeuwenhoek. 83: 285-291
29- Ma W., Guinel F.C., and Glick B.R. 2003b. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4396-4402.
30- Maas E.V., and Hoffman G.J. 1977. Crop salt tolerance. Current assessment. J. Irrig. Drain. Div. Am. Soc. Civ. Eng. 103: 115-134.
31- Mayak S., Tirosh T., and Glick B.R. 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and pepers. Plant Sci. 66: 525-530.
32- 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.
33- Meyer J.M., Hall F., Hohnadel D., Lemanceau P., and Rateflarlvelo H. 1987. Siderophores of Pseudomonas biological properties. In Iron Transport in Microbes. Plant and Animals. pp. 18-205.
34- Minami R., Uchiyama K., Murakami T., Kawai J., Mikami K., and Yamada T. 1998. Properties, sequence and synthesis in *E.coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. J. Biochem. 123: 1112-1118.
35- Patten C.L., and Glick B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42**:**207-220.
36- Penrose D.M., and Glick B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118: 10-15.
37- Poustini K., and Siosemardeh A. 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. Field Crops Res. 85:125-133.
38- Saravanakumar D., and Samiyappan R. 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) Plants. J. Appl. Microbiol. 102: 1283-1292.
39- Shah S., Li J., Moffatt B.A., and Glick B.R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 44: 833-843.
40- Sheehy R.E., Honma M., Yamada M., Sasaki T., Martineau B., and Hiatt W.R. 1991. Isolation, sequence, and expression in *Eschmichia coli* of the *Pseudomonas* sp. strain ACP gene encoding 1- aminocyclopropane-l-carboxylate deaminase. J. Bacteriol. 173: 5260-5265.
41- Wang C., Knill E., Glick B.R., and Defago G. 2000. Effects of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonase fluorescens* strain CHAO and its *gac*A derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. Can. J. Microbiol. 46:898-907.
42- 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. 25, No. 1, Mar-Apr 2011, p. 29-41

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۱، فروردین – اردیبهشت ۱۳۹۰، ص. ۴۱-۲۹

Isolation, Identification and Effectiveness of ACC Deaminase Producing Rhizobacteria on the Alleviation of Salinity Stress Effects on Canola Growth

A. Akhgar[1*]- K. Khavazi[2]- N. Khakipoor[3]

Received:25-10-2009
Accepted:8-1-2011

Abstract

The aim of the present research was to isolate plant growth promoting rhizobacteria producing ACC deaminase which was able to alleviate negative effects of salinity on plant growth. 21 composite soil samples and Canola roots were collected from the saline and relatively saline soils of Qom and Qazvin provinces. 105 strains were selected from the soil rhizosphere of Canola. According to the growing abilities of the strains in the minimum media of DF having ACC, as the only source of nitrogen, it was determined that 14 strains had the ability to produce ACC deaminase. Identification of strain was carried out according to Bergey's manual criteria. Results indicated that all the strains belonged to the group of fluorescent Pseudomonads. According to the tests, related to strain determination, 14 strains were identified as *P. fluorescent*. Measuring ACC deaminase activity showed that the activity of this enzyme in the isolated strains differed from 1.43 to 8.17 µmol α-ketobutyrate/mg/hr. Also the isolates produced IAA in TSB medium between 0.8 – 2.17 µmol/ml. In the present study, effect of selected strains on reducing negative effects of salinity on Canola seedlings growth was evaluated under greenhouse conditions. Under salinity stress, all ACC deaminase producing strains were able to increased canola growth parameters containing shoot fresh and dry weight, shoot and root length. Among tested strains, P12 was the most effective. There was a high correlation between root length and dry matter, and the activity of ACC deaminase producing bacteria. Also with increase salinity from 6 to 8 dS/m, shoot fresh weight and stem length were significantly decreased.

Keyword: ACC deaminas, *Pseudomonas*, Canola, Salinity

1- Assistant Professor of Soil Science Department, Vali-e-Asr University
(*-Corresponding Author Email: arakhgar@yahoo.com)
2- Assistant Professor of Soil and Water Research Institute
3- Assistant Professor of Islamic Azad University, Savadkooh Branch