تأثیر سودوموناسهای فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase در تعدیل اثرات مضر شوری بر کلزا در مرحله جوانه زنی

فرزاد جلیلی،[۱*] کاظم خاوازی، ابراهیم پذیرا، علیرضا نجاتی و هادی اسدی رحمانی

دانشجوی دکتری خاکشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران؛ **farjalili@yahoo.com**

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ **kkhavazi@yahoo.com**

استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران؛ **ebrahimpazira@yahoo.com**

کارشناس میکروبیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب؛ **enajati@yahoo.com**

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ **asadi_1999@yahoo.com**

چکیده

شوری، یکی از مهمترین تنش های غیر زنده ای است که باعث کاهش قابلیت تولید محصول در خاکهای مناطق خشک و نیمه خشک می شود. به منظور جداسازی و تعیین خصوصیات محرک رشد سودوموناسهای فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase وبررسی تأثیر آنها بر جوانه زنی ارقام کلزا در سطوح مختلف شوری، پژوهشی در۷ مرحله اجرا شد. در مرحله اول، جدایه های دارای فعالیت آنزیم مذکور به روش نیمه کمی غربال گری شدند. در مراحل بعدی آزمایش، فعالیت آنزیم در شرایط شور، سنتز مواد شبه اکسین، تولید سیانید هیدروژن واندازه گیری کمی فعالیت آنزیم بر اساس میزان الفاکتوبوتیرات آزاد شده، بررسی گردید. به منظور مطالعه تأثیر شوری بر جوانه زنی، ابتدا برای هر رقم کلزا، آزمایشی به صورت فاکتوریل و درقالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکراراجرا گردید. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از فاکتور شوری با سه سطح۰/۰۰۴، ۱۱ و ۲۲dS/m از منابع NaCl و $CaCl_2$ با نسبت اکی والانی یکسان و فاکتور باکتری که شامل ۹ سویه با شماره های P196، P169، P108، P11، P153، P74، P79، P159، P4 و یک تیمار بدون باکتری به عنوان شاهد بود. با استفاده از نتایج این قسمت، سویه های برتر که بیشترین تأثیر را در جوانه زنی و رشد داشتند انتخاب و آزمایش دیگری به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از فاکتور رقم شامل رقم هایHayola308 و RGS003، فاکتور شوری با سه سطح ۸،۱۱ و ۱۴ dS/m از منابعNaCl و $CaCl_2$ با نسبت اکی والانی یکسان و فاکتور سویه که شامل چهار باکتری با شماره های P196، P169، P108، P11 و یک تیمار بدون باکتری به عنوان شاهد بود. نتایج نشان داد که ۱۴ درصد سویه ها دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase بودند. بررسی ویژگی فوق الذکر در شرایط شور نشان داد که سویه ها در شرایط تنش شوری نیز قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن هستند. بررسی سنتز مواد شبه اکسین و سیانید هیدروژن بیانگر وجود تفاوتها از نظر این دو مشخصه در بین سویه ها بود. اندازه گیزی فعالیت آنزیم ACC Deaminase نیزنشان داد که میزان فعالیت آنزیم سویه ها متفاوت می باشد، نتایج بررسی رشد ارقام کلزای تلقیح شده با سویه های منتخب نشان داد که میزان جوانه زنی در جدایه هایی که دارای فعالیت آنزیم مذکور هستند نسبت به شاهد و نیز نسبت به جدایه های فاقد این ویژگی بیشتر بوده است به طوری که این تفاوتها در شرایط شور بسیار محرز بود. بنابراین به نظر می رسد که با تلقیح بذرهای کلزا با انواع برتر این سویه ها مانند P108 و P169، تحمل به شوری افزایش یافته و به تبع آن میزان جوانه زنی و رشد گیاهچه نیز بیشتر خواهد شد.

واژه های کلیدی: اتیلن، تنش شوری، سودوموناس های فلورسنت، کلزا، ACC Deaminase

---

۱- نویسنده مسئول، آدرس: خوی، کیلومتر ۵ جاده خوی سلماس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوی

* دریافت:۸۶/۳/۲۳ و پذیرش:۸۶/۱۲/۲۲

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

فرایندهای طبیعی تشکیل خاک در نواحی گرم و خشک غالباً منجر به تشکیل خاکهای شور شده که از لحاظ کشاورزی از پتانسیل پایینی برخوردار می باشند. در این نواحی بیشتر محصولات زراعی تحت شرایط آبیاری رشد می کنند و مدیریت نامناسب آبیاری منجر به ایجاد شوری ثانویه می گردد. شور شدن ۲۰ الی ۲۷درصداز خاکهای مناطق تحت آبیاری دنیا به این عامل نسبت داده شده است (Yeo,1999;Ghassemi *et al*.,1995).بر اساس برآورد سازمان ملل متحد،تقریباً ۵۰ درصد از زمین های زراعی قابل کشت دنیا تحت تنش شوری قرار دارند (Flowers & Yeo,1995). طبق آمار موجود، سطح کلی خاکهای شور ایران نیز ۷/۳۳ میلیون هکتار برآورد شده است (Dewan & Famuri, 1964) و پیش بینی می شود این رقم به علت استفاده نادرست از منابع آب و خاک افزایش یابد.

شناسایی مکانیسم های تحمل به شوری در گیاهان، غربال گری و اصلاح واریته های جدید، از مهمترین راهکارها برای کاهش اثرات مضر شوری در کشاورزی محسوب می شوند (shraf & McNielly, 2004; Poustini & Siosemardeh, 2004).با شناخت هر چه بیشتر مکانیسم های تحمل به شوری در گیاهان و همچنین نحوه تأثیر شوری بر عملکرد و اجزاء آن، امکان دستیابی به روشهای جدید تر برای مقابله با این تنش غیر زنده بیشتر فراهم می گردد. یکی از دلایل کاهش یا عدم رشد گیاه در شرایط تنش های غیرزنده ای چون شوری، تجمع اتیلن در گیاه می باشد (Mayak *et al*.,2004a). در این شرایط مقدار ACC[1] (ماده پیش ساخت اتیلن) در داخل گیاه افزایش می یابد که پیامد آن، افزایش سنتز اتیلن در بافتهای گیاهی می باشد (Lynch & Brown, 1997;Glick *et al*., 1997,1998; Mayak *et al*., 2004a,b). اگر چه اتیلن در رشد و توسعه گیاه و رسیدگی میوه اهمیت زیادی دارد با این حال افزایش غلظت اتیلن درون زاد در گونه های گیاهی، بویژه در بیشتر دولپه ایها، می تواند باعث کاهش جوانه زنی و رشد ریشه گردد (Belimov *et al*., 2001). در مدل ارائه شده توسط Glick و همکاران (۱۹۹۸) پیشنهاد شده است که باکتریهای ریزوسفری با توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase می توانند میزان اتیلن گیاه را کاهش دهند و در نتیجه اثرات سوء شوری را تعدیل نمایند. در این مدل باکتریهای با ویژگی فوق به سطح بذر چسبیده و در پاسخ به تریپتوفان و یا دیگر اسید های آمینه ترشح شده از بذر، ایندول استیک اسید (IAA) سنتزمی کنند (Whipps, 1990). ایندول استیک اسید ممکن است توسط بذر جذب و با اضافه شدن به منبع درون زاد آن، باعث تحریک رشد سلولهای گیاه، طویل شدن آنها یا تحریک سنتز آنزیم ACC Synthase گردد که این آنزیم S-andenosyl-L-Metionine را فوراً به ACC تبدیل می کند (Yang & Hoffman,1984; Li *et al*.,2000; Kende, 1993). مقدار زیادی از ACC تولید شده توسط این واکنش از بذر جوانه زده به خارج ترشح شده و توسط آنزیم ACC Deaminase باکتری به α-ketobutyrate وآمونیاک هیدرولیز می شود. هیدرولیز ACC توسط باکتری مستقر در خارج گیاه موجب کاهش میزان ACC موجود در ریزوسفر و اندوریزوسفر می گردد. بنابراین به منظور حفظ تعادل بین مقدار ACC داخل و خارج ریشه، گیاه بایستی میزان ترشح ACC به بیرون را افزایش دهد. در نتیجه، کاهش میزان ACC در داخل گیاه منجر به کاهش مقدار اتیلن در داخل آن و متعاقباً طویل شدن ریشه گیاهچه می گردد (Glick *et al*.,1998). محققان زیادی اثرات مثبت باکتریهای ریزوسفری دارای آنزیم ACC Deaminase و در نتیجه افزایش رشد گیاه در شرایط تنش زا مثل غرقاب (Grichko & Glick,2001)، آلودگی به فلزات سنگین (Grichko *et al*.,2000; Burd *et al*.,1998)، حضور بیمارگرهای گیاهی (Wang *et al*.,2000) و شوری و خشکی (Mayak *et al*., 2004 a,b) را گزارش کرده اند. در نتیجه، گیاهانی که با باکتری های ریزوسفری محرک رشد دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase تلقیح شده اند بایستی ریشه های بلندتر و نیز بخش هوایی بیشتری داشته باشند (Glick *et al* .,1997). تلقیح گیاهان کلزا، کاهو، گوجه فرنگی و گندم با *Pseudomonas putida* GR12-2 که دارای آنزیم ACC-Deaminase بود، موجب طویل شدن ریشه ها و افزایش رشد آنها شده است (Belimov *et al*.,2001; Hall *et al*.,1996) همچنین تلقیح کلزا با این باکتری در شرایط تنش دما (سردی هوا) و شوری موجب شد تا وزن خشک ریشه و بخش هوایی گیاهچه ها مشابه تیمارهای بدون تنش باشد (Belimov *et al*., 2001; Glick *et al*.,1997). تلقیح گوجه فرنگی با باکتری *Achromobacter piechaudii* نیز وزن تازه و خشک گوجه فرنگی را در غلظت نمک ۱۷۲میلی مولار NaCl افزایش و تولید اتیلن را کاهش داد اما بر میزان سدیم گیاه تأثیری نداشت. همچنین تلقیح کارایی مصرف آب و طول گیاهچه های کوچک را در شرایط شور افزایش داد (Mayak *et al*.,2004a). ایشان نتیجه گیری کردند که

1- Amino Cyclopropane-1-Carboxylate

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری از طریق آنزیم ACC-Deaminase و کاهش تولید اتیلن توسط گیاهچه ها، مقاومت گیاه را به تنش شوری افزایش داده است. کوتاه شدن و طویل شدن ریشه می تواند متأثر از سایر ویژگی های باکتری مانند تولید اکسین و یا سیانید هیدروژن نیز باشد. هورمونهای گیاهی و بالاخص اکسین نقش مهمی در کنترل رشد و توسعه گیاه دارند. تولید این هورمون توسط باکتریهای ریزوسفری یکی از عوامل افزایش رشد گیاهان است (Frankenberger & Arshad,1995). اثر تنظیم کنندگی اکسین در گیاه به غلظت آن بستگی دارد، به طوری که غلظت پائین آن ممکن است رشد را تحریک کند در حالیکه غلظت بالای آن اثر بازدارندگی بر رشد دارد (Frankenberger & Arshad, 1995). تلقیح بذرهای کلزا با باکتری *Pseudomonas putida* GR12-2 با قدرت تولید سطوح پائین اکسین، منجر به افزایش ۲ الی ۳ برابر طول گیاهچه شد (Patten & Glick,1996).

با توجه به گستردگی قابل تأمل خاکهای شور در ایران و نیاز فراوان کشور به اراضی جدید برای کشت کلزا، ضرورت داشت در زمینه استفاده از روشهای بیولوژیک برای توسعه کشت کلزا در این اراضی تحقیقاتی صورت بگیرد. در این تحقیق سعی شده تا ابتدا باکتری های سودوموناس فلورسنت بومی بعضی از خاکهای ایران از نظر پتانسیل تولید آنزیم ACC Deaminase بررسی شوند و سپس تأثیر آنها بر کاهش اثرات شوری بر جوانه زنی کلزا مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین به منظور تفسیر بهتر نتایج و امکان تداخل بعضی از صفات باکتری در تعدیل اثرات شوری، توان تولید هورمون اکسین و سیانید هیدروژن آنها نیز اندازه گیری شد.

مواد و روشها

در این تحقیق ۲۵ جدایه *Pseudomonas fluoresces* و ۲۵ جدایه *Pseudomonas putida* از کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب به طور تصادفی انتخاب و برای آزمایش های بعدی بر روی محیط شیب دار حاوی محیط کشت KingB (King *et al.*, 1954) و همچنین آب مقطر استریل نگهداری شدند.

آزمایش اول - غربال گری باکتری ها از نظر استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

برای انتخاب جدایه های قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن از روش Dell'Amico و همکاران (۲۰۰۵) و با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور سه نوع محیط کشت مایع شامل ۱- محیط حداقل نمکهای DF (Dworkin & Foster, 1958)، (در هر لیتر شامل ۴گرم KH_2PO_4، ۶گرم Na_2HPO_4، ۰/۲گرم $MgSO_4$، ۱میلی گرم $FeSO_4$، ۱۰میکروگرم H_3BO_3، ۱۰ میکروگرم $MnSO_4$، ۷۰میکروگرم $ZnSO_4$، ۵۰میکروگرم $CuSO_4$و ۱۰میکروگرم MoO_3 با ۲گرم گلوکز، ۲گرم گلوکونیک اسید و ۲ گرم سیتریک اسید) و بدون منبع نیتروژن به عنوان شاهد منفی،۲- محیط حداقل نمکهای DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم به عنوان شاهد مثبت و ۳- محیط حداقل نمکهای DF حاوی ۳ میلی مولار ACC تهیه گردید. برای تکثیر باکتری های مورد نظر یک لوپ پر از هرجدایه به ارلن ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع TSB[1] (در هر لیترشامل ۲/۵ گرم دکستروز، ۲/۵ گرم $K2HPO_4$، ۵ گرم NaCl، ۳ گرم پپتون سویا و ۱۷ گرم تریپتون) به صورت استریل منتقل و برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکرانکوباتور دار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از سه محیط حداقل نمکهای DF مشروح تلقیح گردید و مجدداً در همان شرایط ذکر شده قبلی نگهداری شد. پس از ۴۸ ساعت، میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Dell'Amico *et al.*,2005). پس از بررسی نتایج، این آزمایش مجدداً در سه تکرار برای جدایه های دارای توانایی استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن تکرار شد.

آزمایش دوم- بررسی تأثیر شوری بر رشد وتوانایی باکتریهای منتخب در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

بدین منظور ابتدا شش نوع محیط کشت مایع زیر تهیه گردید:

۱- محیط حداقل نمک های DF بدون منبع نیتروژن به عنوان شاهد منفی،

۲- محیط حداقل نمکهای DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم به عنوان شاهد مثبت،

۳- محیط حداقل نمک های DF حاوی ۳ میلی مولارACC،

۴- محیط حداقل نمک های DF حاوی ۳ میلی مولار ACC و پنج گرم در لیتر NaCl ،

۵- محیط LB (Luria & Burrous,1955) (شامل پپتون ۱۰ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۵ گرم در لیتر با اضافه کردن کلرید سدیم به مقدار ۵گرم در لیتر (LB+S1).

۶- محیط LB با ۱۰ گرم در لیتر NaCl (LB+S2).

1- Trypton Soya Broth

Archive of SID

www.SID.ir

سپس یک لوپ پراز باکتریهای منتخب از مرحله قبل به ارلن های حاوی۲۰میلی لیترمحیط TSB منتقل و برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گرادو و چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن های ۵۰ میلی لیتری محتوی ۲۰ میلی لیتر از محیط های با مشخصات ذکر شده در بالا تلقیح و مطابق شرایط قبلی نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت، میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر و با استفاده ازاسپکتروفتومتر قرائت شد.

آزمایش سوم- بررسی توانایی جدایه ها از نظر تولید مواد شبه اکسین

اندازه گیری توانایی تولید اکسین با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف سالکووسکی (Salkowski) انجام شد. بدین منظوریک لوپ پر ار باکتری های منتخب به محیط مایع TSB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر تریپتوفان (ماده پیش ساز اکسین) منتقل و برای مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. محتویات ظروف به لوله های سانتریفوژ منتقل و برای مدت ۵ دقیقه با چرخش ۷۱۶۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی با معرف سالکووسکی (مخلوط ۲ میلی لیتر از محلول ۰/۵ مولار $FeCl_3$ و۹۸ میلی لیتر از محلول۳۵ درصد $HClO_4$) به نسبت ۲ به ۱ مخلوط و بعد از گذشت ۲۵ دقیقه و سانتریفوژ مجدد در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد، میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد(Benizri *et al.*,1998) . در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد غلظت اکسین تولید شده توسط هر جدایه تعیین گردید.

آزمایش چهارم- تولید سیانید هیدروژن

برای اندازه گیری سیانید هیدروژن ابتدا جدایه ها در پلیت های حاوی محیط TSA (۱۵گرم کازئین هیدرولیز شده به طریقه آنزیمی، ۵ گرم آرد سویای هضم شده به وسیله آنزیم پپسین، ۵ گرم کلرید سدیم، ۱۵گرم آگار و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر، پ هاش ۷/۲) غنی شده با گلایسین (۴/۴ gr/L) کشت داده شدند. سپس کاغذهای صافی خیسانده شده در پیکرات سدیم (مخلوط پیکریک اسید ۰/۵٪ و کربنات سدیم ۲٪) در قسمت داخلی درب هر پلیت گذاشته شد. پلیت ها به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی گردید (Donate-correa *et al.*, 2004).

آزمایش پنجم- اندازه گیری فعالیت آنزیم ACC Deaminase

در این آزمایش، فعالیت آنزیم ACC Deaminase جدایه هایی که قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند، اندازه گیری شد (Honma & Shimomura 1978;Penrose and Glick, 2003). مراحل اندازه گیری به شرح زیر بود.

- یک لوپ پر از هر جدایه مورد نظر به دو ارلن پنجاه میلی لیتری حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط TSB منتقل شد.
- ارلن های تلقیح شده، به مدت یک شب بر روی شیکر انکوباتوردار با ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تکان داده شدند.
- محتویات ارلن ها به لوله های سانتریفوژ منتقل و برای مدت ۱۰دقیقه با سرعت g ۸۰۰۰ ودر دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند.
- محلول روئی خارج و سلولهای باقی مانده در ته لوله ها با ۵ میلی لیتر از محیط حداقل نمک های DF شستشو داده شد.
- محتویات لوله ها مجدداً برای مدت ۱۰دقیقه با سرعت g ۸۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد.
- محلول روئی لوله ها خارج شد و متعاقباً سلول های باقی مانده در ته لوله های سانتریفوژ با ۷/۵ میلی لیتر از محیط حداقل نمک های DF مخلوط و سپس کل محتویات به یک ارلن استریل جدید اضافه شد.
- محلول ۰/۵ مولار ACC در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شد از فریزر خارج و در دمای محیط آزمایشگاه ذوب گردید. آنگاه مقدار ۴۵ میکرولیتر از آن به سوسپانسیون باکتری اضافه شد.
- سوسپانسیون باکتری برای مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تکان داده شد.
- سپس محتویات ارلن به مدت ۱۰دقیقه و با دور ۸۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و پس از آن محلول روئی خارج گردید.
- سلول های باقی مانده در ته ارلن ها با ۵ میلی لیتر از Tris- HCl (یک دهم مولار،۷/۶ pH) مخلوط شدند.
- مجدداً محتویات لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و محلول روئی دور ریخته شد. این دو مرحله مجدداً دو بار تکرارگردید.
- سلولهای فوق در یک میلی لیتر از Tris-HCl (یک دهم مولار، ۷/۶ pH) مخلوط کرده و سپس کل محتویات به لوله های ۱/۵ میلی لیتری میکروسانتریفوژ منتقل شد.

Archive of SID

www.SID.ir

– محتویات برای مدت ۵ دقیقه با دور g۱۶۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و سپس محلول روئی خارج گردید.
– سلول های باقی مانده در ته لوله در ۶۰۰ میکرولیتر Tris-HCl (یک دهم مولار، pH ۸/۵) مخلوط گردید، و به محلول فوق ۳۰ میکرولیتر تولوئن اضافه شد. محلول نهایی به مدت ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس شد.
به منظور اندازه گیری پروتئین ۱۰۰ میکرولیتر از محلول برداشت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد. از این به بعد برای هر باکتری یا هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد.
– دویست میکرو لیتر از سلول های تولوئنی شده (مرحله ۱۷) به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری جدید اضافه شد. سپس بیست میکرو لیتر از محلول ACC نیم مولار به آن اضافه شد.
– محلول فوق به اختصار ورتکس شده و برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگه داری گردید و به محلول فوق یک میلی لیتر HCl (۰/۵۶ مولار) اضافه شد.
– محلول نهایی با استفاده از ورتکس مخلوط و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور g ۱۶۰۰۰ و در دمای اتاق سانتریفوژ شد.
– یک میلی لیتر از محلول روئی برداشته شد و با ۸۰۰ میکرولیتر از HCl (۰/۵۶ مولار) ورتکس گردید.
– سیصد میکرولیتراز 2,4dinitrophenylhydrazine (0.2% 2,4dinitrophenylhydrazine در HCl ۲مولار) به لوله قبلی اضافه شد.
– محتویات لوله ورتکس گردید و آنگاه برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگه داری شد.
– پس از آن به محلول فوق، ۲میلی لیتر NaOH ۲ مولار اضافه شد و سپس مخلوط گردید تا یکنواخت شود. سپس جذب نوری (absorbance) در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید.
منحنی استاندارد با استفاده از آلفاکتوبوتیریک اسید و غلظت پروتئین سوسپانسیون سلولی در سلولهای تولوئنی شده با استفاده از روش Bradford (1976) تعیین گردید. برای تهیه منحنی استاندارد پروتئین از بووین سرم آلبومین BSA[1], استفاده شد (Penrose & Glick, 2003; Belimov *et al.*,2005).بعد از بدست آوردن میزان پروتئین و آلفاکتوبوتیرات، فعالیت آنزیم براساس میکرومول آلفاکتوبوتیرات آزاد شده در میلی گرم پروتئین در ساعت گزارش شد.

آزمایش ششم- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله اول)

بدین منظور آزمایشی با دو رقم کلزا به نام های Hayola308 و RGS003 به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. سطوح شوری شامل۰/۰۰۴ (آب مقطر)، ۱۱و۲۲ دسی زیمنس بر متر بود که از منابع NaCl و $CaCl_2$ با نسبت اکی والانی یکسان تهیه شد. تیمار باکتری نیز شامل ۹ سویهء P153، P74، P169، P159، P108، P79، P11، P4 و یک تیمار بدون باکتری بود که باکتری های P74 و P153 به عنوان شاهد منفی بدون فعالیت آنزیم ACC Deaminase در نظر گرفته شدند. به منظور تهیه مایه تلقیح یک لوپ پر از هر یک از جدایه ها به ارلن ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰میلی لیتر از محیط کشت DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم منتقل و برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری به ارلن های ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط DF حاوی سه میلی مولار ACC منتقل و مجدداً برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار بادمای ۲۸ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سوسپانسیون باکتری با دورg ۹۰۰۰ سانتریفوژ و پس از دور ریختن محلول بالایی، سلول های باکتری دو بار با ۰/۰۳MgSO4 مولار شستشو داده شد (Penrose & Glick,2003). پس از آن بذرهای استریل سطحی شده کلزا برای مدت یک ساعت در داخل سوسپانسیون باکتری نگهداری گردید. سپس محلول اضافی خارج شد و بذور به پتری دیش های حاوی کاغذ صافی استریل انتقال داده شدند تا رطوبت اضافه خود را از دست بدهند. برای تهیه بذور تیمار شاهد همانند مرحله قبل عمل شد با این تفاوت که بذرهای استریل شده به جای سوسپانسیون باکتری در ۰/۰۳MgSO4 مولار قرار داده شدند. سپس به هر پتری دیش ۶ میلی لیتر آب مقطر و یا محلول نمکی مورد نظر اضافه شد و به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انتقال داده شد. به منظور پایش تبخیر نیز در داخل یک سری پتری دیش های اضافی آب مقطرگذاشته شد. بعد از ۷۲ ساعت، درصد جوانه زنی و بعد از ۱۴۴ ساعت درصد جوانه زنی، طول ریشه و طول اندام هوائی اندازه گیری گردید.

آزمایش هفتم- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله دوم)

بر اساس نتایج آزمایش قبل و به منظور بررسی دقیق تر تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا

1- Bovin Serum Albomin

Archive of SID

www.SID.ir

در شرایط تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. فاکتور های آزمایش عبارت بودند از فاکتور رقم شامل رقم های Hayola308 و RGS003، فاکتور شوری با سه سطح ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی زیمنس بر متر از منابع NaCl و $CaCl_2$ با نسبت اکی والانی یکسان و فاکتور باکتری که شامل چهار باکتری با شماره های P196، P169، P108، P11 و یک تیمار بدون باکتری به (عنوان شاهد) بود. کلیه شرایط آزمایش همانند آزمایش شماره شش بود و بعد از سپری شدن ۱۴۴ ساعت درصد جوانه زنی، طول ریشه، طول اندام هوایی، وزن تازه و وزن خشک گیاهچه تعیین گردید.

تجزیه های آماری

تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت و مقایسه میانگین ها بر مبنای آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

۱- غربال گری باکتری ها از نظر توان استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

توان جدایه ها در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن متفاوت بود.از میان ۲۵جدایه *P. fluorescens* فقط سه جدایه به شماره های P169، P79 و P196 قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند.

به طوری که میزان رشد این باکتری ها در محیط با منبع نیتروژن ACC به ترتیب۷۹،۷۳ و ۷۱ درصد محیط با منبع نیتروژن قابل استفاده برای تمام باکتری ها یعنی سولفات آمونیوم بود (جدول۱). از میان ۲۵ جدایه *P.putida* نیز فقط چهار جدایه به شماره های P4، P11، P108 و P159 قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند. میزان رشد این باکتری ها در محیط با منبع نیتروژنه ACC به ترتیب ۶۱ و ۵۸ و ۶۷ و ۶۶ درصد محیط با منبع نیتروژن قابل استفاده سولفات آمونیوم بود. بنابراین از ۵۰ جدایه مورد مطالعه ۷ جدایه قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند که احتمالاً توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase را داشته (شکل۱) و برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

۲- بررسی تأثیر شوری بر رشد و توانایی باکتریهای منتخب در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

با افزایش شوری محیط LB از ۵ درصد به ۱۰درصد، رشد باکتری ها کاهش نیافت. اضافه کردن پنج گرم در لیتر NaCl به محیط DF حاوی ACC نیز تأثیر قابل ملاحظه ای بر رشد باکتری نداشت. به عبارت دیگر این باکتری ها قادر بودند تا در شرایط شوری پنج گرم در لیتر NaCl نیز از ACC به عنوان منبع نیتروژن استفاده نمایند. البته واکنش جدایه های مختلف نسبت به اضافه کردن نمک به محیط DF حاوی ACC متفاوت بود بطوری که اضافه کردن نمک در مورد جدایه های شماره P11، P159، P169 و P4 موجب افزایش و در مورد جدایه های شماره P108، P196 و P79 موجب کاهش رشد شد (جدول۲). معهذا تغییرات در سطح پنج در صد معنی دار نبود.

۳- بررسی توانایی جدایه ها از نظر تولید مواد شبه اکسین

توانایی تولید مواد شبه اکسین باکتری های مورد مطالعه از۶/۱ تا ۶۷/۹ میلی گرم در لیتر متغیر بود (جدول۳).

۴- بررسی توانایی جدایه ها از نظر تولید سیانید هیدروژن

نتایج نشان داد که فقط جدایه P159 دارای توانایی تولید سیانید هیدروژن بود (جدول۳).

۵- اندازه گیری فعالیت آنزیم ACC Deaminase

میزان فعالیت آنزیم ACC Deaminase باکتری های مورد مطالعه از ۲/۳۰۵ تا۵/۰۳۰ میکرومول الفا کتوبوتیرات در هر میلی گرم پروتئین در ساعت متغیر بود (جدول۳).

۶- بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله اول)

نتایج این مرحله در جداول ۴ و ۵ ارائه شده و نشان می دهد که در شرایط غیر شور، تلقیح بذر رقم RGS003 با باکتریهای P.p.4 و P.f.153 پس از سه روز و تلقیح بذر با باکتریهای P.p.108 وP.f.153 پس از شش روز درصد جوانه زنی را نسبت به شاهد تلقیح نشده بطور معنی داری ($P<0.05$) کاهش داد. در این شرایط در اثر تلقیح بذر با باکتری P.p.159 و P.p.153 طول ریشه نیز بطور معنی داری ($P<0.05$) کاهش یافت ولی تلقیح بذر با باکتری P.f.79 بطور معنی داری ($P<0.05$) موجب افزایش طول اندام هوایی گردید. در شرایط شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر، باکتریهای P.p.74، P.p.159، P.p.4 پس از ۳ و ۶ روز و باکتری P.f.79 فقط پس از ۶ روز درصد جوانه زنی رقم RGS003 را بطور معنی داری ($P<0.05$) نسبت به شاهد تلقیح نشده کاهش دادند. در حالیکه تلقیح با باکتری P.f.169 پس از ۳و۶ روز و باکتری P.f.153 پس از ۶ روز درصد جوانه زنی را بطور معنی داری ($P<0.05$) افزایش داد. تلقیح با باکتریهای P.p.4 و P.p.159 موجب کاهش معنی دار ($P<0.05$) طول ریشه و تلقیح با باکتریهای P.f.169,P.f.196 موجب افزایش معنی دار ($P<0.05$) طول ریشه شد. در این شرایط تأثیر باکتریهای P.p.4 و P.p.159 بر کاهش طول اندام هوایی نیز معنی دار ($P<0.05$) بود، ولی باکتری P.p.108 موجب افزایش معنی دار ($P<0.05$)

Archive of SID

www.SID.ir

طول اندام هوایی شد. در شرایط شوری ۲۲ دسی زیمنس بر متر فقط تلقیح با باکتری P.f.169 موجب افزایش معنی دار ($P<0.05$) جوانه زنی پس از۳ روز در رقم RGS003 شد. در این سطح از شوری، تلقیح بذر تأثیر معنی داری بر افزایش طول ریشه و اندام هوایی نشان نداد. در خصوص رقم Hayola308، در شرایط غیر شور تلقیح بذر با باکتری P.f.196 پس از ۳ روز و تلقیح بذر با باکتریهای P.f.196، P.p.159، P.p.4 پس از ۶ روز درصد جوانه زنی را به طور معنی داری ($P<0.05$) کاهش داد. باکتریهای P.f.196، P.f.79 طول اندام هوایی را به طور معنی داری ($P<0.05$) افزایش دادند و این در حالی بود که باکتری P.f.153 موجب کاهش معنی دار ($P<0.05$) طول اندام هوایی شد. در شرایط شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر، تلقیح با باکتریهای P.f.169، P.p.159، P.p.108، P.f.79، P.p.11، P.p.4 پس از ۳ و ۶ روز درصد جوانه زنی را به طور معنی داری ($P<0.05$) افزایش داد. طول ریشه در اثر تلقیح با باکتریهای P.f.169، P.p.108 و P.p.74 بطور معنی داری ($P<0.05$) افزایش یافت. تلقیح با باکتریهای P.p.4 و P.p.159 موجب کاهش معنی دار طول اندام هوایی و تلقیح با باکتریهای P.f.169، P.p.108 و P.f.196 موجب افزایش معنی دار طول اندام هوایی گردید. در شرایط شوری ۲۲ دسی زیمنس بر متر، تلقیح بذرها فقط باسویه P.f.169 موجب افزایش معنی دار ($P<0.05$) جوانه زنی پس از ۳ و۶ روز شد. طول ریشه و اندام هوایی را هم افزایش داد گرچه این افزایش به سطح معنی داری نرسید.

۷- بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله دوم)

نتایج این مرحله در جدول ۶ ارائه شده است نشان می دهد که در شرایط شوری ۸ دسی زیمنس بر متر، تلقیح بذرهای رقم Hayola308 با باکتریهای P.p.108، P.p.11 و P.f.196 جوانه زنی را بطور معنی داری افزایش داد. تلقیح با باکتریهای P.p.11 و P.p.108 طول اندام هوایی هر دو رقم کلزای مورد مطالعه را بطور معنی داری افزایش داد. باکتریهای P.p.108 و P.p.11 طول ریشه رقم های Hayola308 و RGS003 را بطور معنی داری افزایش دادند. تلقیح رقم Hayola308 با باکتری P.p.108 و تلقیح رقم RGS003 با سویه های P.p.11 و P.f.169 موجب افزایش معنی دار وزن تازه گیاهچه شد. در شرایط شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر، تلقیح رقم Hayola308 با هر چهار سویه منتخب و تلقیح رقم RGS003 با باکتریهای P.p.108 و P.f.169 جوانه زنی را بطور معنی داری افزایش داد. تلقیح با سویه P.p.108 طول اندام هوایی رقم Hayola308 و تلقیح با باکتریهای P.f.169 و P.f.196 طول اندام هوایی رقم RGS003 را به طور معنی داری افزایش داد. طول ریشه رقم Hayola308 در اثر تلقیح با باکتری P.f.108 و طول ریشه رقم RGS003 در اثر تلقیح با تمام سویه های منتخب بطور معنی داری افزایش یافت. تلقیح رقم Hayola308 توسط باکتریهای P.p.108 و P.f.196 و همچنین تلقیح رقم RGS003 با باکتریهای P.p.108 و P.f.169 موجب افزایش معنی دار وزن تازه گیاهچه آنها شد. وزن خشک گیاهچه فقط در مورد رقم RGS003 و در اثر تلقیح با باکتری P.f.196 به طور معنی داری افزایش یافت. در شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر تلقیح رقم Hayola308 با سویه های P.p.108، P.p.11 و P.f.196 و تلقیح رقم RGS003 با باکتری های P11 و P196 طول اندام هوایی را به طور معنی داری افزایش داد. طول ریشه (رقمHayola308) در اثر تلقیح با باکتری هایP.p.108 و P.p.159 و طول ریشه رقم RGS003 نیز در اثر تلقیح باکتری های P.p.108 وP.f.196 به طور معنی داری افزایش یافت. وزن تر گیاهچه های رقم Hayola308 نیز در اثر تلقیح با باکتری P108 و وزن تر گیاهچه رقمRGS003 در اثر تلقیح با باکتری های P.p.108 وP.f.196 افزایش یافت.

بحث

آنزیم ACC Deaminase در طیف وسیعی از باکتری های آزادزی خاک بخصوص سودوموناس ها، قارچها . (Honma & Shimomura,1978; Glick *et al* (1995) و همچنین باکتریهای اندوفیت (Sessitsch *et al*., 2005) گزارش شده است. با این وجود غربال گری تعداد زیادی از سویه ها بر اساس فعالیت آنزیم ACC Deaminase به دلیل وقت گیر بودن و مراحل طولانی اندازه گیری فعالیت این آنزیم مشکل می باشد و معمولاً بدین منظور از مقایسه رشد سویه ها در سه محیط کشت با منابع نیتروژن معدنی معمول و ACC و بدون منبع نیتروژن استفاده می شود (Dell Amico *et al*., 2005). در این تحقیق نیز با استفاده از این روش از تعداد ۵۰ سویه مورد مطالعه، ۷ سویه (۱۴ درصد سویه ها) قادر به رشد در محیط با منبع نیتروژن ACC بودند که احتمالاً به دلیل توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase بوده است. در خصوص توانایی سودوموناس های فلورسنت در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و به عبارت دیگر تولید آنزیم ACC Deaminase، گزارشات متعددی ارائه شده است (Hall *et al*., 1996; Wang *et al*., 2000; Penrose *et al*., 2001). در جدایه هایی که توسط Ma و همکاران (۲۰۰۳) از خاکهایی با موقعیت های جغرافیایی مختلف خاکها جداسازی شده بود مشخص شد که ۵ سویه از ۱۷ سویه ریزوبیومی (۲۹ درصد سویه ها) دارای فعالیت آنزیم

Archive of SID

www.SID.ir

ACC Deaminase بوده و گره زایی گیاهان لگوم مختلف را تحریک کردند.

با توجه به آنکه هدف اصلی این تحقیق استفاده از باکتری های با ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase برای تعدیل اثرات شوری بر کلزا بود و اطلاعی از حفظ این ویژگی در باکتریهای بومی در شرایط شور نبود، آزمایشی در این خصوص طراحی گردید. براساس نتایج بدست آمده، ۷ سویه منتخب دارای توانایی رشد در محیط کشت با منبع نیتروژن ACC و در ضمن قادر به حفظ این توانایی تا یک درصد NaCl بودند. مایاک و همکاران (۲۰۰۴a) نیز نشان دادند که سویه *Achromobactier piechaudii* ARV8 جداسازی شده از خاکهای شور، تا شوری ۲۰۷ میلی مولار NaCl ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase را دارا بودند.

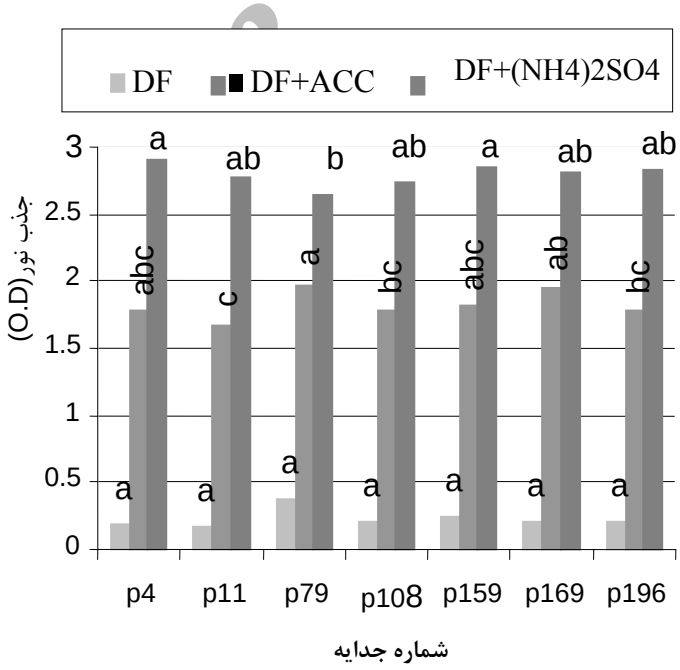
به منظور تأیید توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase توسط ۷ سویه منتخب، فعالیت این آنزیم اندازه گیری شد که نتایج موید انتخاب درست سویه ها بود به طوری که هر ۷ سویه منتخب از این ویژگی برخوردار بودند. فعالیت این آنزیم در جدایه های مورد مطالعه از ۲/۳۰۵تا ۵/۰۳۰ میکرومول الفا کتوبوتیرات در هر میلی گرم پروتئین در ساعت متغیر بود. Penrose و Glick (۲۰۰۳) پیشنهاد کرده اند که هر باکتری با فعالیت آنزیم ACC Deaminase بیش از ۲۰ نانومول الفاکتوبوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت می تواند به عنوان PGPR محسوب شده و شاخص های رشد گیاه را افزایش دهد. بالا بودن میزان فعالیت این آنزیم، ضرورتاً به معنی تأثیر بیشتر آن سویه در افزایش رشد گیاه نمی باشد. این فعالیت در جدایه های مورد مطالعه Belimove و همکاران (۲۰۰۵) نیزاز ۰/۷ تا۱۰/۵ میکرومول الفاکتوبوتیرات برمیلی گرم پروتئین در ساعت متغیر بود. در جدایه های مورد مطالعه Ma و همکاران (۲۰۰۳) میزان فعالیت آنزیم مذکور ۱/۵۶ تا ۲۰/۴۸ میکرومول الفاکتو بوتیرات در هر میلی گرم پروتیین در ساعت متغیر بود.

یک باکتری محرک رشد گیاه عموماً دارای مجموعه ای از فعالیت های محرک رشد گیاهی (PGP) است که برآیند تعامل این صفات می تواند در یک یا چند مرحله خاص از رشد گیاه و بسته به شرایط محیطی حاکم بر رشد، منجر به افزایش یا کاهش صفات مورد نظر اعم از جوانه زنی، طول ریشه، اجزاء عملکرد و عملکرد محصول گردد. اثبات یا رد تغییر یک ویژگی در گیاه تلقیح شده با یک سویه PGPR تنها به دلیل وجود صفت معینی در این سویه فقط از طریق ایجاد موتانت سویه مذکور امکان پذیر می باشد. در این تحقیق هدف آن بود که با غربال گری باکتریهای PGPR از نظر ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase بتوان سویه های با این توانایی را برای تعدیل اثرات شوری بر رشد کلزا معرفی نمود. برای مقایسه از سویه های بدون ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase همان باکتری ها به عنوان شاهد استفاده شد. نتایج آزمایش در مرحله اول بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا نشان داد که ممکن است باکتری موجب افزایش یا کاهش صفت مورد نظر گردد. در این خصوص در کلزا رقم RGS003 سویه های P.p.4 و P.f.153 پس از سه روز و سویه های P.p.108 و P.f.153 پس از ۶ روز جوانه زنی را به طور معنی داری کاهش دادند. در این شرایط باکتریهای P.p.159 و P.f.153 طول ریشه را به طور معنی داری کاهش دادند. هر چند به غیراز باکتری های P.f.153 و P.p.74، سایر باکتریهای مذکور دارای توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase بودند، ولی ممکن است این سویه ها دارای ویژگیهای دیگری نیز باشند که پارامتر های فوق را تحت تأثیر قرار دهد. به عنوان مثال ممکن است تأثیر منفی باکتری P.p.159 به دلیل تولید سیانید هیدروژن باشد. علاوه بر سیانید هیدروژن تولید بعضی از متابولیت های ثانویه (Stougaard, 2000)، منجمله اتیلن (Frankenberger & Arshad,1995) واکسین زیاد(Patten & Glick,2002) می تواند دلیل کاهش پارامتر های فوق الذکر باشد. در مجموع نتایج این بخش نشان داد که در رقم RGS003 سویه P.f.169 می تواند میزان جوانه زنی پس از ۳و۶ روز و همچنین طول اندام هوایی و ریشه را در شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر و حتی جوانه زنی پس از ۳ روز را در شرایط ۲۲ دسی زیمنس بر متر بطور معنی داری افزایش دهد. افزایش طول ریشه کلزا رقم RGS003 در شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر در تیمار با باکتری P.f.196 نیز معنی دار بود. تأثیر باکتریها بر افزایش قدرت جوانه زنی و همچنین افزایش سایر پارامترهای مورد مطالعه در شرایط شور با میزان فعالیت آنزیم ACC Deaminase باکتری همخوانی نداشت. بطوریکه در رقم RGS003 هر چند که سویه P.p.108 بیشترین فعالیت آنزیم ACC Deaminase را داشت ولی نسبت به سویه P.f.169 که دارای فعالیت آنزیمACC Deaminase کمتری بود، تأثیرات چندان قابل ملاحظه ای نداشت. با در نظر گرفتن اثر باکتریهای مورد مطالعه بر روی ارقام Hayola308 و RGS003 در نهایت باکتریهای P.f.169، P.p.108، P.p.11 و P.f.196 برای بررسی بیشتر در دامنه شوری ۸ تا ۱۴ دسی زیمنس بر متر انتخاب شدند. بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد دو رقم کلزا در مرحله دوم آزمایش نشان داد که جدایه P.p.108 تمامی

Archive of SID

www.SID.ir

فاکتورهـای مـورد مطالعـه در کلـزای رقـم Hayola308 و برخی از فاکتورهـای کلـزای رقـم RGS003 را نـسبت بـه شاهد افزایش معنی دار داد. در مورد بقیه جدایه ها هرکدام از آنها فقط بعضی از فاکتورهای مورد مطالعه را در هـر دو رقم به طور معنی داری افزایش دادنـد کـه ایـن اثـرات در کلزای رقم RGS003 تیمار شده با بـاکتری P.f.196 بیـشتر بوده اسـت مقایـسه جوانـه زنـی و رشـد کلـزا در سـطوح مختلف شوری در مرحله اول با مرحله دوم آزمایش، حاکی از آنست کـه در یـک سـطح مـشخص شـوری، داده هـای بدست آمده از مرحله اول آزمـایش در سـطح پـائین تـری نسبت به مرحله دوم آزمایش قرار گرفته اند، بـا توجـه بـه اینکه آزمایشات در شرایط کنترل انجام مـی گرفـت علـت وجود تفاوتها شاید به خاطر تـنش غیـر منتظـره ای (تـنش خشکی که بدنبال آن تنش اسمزی را موجب می شد) باشد که در مرحله اول به کلیه تیمارهـای آزمـایش اعمـال شـد. تحقیقـات Saravanakumar و Samiyappan (۲۰۰۷) نیـز نشان داد که هر چهار سویه سودوموناس فلورسـنت مـورد مطالعه، باعث افزایش درصد جوانه زنـی و شـاخص هـای رشد از قبیل وزن تازه و خشک، طول ریشه و طـول انـدام هوایی بادام زمینی در شرایط تنش نمک شـدند. در تحقیـق آنهـا بیـشترین افـزایش مربـوط بـه سـویه *P.fluorescens* YDKI دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase بوده که اثر این سویه در افزایش ماده خـشک بـادام زمینـی در شـرایط تنش نمک بیش از شرایط بدون تنش بـوده اسـت. مقایـسه جوانـه زنـی رقـم هـا نـشان داد کـه رقـم Hayola308 حساس تر از رقم RGS003 نسبت به شوری بوده است و اثر سویه ها در تخفیف اثرات شوری، موقعی کـه بـه رقم حساس تلقیح شده اند بیشتر بوده است. با توجـه بـه نتایج این آزمایشات، سویه های منتخب در تخفیف اثـرات شوری بر کلزا در شرایط کنترل شده موثر بـوده اسـت لـذا پیشنهاد می شود که اثر سـویه هـای منتخـب بـر کلـزا، در آزمایـشات گلدانی،مزرعـه ای و در محـیط شـور بررسـی شوند.



شکل ۱- میزان رشد جدایه ها در سه محیط کشت

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۱- غربال گری باکتری ها از نظر استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانو متر				میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانو متر			
نام باکتری	DF	DF+ACC	$(NH_4)2SO_4$+ DF	نام باکتری	DF	DF+ACC	$(NH_4)2SO_4$+ DF
P.f. strain 3	۰/۲۲	۰/۱۹	۲/۸۷	*P.p.* strain 168	۰/۲۸	۰/۲۵	۲/۵۳
P.f. strain 174	۰/۲۸	۰/۲۵	۲/۷۲	*P.p.* strain 4	۰/۱۴	۱/۸۴	۳/۰۲
P.f. strain 6	۰/۱۷	۰/۱۷	۲/۸۵	*P.p.*strain 9	۰/۲۶	۰/۲۴	۲/۹
P.f. strain 161	۰/۳۲	۰/۱۳	۲/۵۷	*P.p.* strain 10	۰/۲۵	۰/۲۴	۲/۹۲
*P.f.*strain169	۰/۱۹	۲/۰۶	۲/۸۳	*P.p.* strain 11	۰/۱۴۳	۱/۷۳	۲/۹۸
*P.f.*strain 120	۰/۱۷	۰/۱۴	۲/۸۲	*P.p.* strain 34	۰/۱	۰/۱	۲/۷۳
P.f. strain 31	۰/۲۹	۰/۲۷	۲/۸	*P.p.* strain 50	۰/۲۸	۰/۲۵	۲/۷۶
P.f. strain 153	۰/۲۳	۰/۱۴	۲/۷	*P.p.* strain 41	۰/۱۹	۰/۱	۲/۹
P.f .strain 157	۰/۳۵	۰/۳۰	۲/۷۵	*P.p.* strain 56	۰/۱	۰/۱	۲/۷۵
P.f. strain 111	۰/۱۰	۰/۱۲	۲/۷۴	*P.p.* strain 74	۰/۲۵	۰/۱۸	۱/۸۵
P.f. strain 87	۰/۲۴	۰/۲۱	۲/۸۷	*P.p.* strain 68	۰/۲۹	۰/۲۴	۲/۷۳
P.f. strain 71	۰/۳	۰/۲۶	۲/۷۸	*P.p.* strain 147	۰/۰۵	۰/۰۴	۲/۶۸
P.f. strain 79	۰/۶۹	۲/۱۶	۲/۷۴	*P.p.* strain 130	۰/۲۹	۰/۲۶	۲/۸۳
P.f. strain 88	۰/۱۹	۰/۱۷	۲/۶۱	*P.p.* strain 108	۰/۱۹	۱/۸۵	۲/۷۸
*P.*f. strain 82	۰/۱	۰/۰۹	۲/۸	*P.p.* strain 101	۰/۲۱	۰/۱۳	۲/۵۶
P.f. strain 145	۰/۲۰	۰/۲۲	۲/۸۴	*P.p.* strain 112	۰/۱۶	۰/۱۳	۲/۵۱
P.f. strain 65	۰/۱۸	۰/۱۹	۱/۷۹	*P.p.* strain 123	۰/۲۶	۰/۲	۲/۹۹
P.f. strain 183	۰/۲۱	۰/۲۳	۲/۷۱	*P.p.* strain 98	۰/۱۹	۰/۱۳	۲/۶۲
P.f. strain 196	۰/۱۴	۱/۹۱	۲/۶۸	*P.p.* strain 103	۰/۳	۰/۲۶	۲/۷۲
P.f. strain 99	۰/۲۶	۰/۲۴	۲/۷۸	*P.p.* strain 100	۰/۲۶	۰/۲۵	۲/۷۳
P.f. strain 162	۰/۳۲	۰/۲۶	۲/۶۶	*P.p.* strain 159	۰/۱۸	۱/۷۸	۲/۸۹
P.f. strain 173	۰/۳۲	۰/۲۷	۲/۷۲	*P.p.* strain 53	۰/۰۹	۰/۰۸	۲/۷۲
P.f. strain 193	۰/۲۷	۰/۲۴	۲/۶۶	*P.p.* strain 143	۰/۳۷	۰/۳۴	۲/۸۰
P.f. strain 194	۰/۱۸	۰/۱۷	۲/۵۵	*P.p.* strain 139	۰/۱۳	۰/۱۹	۲/۹۰
P.f. strain 189	۰/۲۱	۰/۱۸	۲/۶۰	*P.p.* strain 179	۰/۱۷	۰/۱۵	۲/۶۱

جدول ۲- بررسی تأثیر شوری بر رشد و توانایی سویه های منتخب در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

سویه ها	DF	DF+ACC	$DF+(NH_4)_2SO_4$	DF+ACC / DF+(NH4)2SO4	DF+ACC+S1	LB+S1	LB+S2
P.p.4	۰/۱۷۹	۱/۷۸۸	۲/۹۰۴	۰/۶۱۶	۱/۹۳۵	۲/۹۵۳	۲/۹۵۳
P.p.11	۰/۱۶۶	۱/۶۶۶	۲/۷۷۹	۰/۶۰۰	۱/۶۸۷	۲/۷۷۳	۲/۸۵
P.f.79	۰/۳۸۱	۱/۹۶۶	۲/۶۵۳	۰/۷۴۱	۱/۷۴۷	۲/۰۹۷	۲/۱۰۳
P.p.108	۰/۲۰۲	۱/۷۷۷	۲/۷۴۳	۰/۶۴۸	۱/۵۱۷	۲/۵۹۳	۲/۶۰
P.p.159	۰/۲۴۲	۱/۸۲۱	۲/۸۵۷	۰/۶۳۸	۲/۲۱۰	۲/۷۹۷	۲/۹۰
P.f.169	۰/۱۹۷	۱/۹۴۷	۲/۸۰۷	۰/۶۹۳	۲/۰۷۳	۲/۸۳۷	۲/۹۷۷
P.f.196	۰/۲۰۲	۱/۷۷۳	۲/۸۲۹	۰/۶۲۹	۱/۵۵۹	۲/۲۸۰	۲/۳۷۷
LSD(0.05)	۰/۲۲۲	۰/۱۸۴	۰/۱۸۴	۰/۰۷۸	۰/۱۶۶۱	۰/۰۵۵۴	۰/۰۵۵۴

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳- میزان تولید مواد شبه اکسین، سیانید هیدروژن و فعالیت آنزیمACC Deaminase سویه های مورد مطالعه

صفت مورد نظر	سویه						
	P.p.۷	P.p.11	P.f.79	P.p.108	P.p.159	P.f.169	P.f.196
مواد شبه اکسین (mg/l)	۹/۶	۷/۷	۶/۱	۸/۹	۶۷/۹	۵/۸	۶/۸
سیانید هیدروژن	–	–	–	–	+	–	–
فعالیت آنزیم ACC Deaminase[1]	۲/۳۰۵	۲/۴۰۹	۲/۷۲۶	۵/۰۳۰	۲/۹۸۱	۳/۵۰۸	۲/۰۹۲

۱- میکرومول آلفاکتوبوتیرات در میلی گرم پروتئین در ساعت

جدول۴- بررسی تأثیرسویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا رقم RGS003 در سطوح مختلف شوری

سویه ها	شوری(dS/m)											
	۰/۰۰۴				۱۱				۲۲			
	جوانه زنی(۳روز)٪	جوانه زنی(۶روز)٪	طول ریشه(mm)	طول اندام هوایی(mm)	جوانه زنی(۳روز)٪	جوانه زنی(۶روز)٪	طول ریشه(mm)	طول اندام هوایی(mm)	جوانه زنی(۳روز)٪	جوانه زنی(۶روز)٪	طول ریشه(mm)	طول اندام هوایی(mm)
P.p.4	۸۱	۹۰	۲۰	۲۶	۴۰	۴۶	۵	۴	۳۲	۴۰	۴	۳
P.p.11	۹۳	۹۳	۲۹	۲۸	۶۱	۶۳	۱۲	۸	۲۰	۲۵	۰	۴
P.f.79	۸۳	۹۱	۳۰	۳۲	۵۰	۵۰	۱۳	۸	۱	۰	۰	۰
P.p.108	۸۲	۸۴	۲۳	۲۵	۶۵	۶۹	۲۱	۱۹	۱۰	۱۵	۲	۳
P.p.159	۹۲	۹۲	۱۹	۲۲	۴۱	۴۱	۶	۴	۲۴	۲۵	۰	۰
P.f.169	۹۴	۹۴	۲۰	۲۴	۷۴	۷۴	۲۶	۱۴	۴۵	۴۲	۴	۴
P.f.196	۸۹	۸۹	۲۸	۳۰	۵۷	۶۸	۲۶	۱۴	۲	۲	۰	۰
P.p.74 شاهد	۹۲	۹۲	۲۱	۲۶	۳۷	۴۹	۲۱	۱۴	۰	۲	۰	۰
P.f.153شاهد	۸۱	۸۱	۱۹	۲۱	۶۵	۷۷	۱۸	۱۴	۱۷	۲۷	۶	۵
شاهد(بدون تلقیح)	۹۲	۹۵	۲۶	۲۶	۶۰	۶۱	۱۷	۱۲	۳۱	۴۰	۳	۳
LSD(0.05)	۱۰/۹	۱۰/۶	۶/۴	۵/۹	۱۰/۹	۱۰/۶	۶/۴	۵/۹	۱۰/۹	۱۰/۶	۶/۴	۵/۹

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- بررسی تأثیرسویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا رقم Hayola308 در سطوح مختلف

سویه ها	شوری(dS/m) ۰/۰۰۴ جوانه زنی(۳روز)٪	جوانه زنی(۶روز)٪	طول ریشه(mm)	طول اندام هوایی(mm)	۱۱ جوانه زنی(۳روز)٪	جوانه زنی(۶روز)٪	طول ریشه(mm)	طول اندام هوایی(mm)	۲۲ جوانه زنی(۳روز)٪	جوانه زنی(۶روز)٪	طول ریشه(mm)	طول اندام هوایی(mm)
P.p.4	۷۵	۷۶	۲۰	۲۵	۵۰	۵۰	۴	۳	۱۶	۱۸	۲	۲
P.p.11	۸۶	۸۶	۲۶	۲۷	۸۳	۸۳	۱۲	۸	۲۱	۲۵	۳	۳
P.f.79	۷۵	۷۹	۲۸	۳۱	۵۰	۵۴	۱۴	۱۰	۰	۰	۳	۲
P.p.108	۸۴	۸۵	۲۳	۲۲	۵۴	۵۴	۲۱	۱۶	۶	۸	۳	۲
P.p.159	۸۳	۸۳	۲۱	۲۳	۵۶	۵۷	۵	۴	۱۹	۲۱	۲	۱
P.f.169	۷۶	۷۸	۲۲	۲۴	۶۱	۶۳	۲۶	۱۷	۳۱	۳۳	۴	۴
P.f.196	۶۶	۶۶	۲۹	۳۰	۳۵	۳۵	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۰
P.p.74 شاهد	۸۳	۸۳	۲۲	۲۵	۳۰	۳۱	۲۴	۱۳	۶	۱۰	۲	۰
P.f.153شاهد	۸۳	۸۳	۱۸	۱۶	۴۳	۴۳	۱۹	۱۵	۹	۱۰	۰	۲
شاهد(بدون تلقیح)	۸۱	۸۸	۲۳	۲۲	۴۱	۴۲	۱۴	۱۰	۱۸	۲۰	۲	۲
LSD(0.05)	۸/۳	۷/۶	۶/۱	۵/۸	۸/۳	۷/۶	۶/۱	۵/۸	۸/۳	۷/۶	۶/۱	۵/۸

جدول ۶- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد دو رقم کلزا (Hayola308,RGS003) در سطوح مختلف شوری

رقم	شماره سویه	شوری(dS/m) ۸ جوانه زنی(٪)	طول اندام هوایی(mm)	طول ریشه(mm)	وزن خشک گیاهچه(mg)	وزن تازه گیاهچه(mg)	۱۱ جوانه زنی(٪)	طول اندام هوایی(mm)	طول ریشه(mm)	وزن خشک گیاهچه(mg)	وزن تازه گیاهچه(mg)	۱۴ جوانه زنی(٪)	طول اندام هوایی(mm)	طول ریشه(mm)	وزن خشک گیاهچه(mg)	وزن تازه گیاهچه(mg)
Hayola308	شاهد	۵۱	۳۱	۲۸	۲/۵	۶۶	۴۱	۲۶	۲۸	۲/۸	۷۱	۳۸	۱۱	۱۴	۲/۵	۴۶
	P.p.11	۶۹	۴۳	۳۴	۳/۳	۶۸	۷۴	۲۸	۳۱	۳/۳	۷۹	۶۷	۲۲	۲۴	۲/۸	۵۸
	P.p.108	۸۲	۵۲	۴۴	۴/۳	۹۳	۸۵	۵۶	۶۵	۳/۵	۸۵	۷۷	۳۱	۳۸	۳/۵	۷۰
	P.p.169	۵۸	۳۳	۳۱	۳/۵	۶۹	۷۶	۳۰	۲۷	۳	۷۵	۶۷	۱۸	۱۹	۲/۸	۵۶
	P.p.196	۸۷	۳۹	۳۴	۲/۸	۶۷	۵۹	۲۴	۳۲	۲/۸	۸۶	۷۶	۲۱	۲۳	۳	۵۹
RGS003	شاهد	۹۱	۴۷	۵۷	۲/۸	۱۰۴	۸۱	۳۸	۳۵	۱/۸	۱۰۳	۷۲	۲۳	۳۰	۲	۵۵
	P.p.11	۹۵	۶۱	۶۸	۳	۱۱۹	۸۲	۴۱	۴۶	۲/۵	۱۰۸	۸۸	۳۶	۳۴	۲/۸	۶۸
	P.p.108	۸۸	۵۸	۶۶	۳	۱۱۲	۹۱	۴۰	۶۳	۲/۸	۱۲۳	۹۰	۳۱	۴۷	۲/۵	۸۴
	P.p.169	۹۵	۵۱	۶۱	۳/۵	۱۲۲	۹۶	۴۸	۵۵	۲/۵	۱۲۲	۸۸	۳۰	۳۳	۲/۳	۶۸
	P.p.196	۹۳	۵۵	۶۱	۳	۱۱۷	۸۱	۵۱	۶۴	۳/۳	۱۱۳	۸۲	۳۷	۴۸	۲/۳	۸۵
	LSD(0.05)	۸/۹	۸/۳	۹/۷	۱/۱	۳/۷	۸/۹	۸/۳	۹/۷	۱/۱	۳/۷	۸/۹	۸/۳	۹/۷	۱/۱	۱۳/۸

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست منابع:

1. Ashraf,M., and McNielly,T.2004.Salinity tolerance in *Brassica* oilseeds. Crit. Rev.Plant Sci. 23 : 157–174.
2. Belimov,A.A.,Safronova,V.I.,Sergeyeva,T.A.,Egorova,T.N.,Matveyeva,…V.A.,Tsyganov, V.E., Borisov, A.Y., Tikhonovin, I.A., Kluge, C., Preisfeld,A., Deitz, K.J., and Stepanok, V.V.2001.Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can.J.Microbiol. 47:642-652.
3. Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demechinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullita, S., and Glick.B.R.2005. Cadmium-tolerant plant growth promoting bacteria associated with roots of Indian mustard (*Brassica juncea* .Czem).Soil Biol.Biochem. 37:241-250.
4. Benizri,E.,Courtade,A.,Picard,C.,and Guckert,A.1998.Role of maize root exudates in the production of auxines by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. Soil Biol.Biochem. 30:1481-1484.
5. Bradford,M.1976.A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.Anal.Biochem. 72:248-245.
6. Burd, G.I., Dixon, D.G., and Glick, B.R. 1998. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings.Appl. Environ. Microbiol. 64: 3663–3668.
7. 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. 46:237–245.
8. Dell'Amico,E.,Cavalca,L.,and Andreoni,V.2005.Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water medow soil ,and screening of metal-resistant,potentially plant growth-promoting bacteria,FEMS Microbiol. 52:153-162.
9. Dewan,M.L.and Famuri,J.1964.The Soils of Iran,FAO.Rome.
10. Donate-Correa,J.,Leon-Barrios,M.,and Perez-Galdona,R.2004.Screening for plant growth promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus*(tagasaste),a forage tree-shrub legume endemic to Canary Island,Plant Soil 266:261-272.
11. Dworkin,M.,and Foster,J.1958.Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen.J.Bacteriol.,75:592-601.
12. Flowers,T.J.,and Yeo,A.R.1995.Breeding for salt tolerance in crop plant:Where next?Aust.J.Plant Physiol.22:875-884.
13. Frankenberger, W.T., and Arshad, M. 1995. Phytohormones in Soils: Production and Function. Marcel Dekker, Inc., New York.
14. Ghassemi,F.,Jakeman,A.J., and Nik,H.A.1995.Salinisation of Land Water Resources.Human Causes,Extent,Management and Case Studies.University of New South Walels Press,Sydney,Australia.
15. 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.
16. Glick,B.R.1995.The enhancement of plant growth promotion by free living bacteria.Can.J.Micribiol. 41:109-117.
17. Glick, B.R., Karaturovic, D., and Newell, P. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting rhizobacteria.Can. J. Microbiol. 41: 533–536.
18. Glick,B.R.,Liu,C.,Ghosh,S.,and Dumbroff,E.B.1997.Early development of canola seedlings rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2.Soil Biol.Biochem. 29:1233-1239.
19. 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.

Archive of SID

www.SID.ir

20. Grichko.V.P.,Filby,B.,and Glick,B.R.2000.Increased of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC Deaminase to aaccumulate Cd,Co,Cu,Ni,Pb, and Zn.J.Biotech. 81:45-53.
21. 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.
22. Hall,J.A.,Penrose,D.,Ghosh,S.,and Glick,B.R.1996.Root elongation in various agronomic crops by the plant groth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2.Israel J. Plant Sci.,44:37-42.
23. Honma, M., and Shimomura, T. 1978.Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. Agric. Biol. Chem. 42: 1825–1831.
24. Kende,H.1993.Ethylene biosynthesis.Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol. 44:283-307.
25. King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. J. Lab. Clin. Med. 44:301-307.
26. 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.
27. Luria, S.E., and Burrous, J.W. 1955. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*., J. Bacteriol. 74: 461-476.
28. Lynch, J., and Brown, K.M. 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. Physiol. Plant 100: 613–619.
29. Ma,W., Sebestianova, S., Sebestian, J., Burd, G.I., Guinel, F., and Glick, B.R. 2003.Prevalence of 1-aminocyclopropaqne-1-carboxylate in deaminase in Rhizobia spp. Anton. Van Leeuwenhoek 83: 285–291.
30. Mayak,S.,Tirosh,T.,and Glick,B.R.2004a.Plant Growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants salt stress .Plant Physiol.Biochem. 42:565-572.
31. Mayak,S.,Tirosh,T., and Glick,B.R.2004b. Plant growth promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers.Plant Sci. 166:524-530.
32. Patten, C. L., and Glick, B. R.1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Can. J. Microbiol. 42**:**207–220.
33. Patten,C.L., and Glick, B. R.2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system, Appl. Environ. Microbiol. 48: 3795–3801.
34. Penrose.D.M.2000.The role of ACC Deaminase in plant growth promotion Ph.D.Thesis,University of Waterloo.Canada.
35. Penrose, D. M., Moffat, B. A., and Glick ,B. R.2001. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC Deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. Can. J. Microbiol. 47:77–80.
36. Penrose,D.M.,and Glick,B.R.2003.Methodse for isolating and characterizing ACC Deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria,Physiologia Plantarum 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 (*Arechis hypogea*) plant .J.Appl .Microbiol.,102:1283-1292.
39. Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Barka, E.,Wang-Pruski, G., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., and Nowak,J. 2005. *Burkholderia* phyto.rmins sp. Nov., a novel plant associated bacterium with plant beneficial properties. Int. J. Syst.Evol. Microbiol. 55:1187–1192.
40. Stougaard, J. 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. Plant Physiol 124 , 531–540.

Archive of SID

www.SID.ir

41. Wang,C.,Knill,E.,Glick,B.R.,and Defago, G.2000. Effectc of transfering 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. Whipps, J.M.1990. Carbon-utilization. In:Lynch, J.M.(ed.).The Rhizosphere. Chichester. Wiley Interscience, pp.59-97.
43. Yang,S.F.,and Hoffman,N.E.1984.Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plant.Annu.Rev.Plant Physiol. 35:155-189.
44. Yeo, A.R. 1999.Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. Sci. Hortic. (Amsterdam) 78: 159–174.

Archive of SID

www.SID.ir