Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۵۲- ۴۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۱۱ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۶

جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی ریزوبیوم تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز و سیدروفور

بهناز اوژند: دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران، behnaz.oujand@yahoo.com
محمود ملکی *:** استادیار اصلاح نباتات، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، maleki.li@gmail.com
شهریار شاکری **: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، shahryar.shakeri@yahoo.com
صدیقه نوروزپور: دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران، sedighe.poorahmadi@yahoo.com
پروانه عابدی: دانشجوی کارشناسی ارشد رشتهٔ میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، parvanehabedi2008@gmail.com
عبدالحمید نمکی شوشتری: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، genabns2@yahoo.com

چکیده

مقدمه: ریزوبیوم‌ها باکتری‌هایی هستند که با گیاهان زراعی خانوادهٔ لگوم همزیستی دارند. باکتری‌های ریزوبیومی علاوه بر تثبیت نیتروژن، قابلیت‌های دیگری از جمله توانایی تولید آمینو سیکلوپروپان کربوکسیلات دآمیناز (ACC دآمیناز') و سیدروفور را دارند، در ایجاد گرهک‌های بیشتر در شرایط مختلف محیطی موفق‌تر خواهند بود. هدف از این مطالعه، غربال سویه‌های رایزوبیومی بومی تولیدکنندهٔ آنزیم ACC دآمیناز و سیدروفور است.

مواد و روش‌ها: برای جداسازی سویه‌های ریزوبیومی تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز، سویه‌ها روی محیط M9 با دو منبع نیتروژن (ACC و NH4Cl) کشت داده شدند. همچنین محیط M9 فاقد نیتروژن نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. براساس مقایسهٔ آماری میزان رشد سویه‌ها در محیط M9 حاوی ACC نسبت به دو محیط دیگر، سویه‌های تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز شناسایی شدند. برای جداسازی ریزوبیوم‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور از روش سنجش مایع Chrome Azurol S (CAS) استفاده شد. تمام تیمارها در دو تکرار انجام گرفت و آنالیز آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. برای شناسایی بهترین سویه‌های تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز و سیدروفور از روش توالی‌یابی ژن *16S rDNA* استفاده شد.

نتایج: در این مطالعه ۱۴ سویهٔ ریزوبیوم به‌منظور تولید ACCدآمیناز و سیدروفور جداسازی و غربالگری شدند. نتایج نشان داد که از بین همهٔ سویه‌ها، فقط سویهٔ R8 دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز بود و این سویه توانست رشد بهتری در محیط کشت M9+ACC نسبت به دو محیط M9 و M9+NH4Cl داشته باشد. در مرحلهٔ بعد با استفاده از روش سنجش مایع CAS مشخص شد که ۸ سویه توانایی تولید سیدروفور را دارند. از بین آن‌ها سویهٔ R12 بیشترین میزان تولید سیدروفور را داشت. با توجه به نتایج آنالیز مولکولی، سویه‌های R8 و R12 به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: به احتمال زیاد وجود سویهٔ R8 که دارای توانایی تولید ACC دآمیناز است می‌تواند از آثار سوء اتیلن در هنگام گرهک‌زایی و نیز از تنش جلوگیری کند. از طرفی سویهٔ R12 نیز که توانایی تولید سیدروفور را دارد علاوه بر تسهیل گرهک‌زایی و تأمین نیاز گیاه به آهن، می‌تواند اثر بازدارندگی بر پاتوژن‌های خاکزاد داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: ریزوبیوم، ACC دآمیناز، سیدروفور

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات
** گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

Copyright© 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ریزوبیوم‌ها باکتری‌هایی هستند که پس از استقرار در داخل گرهک‌های ریشه، قادر به تثبیت نیتروژن هستند و ازاین‌طریق قسمتی از نیاز گیاه به نیتروژن را رفع می‌کنند (۱). برای سال‌های زیادی، باکتری‌های تثبیت‌کنندهٔ نیتروژن به‌عنوان همزیست‌های اختصاصی برای لگوم‌ها شناخته شدند؛ اما در دهه‌های اخیر مشخص شده است که ریشهٔ خانوادهٔ گرامینه مثل برنج (*Oryza sativa*)، گندم (*Triticum aestivum*)، نیشکر (*Saccharum sp*.) و ذرت (*Zea mays*) نیز می‌توانند میزبان باکتری‌های تثبیت‌کنندهٔ نیتروژن باشند (۲- ۴). مشخص شده است که این ارتباط باکتری-گیاه می‌تواند پتانسیل خوبی برای بهبود تولید گیاهان زراعی غیرلگوم ازطریق افزایش بنیهٔ گیاهچه، عملکرد، رشد و جذب مواد غذایی، فعالیت فتوسنتزی و محتوای نیتروژن فراهم کند (۴). اعتقاد بر این است که سودمندی ریزوبیوم‌ها در ارتباط با گیاهان غیرلگوم به‌دلیل فعالیت‌های دیگر این باکتری‌ها مثل افزایش جذب و فراهم‌کردن عناصر غذایی، تولید هورمون‌های رشد گیاهی، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید سیدروفورهای کلاته‌کنندهٔ آهن و تولید آنزیم ACC دآمیناز است (۳ و ۵). اتیلن یک هورمون گیاهی مهم است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی مهم گیاهی مثل رسیدگی میوه‌ها، جوانه‌زنی، تمایز بافت و پیری و ریزش اندام‌های گیاهی شرکت می‌کند (۶). همچنین در شرایط تنشی نیز سطح اتیلن در داخل گیاه بالا می‌رود که به آن اتیلن تنشی گفته می‌شود و مشخص شده است که اتیلن از طویل‌شدن سلول‌های ریشه و ساقهٔ گیاه جلوگیری می‌کند (۷). باکتری‌های حاوی ACC دآمیناز با تبدیل ACC (پیش‌مادهٔ تولید اتیلن) به آمونیوم و آلفاکتوبوتیرات باعث کاهش سطح اتیلن می‌شوند (۸). آزمایش‌ها نشان داده‌اند که گیاهانی که با باکتری‌های دارای آنزیم ACC دآمیناز تلقیح شده‌اند، ریشه‌های طویل‌تری دارند و بهتر می‌توانند در مقابل آثار سوء اتیلن، تنشی روی رشد گیاه که بر اثر تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود، مقاومت کنند (۹- ۱۱). به‌دلیل اهمیت این نوع از ریزوباکتری‌ها تاکنون تلاش‌های زیادی برای جداسازی رایزوباکتری‌های تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز صورت گرفته است (۱۲- ۱۴).

از طرف دیگر، آهن موجود در خاک چهارمین عنصر فراوان روی زمین است و اغلب به‌شکل آهن سه‌ظرفیتی (Fe^{+3}) در خاک‌های هوازی که قابلیت انحلال در آن‌ها کم است، یافت می‌شود. در بیشتر مواقع، این مقدار آهن در این خاک‌ها، برای برطرف‌کردن نیاز گیاهان کافی نیست. به‌طور کلی با افزایش pH، قابلیت انحلال آهن سه‌ظرفیتی کاهش می‌یابد (۱۵). مشخص شده است که آهن در سیستم تثبیت‌کنندهٔ نیتروژن یعنی در سنتز کمپلکس آنزیم نیتروژناز، لگ هموگلوبین، فرودوکسین، هیدروژناز و سیتوکروم‌ها دخیل است (۱۶). بنابراین کمبود آهن ممکن است از طریق آسیب‌رساندن به زنده‌مانی ریزوبیوم و نیز استقرار گره‌های کارکردی روی تثبیت همزیستی اثر بگذارد (۱۶). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ترشح سیدروفورها به‌وسیلهٔ باکتری‌ها ازطریق بهبود جذب آهن و نیز جلوگیری از استقرار پاتوژن‌های گیاهی باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند (۱۷ و ۱۸). به همین دلیل در مطالعات مختلف سویه‌های رایزوبیومی تولیدکنندهٔ سیدروفور جداسازی و شناسایی شدند (۱۹، ۲۰). با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیطی و اقلیمی زیستگاه خود، در این مطالعه ریزوبیوم‌های بومی تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز و سیدروفور که با شرایط خاک و اقلیم کشور سازگارند

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی و غربالگری شدند تا در کنار تثبیت نیتروژن هوا قادر به کاهش سطح اتیلن گیاه ازطریق تولید ACC دآمیناز در شرایط تنش و نیز کمک به گیاه در جذب بهتر آهن موجود در خاک ازطریق تولید *سیدروفور* شوند.

مواد و روش‌ها

جداسازی ریزوبیوم‌ها: برای جداسازی باکتری‌های ریزوبیوم، ابتدا ریشهٔ گیاهان یونجه و شبدر از شهرهای ماهان و کرمان از خاک بیرون کشیده شد و سپس غده‌ها با پنس جدا و در کیسه‌های پلاستیکی استریل به آزمایشگاه انتقال داده شدند. عمل ضدعفونی با الکل ۷۰درصد و آب مقطر ۳ بارتقطیر انجام گرفت که در هر بار غده‌ها ۱ دقیقه در الکل ۷۰درصد و سپس به‌مدت ۱ دقیقه در آب مقطر استریل قرار گرفتند. سپس نمونهٔ له‌شدهٔ غده بر روی محیط کشت عصارهٔ مخمر-مانیتول *آگار* (YEMA[۲]) قرار داده شد. پلیت‌ها به‌صورت وارونه به‌مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پلیت‌ها از نظر وجود کلنی بررسی شدند و کلنی‌های موردنظر با لوپ استریل به محیط کشت جدید جهت دست‌یافتن به کلنی‌های خالص انتقال داده شدند.

جداسازی باکتری‌های تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز: جداسازی اختصاصی باکتری‌های تولیدکننده ACC دآمیناز ازطریق تعیین میزان رشد سویه در حضور ACC و در مقایسه با دو نمونه شاهد انجام گرفت (۲۱، ۲۲) که به‌صورت خلاصه در زیر بیان می شود: ابتدا سویه‌های ریزوبیومی را در محیط کشت مایع M9 (جدول ۱) تلقیح داده شدند و در انکوباتور چرخان با rpm100 به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا باکتری‌ها رشد کنند. سپس ۳ نوع محیط کشت به شرح زیر آماده شد: ۱- محیط کشت حداقل مایع M9 بدون NH_4Cl ۲) M9 با NH_4Cl ۳) M9 با ACC. در این مرحله از کار میکرو پلیت ۹۶ تایی ۱۲ ستون و ۸ ردیف تهیه شد و سپس در تمام چاهک‌های آن، ۱۲۰ میکرولیتر محیط کشت مایع M9 افزوده شد و در ستون ۱ و ۲ که به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده، فقط محیط مایع M9 اضافه شد و در ستون ۳ و ۴ که شاهد مثبت در نظر گرفته شده، علاوه بر M9، 15 میکرولیتر NH_4CL ۰/۳ مولار به چاهک‌ها افزوده شد و در ستون ۵ و ۶ علاوه بر M9، 15 میکرولیتر محلول آماده شدهٔ ACC ۳ میلی‌مولار به آن افزوده شد و سپس به تمامی چاهک‌ها ۱۵ میکرولیتر محیط کشت باکتریایی تلقیح شد و به‌مدت ۲۴ساعت در انکوباتور گذاشته شد و جذب نوری(OD) آن‌ها را با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۳۰ نانومتر بعد از مدت‌زمان ۲۴ ساعت خوانده شد و با مقایسهٔ OD چاهک‌های ACC، NH_4Cl و شاهد، توان رایزوباکتری‌ها برای تولید ACC مشخص شد.

جدول ۱- فرمولاسیون محیط‌های کشت برای جداسازی تولیدکننده‌های *ACC دآمیناز*

مواد	M_9(گرم بر لیتر)	M_9+NH_4Cl	M_9+ACC
Na_2HPO_4	۵/۸	۵/۸	۵/۸
KH_2PO_4	۳	۳	۳
NaCl	۰/۵	۰/۵	۰/۵
$CaCl_2$	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
$MgSO_4$	۰/۰۸۸	۰/۰۸۸	۰/۰۸۸
glucose	۲	۲	۲
NH_4Cl	۰	*۳	۰
ACC	۰	۰	*۴

۳ علامت ستاره نشان‌دهندهٔ این است که محیط حاوی NH_4Cl است.

۴ علامت ستاره نشان‌دهندهٔ این است که محیط حاوی ACC است.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی باکتری‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور: در این مرحله از بین باکتری‌های جداسازی‌شده در مرحلهٔ نخست، آن‌هایی که توانایی بالایی برای تولید سیدروفور داشتند با استفاده از محیط کشت اختصاصی سنجش مایع CAS شناسایی شدند (۲۳). ابتدا نمونه‌ها داخل محیط مایع M9 با فسفات کاهش‌یافته تلقیح داده شدند. بعد از تلقیح، نمونه‌ها به‌مدت ۴ روز در شیکر انکوباتور چرخان با دور rpm100 دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۴ روز ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته شد و درون ویال ریخته شد و با دور ۵۰۰۰ به‌مدت ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از سانتریفیوژ، ۰/۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت از هرکدام از نمونه‌ها به ویال‌های جدید منتقل شد. گام بعدی، آماده‌سازی محلول سنجش CAS بود. برای تهیهٔ این محلول چهار محلول استوک درست شد. ۱- محلول استوک CAS با غلظت ۲ میلی‌مولار: ۰/۱۲۱ گرم CAS در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. ۲- محلول استوک Fe با غلظت ۱ میلی‌مولار: یک میلی‌مولار $FeCl_3.6H_2O$ در ۱۰ میلی‌مولار HCl حل شد. ۳- محلول پیپرازین: ۴/۳۰۷ گرم پیپرازین در ۳۰ میلی‌لیتر آب حل شد. pH با سود تنظیم شد تا به ۵/۶ برسد. ۴- محلول HDTMA: ۰/۰۲۱۹ گرم HDTMA در ۵۰ میلی‌لیتر آب در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری حل شد. برای درست‌کردن محلول سنجش CAS، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول $FeCl_3.6H_2O$ با ۷/۵ میلی‌لیتر محلول CAS مخلوط شد و به محلول HDTMA در بالن ژوژه اضافه شد و بعد محلول پیپرازین به آن اضافه شد و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد که در نهایت محلول سنجش CAS آماده شد. رنگ این محلول آبی تیره بود. برای تهیه محلول شاتل ۰/۴۳۶۴ گرم ۵- سولفوسالیسیک در ۱۰ میلی‌لیتر آب حل شد.

تعیین واحد سیدروفوری با اندازه‌گیری جذب در ۶۳۰ نانومتر: به هرکدام از ویال‌ها که قبلاً ۰/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت ریخته شده بود، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سنجش CAS اضافه شد و با استفاده از ورتکس، مخلوط شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول شاتل به ویال اضافه شد و دوباره ورتکس انجام شد. طیف جذبی ۶۳۰ نانومتر برای کاهش رنگ آبی بررسی شد. جهت سنجش جذب از محیط کشت حداقل به‌عنوان شاهد استفاده شد و محیط حداقل حاوی محلول سنجش CASو محلول شاتل به‌عنوان رفرنس استفاده شد. نمونه (s) به‌دلیل دارابودن سیدروفور یک جذب نوری کمتر از رفرنس دارد. واحد سیدروفور از فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{واحد سیدروفور} = \left[\frac{(Ar - As)}{Ar}\right] 100 \quad (1)$$

که در فرمول بالا Ar جذب رفرنس (محلول شاتل + محلول سنجش CAS+ محیط حداقل) در ۶۳۰ نانومتر و As جذب نمونه (سوپرناتانت + محلول سنجش CAS + محلول شاتل) در ۶۳۰ نانومتر است (۲۳).

آنالیز آماری: تمامی تیمارها در دو آزمایش غربال سویه‌های رایزوبیومی تولیدکنندهٔ آنزیم ACC دآمیناز و سیدروفورها در دو تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرم‌افزارهای Excel و SAS آنالیز آماری شدند. همچنین مقایسهٔ میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

تکثیر ژن *16S rDNA*، توالی‌یابی آن و شناسایی سویهٔ مورد نظر: بهترین سویهٔ تولیدکنندهٔ آنزیم ACC دآمیناز و نیز بهترین سویهٔ تولیدکنندهٔ سیدروفور شناسایی مولکولی شدند. DNA این سویه‌ها با استفاده از روش Ausubel و همکاران (۱۹۹۹) استخراج شد

www.SID.ir

Archive of SID

(۲۴). ژن *16S rRNA* توسط ترکیب پرایمری 8F (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′) و 1541R (5′-AAG GAG GTG ATC CAG CCGCA-3′) و با استفاده از دستگاه PCR تکثیر شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱درصد بارگذاری شد و پس از رؤیت باند موردِنظر برای توالی‌یابی با استفاده از پرایمر 8F ارسال شد.

پس از به‌دست‌آمدن توالی *16S rDNA*، با استفاده از وب‌سایت NCBI قسمت BLAST توالی‌ها آنالیز شدند و نام باکتری موردِنظر شناسایی شد (۲۵). سپس نام و مشخصات سویه به‌همراه شماره دسترسی اختصاصی در داخل سایت NCBI ثبت شدند.

جدول ۲- جداسازی سویه‌های ریزوبیومی از رایزوسفر گیاهان مختلف

ردیف	نام سویه	گیاه	محل جمع‌آوری
۱	R1	شبدر	کرمان
۲	R2	شبدر	کرمان
۳	R3	یونجه	کرمان
۴	R4	یونجه	کرمان
۵	R5	یونجه	اصفهان
۶	R6	یونجه	اصفهان
۷	R7	یونجه	اصفهان
۸	R8	یونجه	اصفهان
۹	R9	یونجه	اصفهان
۱۰	R10	یونجه	اصفهان
۱۱	R11	یونجه	اصفهان
۱۲	R12	یونجه	اصفهان
۱۳	R13	یونجه	اصفهان
۱۴	R14	یونجه	اصفهان

نتایج

در این پژوهش چهارده سویهٔ ریزوبیومی از غده‌های ریشهٔ گیاهان یونجه و شبدر واقع در استان‌های کرمان و اصفهان جداسازی شدند (جدول ۲). سپس برای مشخص‌کردن قابلیت این سویه‌ها از نظر توانایی تولید ACC دآمیناز و نیز سیدروفورها از محیط کشت‌های اختصاصی استفاده شد.

سویه‌های تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز: توانایی سویه‌های ریزوبیومی برای استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن، براساس میزان رشد باکتری تعیین شد. درواقع سویه‌هایی که توانایی استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن دارند در محیط حاوی ACC رشد خوبی خواهند داشت و حداقل نسبت به محیط حداقل (M9 بدون منبع نیتروژن) رشد بهتری خواهند داشت. پس از تلقیح نمونه‌های ریزوبیومی روی دو منبع نیتروژن ACC و NH_4Cl و نیز محیط حداقل فاقد نیتروژن، از بین ۱۴ نمونهٔ ریزوبیومی، فقط سویهٔ R8 دارای قدرت استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن بود. OD این سویه در محیط حاوی ACC برابر با ۰/۸۳۴ بود که در مقایسه با OD محیط شاهد فاقد ACC اختلاف معنی‌دار داشت. برای اینکه تفاوت‌های مشاهده‌شده از نظر آماری به اثبات برسد، داده‌های حاصل از تأثیر سه محیط کشت مختلف بر سویهٔ R2 در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار مورد تجزیهٔ واریانس قرار گرفتند. نتایج نشان داد که حداقل بین سه تیمار (محیط کشت) در سطح ۵درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول۳). برای اینکه مشخص شود که بین کدام یک از محیط کشت‌ها تفاوت وجود دارد، مقایسه میانگین به‌روش دانکن انجام گرفت. نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد که تفاوتی بین میزان رشد سویهٔ R8 در دو محیط کشت M9 و M9+NH_4Cl وجود نداشته است اما میزان رشد در محیط کشت M9+ACC تفاوت معنی‌داری با دو محیط کشت دیگر دارد که این نشان‌دهنده این است که این سویه از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کند (شکل ۱).

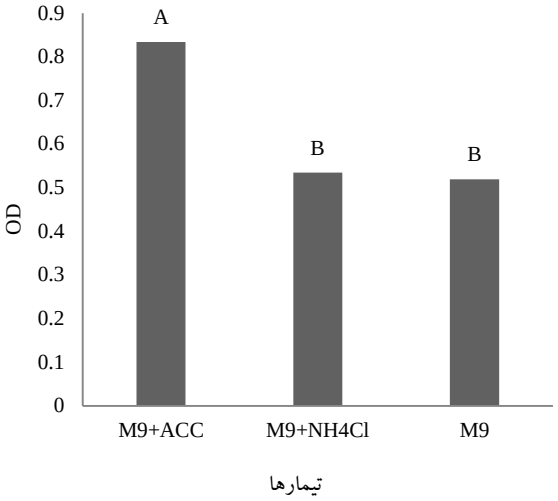
www.SID.ir

Archive of SID

جدول۳- آنالیز تجزیهٔ واریانس تیمارهای مختلف در سویهٔ R8

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
تیمار	۲	۰/۱۲۶۱	۰/۰۶۳۱*
خطا	۳	۰/۰۱۱۷	۰/۰۰۳۹

علامت * به‌معنی معنی‌داری در سطح ۵درصد است.



شکل ۱- مقایسهٔ میانگین بین تیمارهای مختلف در سویهٔ R8

سویهٔ R8 با استفاده از روش 16S rDNA شناسایی شد و با شماره دسترسی KT737475 در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیده است. با توجه به آنالیز مولکولی، این سویه به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شد.

نتایج حاصل از آزمایش‌ها توان تولید آنزیم ACC دآمیناز اندازه‌گیری‌شده در ۱۴ سویهٔ ریزوبیومی، نشان می‌دهد که برخی از باکتری‌های ریزوبیومی توان تولید این آنزیم را دارند و می توان آن‌ها را در لیست باکتری‌های تولیدکنندهٔ آنزیم ACC دآمیناز قرار داد.

باکتری‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور: نتایج نشان داد که از بین ۱۴ نمونهٔ ریزوبیومی، تعداد ۸ سویه (۵۷درصد از کل سویه‌ها) دارای توان تولید سیدروفور هستند.

برای اینکه تفاوت‌های بین سویه‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور از نظر میزان تولید سیدروفور مشخص شوند، داده‌های به‌دست‌آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. نتایج نشان داد که بین تیمارها، در سطح ۵درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول۵). این نتیجه به این معنی است که حداقل بین دو سویهٔ ریزوبیومی از نظر میزان تولید سیدروفور تفاوت معنی‌دار وجود دارد. برای اینکه تفاوت بین سویه‌ها از نظر آماری مشخص شوند، مقایسهٔ میانگین بین تیمارها به‌روش دانکن انجام گرفت تا تفاوت بین تیمارها مشخص شود (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ نیز مشخص است سویهٔ R12 بیشترین میزان تولید سیدروفور و سویه‌های R13، R3 و R11 کمترین میزان تولید سیدروفور را دارند. از بین ۸ سویه، ۳ سویه R13 (۲۸ درصد)، R3 (۲۹ درصد) و R11 (۲۹ درصد) زیر ۴۰ درصد، ۴ سویه R1 (۴۶ درصد)، R14 (۵۰ درصد)، R6 (۵۴ درصد) و R7 (۵۸درصد) زیر ۶۰ درصد و یک سویه R12 (۹۰ درصد) بالای ۶۰درصد واحد سیدروفوری را به خود اختصاص داده‌اند. سویهٔ R12 با استفاده از روش *16S rDNA* شناسایی شده و با نام FIR004 و شماره دسترسی KM044042 در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیده است. با توجه به آنالیز مولکولی، این سویه به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شد.

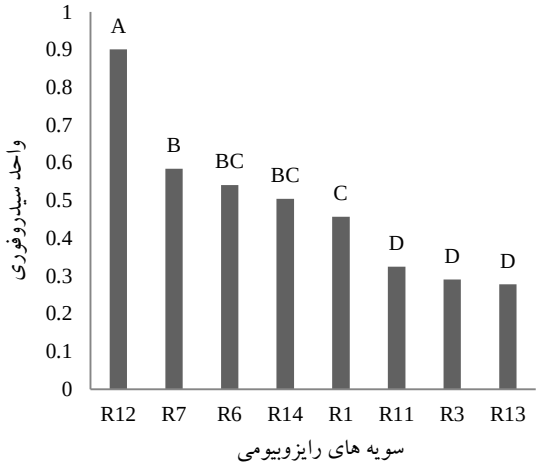
جدول ۵- تجزیهٔ واریانس باکتری‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
تیمار	۷	۰/۵۸۶۴	۰/۰۸۴*
خطا	۸	۰/۰۲۰۹	۰/۰۰۳

علامت * به‌معنی معنی‌داری در سطح ۵درصد است.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- مقایسهٔ میانگین بین باکتری‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور در طیف جذبی ۶۳۰ نانومتر

بحث و نتیجه‌گیری

ریزوبیوم‌ها باکتری‌هایی هستند که یک رابطهٔ همزیستی با گیاهان خانواده لگوم در گرهک‌های ریشهٔ گیاهان ذکرشده برقرار می‌کنند و قادر به تثبیت نیتروژن هوا هستند (۲۶). اتیلن، یکی از هورمون‌های گیاهی است که فرآیند گره‌زایی را تنظیم می‌کند و در بسیاری از فرآیندهای چرخهٔ زندگی گیاه دخیل است. اتیلن در هنگام برهم‌کنش بین گیاهان و ریزوبیوم‌ها هم سنتز می‌شود (۲۷، ۲۸). گزارش شده است که این هورمون از گره‌سازی لگوم‌ها و طویل‌شدن ریشه جلوگیری می‌کند (۲۹) و همچنین در پاسخ به تنش‌های غیرزنده نیز سنتز می‌شود (۲۷، ۲۸، ۲۹). از طرفی پیش‌مادهٔ سنتز اتیلن در گیاهان مولکول ۱-آمینو سیکلو پروپان کربوکسیلیک اسید (ACC) است که در واکنشی که به‌وسیلهٔ آنزیم ACC اکسیداز کاتالیز می‌شود، به اتیلن و دی‌اکسیدکربن و سیانید هیدروژن تبدیل می‌شود (۲۷، ۳۰). میکروارگانیسم‌های خاکزاد مثل باکتری‌ها با بیان آنزیم ACC دآمیناز باعث تخریب ACC به آمونیاک و آلفا کتوبوتیرات می‌شوند و از این طریق سطوح اتیلن در گیاهان را پایین می‌آورند (۳۱، ۳۲) و درنتیجه از آثار زیان‌بار اتیلن در هنگام گره‌زایی و نیز تنش‌های غیرزنده جلوگیری می‌کنند. به همین دلیل، مطالعات زیادی تاکنون انجام شده است تا رایزوباکتری‌های تولیدکنندهٔ ACC دآمیناز را جداسازی کنند (۱۲- ۱۴، ۳۳ و ۳۴). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که از بین ۱۴ سویهٔ ریزوبیومی، فقط سویهٔ R8 دارای توان تولید ACCدآمیناز بود. این سویه به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شد. برخی مطالعات مشابه نیز نشان‌دهندهٔ توانایی این گونه در تولید آنزیم ACC دآمیناز است (۳۵ و ۳۶). از این سویه می‌توان برای مطالعهٔ تأثیر این آنزیم بر گره‌زایی در شرایط مختلف رشدی در لگوم‌ها و نیز مطالعهٔ اثر آن بر گیاهان غیرلگومی استفاده کرد. پژوهشگران دیگر نیز تولید ACC دآمیناز از سویه‌های ریزوبیومی را گزارش کرده‌اند. ما[۴] و همکاران (۳۴)، ۱۳ جدایهٔ ریزوبیومی را جداسازی کردند که فقط ۵ تا از آن‌ها حاوی ACC دآمیناز بودند. دان[۵] و همکاران (۳۳) نشان دادند که از بین ۲۳۳ سویهٔ ریزوبیومی تنها ۲۷ سویه، قابلیت تولید ACC دآمیناز را داشتند.

بسیاری از گیاهان روی خاک‌های آهکی و قلیایی که از کمبود آهن دارند، رشد می‌یابند. گرهک‌زایی ضعیف ناشی از کمبود آهن گیاهان زراعی خانوادهٔ لگوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۷- ۳۹). سیدروفورها مولکول‌های آلی کوچکی هستند که با کلاته‌کردن آهن، آن را در دسترس گیاهان قرار می‌دهند و باعث فراهم‌کردن بیشتر آهن برای گیاهان می‌شوند (۴۰). سیدروفور باکتریایی رشد گیاهان را به‌طور مستقیم با افزایش فراهم‌کردن آهن خاک اطراف ریشه و یا به‌طور

www.SID.ir

Archive of SID

غیرمستقیم از طریق جلوگیری از رشد پاتوژن‌های گیاهی، رشد گیاهان را تقویت می‌کنند (۴۰). در خاک‌های تحت تنش کمبود آهن، سویه‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور افزایش بیشتری می‌یابند و موفق‌تر عمل خواهند کرد (۴۱). به‌دلیل اهمیت بالای سیدروفورها در جذب آهن توسط گیاهان، مطالعات زیادی برای جداسازی رایزوباکتری‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور صورت گرفته است (۱۹، ۲۰، ۴۲، ۴۳). در این پژوهش نیز برای جداسازی سویه‌های ریزوبیومی تولیدکنندهٔ سیدروفور، از روش سنجش CAS استفاده شد. نتایج نشان داد که ۸ سویهٔ ریزوبیومی توان تولید سیدروفور را داشتند. در پژوهشی که تیان[۶] و همکاران (۴۴) در سال ۲۰۰۹ انجام دادند ۲۲۹ سویه در محیط کشت مایع فاقد آهن، سیدروفور تولید کردند. تولید سیدروفورها به‌عنوان واحد سیدروفور ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که بیش از ۷۵درصد از کل سویه‌ها، بین ۲۰ تا ۴۰درصد واحد سیدروفوری و کمتر از ۲۵درصد از کل سویه‌ها، بین ۴۰ و ۶۰درصد واحد *سیدروفور* را به خود اختصاص دادند، درصورتی‌که در این مطالعه ۳ سویه R13 (۲۸ درصد)، R3 (۲۹ درصد) و R11 (۲۹ درصد) زیر ۴۰ درصد، ۴ سویه R1 (۴۶ درصد)، R14 (۵۰ درصد)، R6 (۵۴ درصد) و R7 (۵۸درصد) زیر ۶۰ درصد و یک سویه R12 (۹۰ درصد) بالای ۹۰درصد واحد سیدروفوری را به خود اختصاص داده‌اند. رایت و همکاران (۱۹) و وحید و همکاران (۲۰) سویه‌های ریزوبیومی تولیدکنندهٔ سیدروفور را از بین سویه‌های مطالعه‌شده جداسازی کردند. همچنین ری و اکانل[۷] (۴۳) سویه‌های مختلف ریزوبیومی تولیدکنندهٔ سیدروفور را جداسازی و شناسایی کردند که در بین آن‌ها ۵ سویه *S. meliloti* قرار داشتند. فابیانو[۸] و همکاران (۴۵) نیز نشان دادند که از بین ۱۶ سویه *S. meliloti*، ۱۲ سویه قابلیت تولید سیدروفور را داشتند. باراهو[۹] و همکاران (۴۶) نیز نشان دادند که تنها ۲ سویه از بین ۳۵ سویهٔ ریزوبیومی توانایی تولید سیدروفور را دارند. با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیطی و اقلیمی زیستگاه خود در این کار ریزوبیوم‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور و ACC دآمیناز بومی که با شرایط خاک واقلیم کشور سازگارند جداسازی و غربال شدند. این سویه‌ها در کنار عمل تثبیت نیتروژن، در شرایط کمبود آهن در رقابت با سایر باکتری‌ها موفق‌تر عمل خواهند کرد که این امر موفقیت بیشتر این سویه‌ها در ایجاد گرهک‌های ریشه و درنتیجه تثبیت بیشتر نیتروژن را در پی خواهد داشت. از طرفی سویهٔ R8 که توانایی تولید ACC دآمیناز را دارد احتمالاً به‌دلیل کاهش میزان اتیلن، میزان گرهک‌های بیشتری را در شرایط نرمال و تنش ایجاد خواهد کرد. از طرف دیگر ریزوبیوم‌های تولیدکنندهٔ سیدروفور و ACC دآمیناز به‌دلیل اینکه علاوه بر تثبیت نیتروژن قابلیت‌های دیگری را نیز دارند، می‌توانند برای بهبود رشد و عملکرد سایر گیاهان زراعی غیرلگوم نیز به کار روند.

تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان برای تأمین هزینهٔ مالی این پژوهش از محل طرح پژوهشی (با شماره ۱/۶۸۸۷) تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

References

(1) El-Akhal MR, Rincón A, Coba de la Peña T, Lucas MM, El Mourabit N, Barrijal S, et al. Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. *Plant Biology*. 2013; 15(2): 415-421.

(2) Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Bâ A, Gillis M, et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice Oryza breviligulata. *Applied and environmental microbiology*. 2000; 66(12): 5437-5447.

(3) Hilali A, Prévost D, Broughton WJ, Antoun H. Effets de l'inoculation avec des souches de Rhizobium leguminosarum biovar trifolii sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Canadian Journal of Microbiology*. 2001; 47(6): 590-593.

(4) Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008; 80(2): 199-209.

(5) Yanni YG, Rizk RY, El-Fattah FKA, Squartini A, Corich V, Giacomini A, et al. The beneficial plant growth-promoting association of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii with rice roots. *Functional Plant Biology*. 2001; 28(9): 845-870.

(6) Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251(1): 1-7.

(7) Arshad M, Saleem M, Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in biotechnology*. 2007; 25(8): 356-362.

(8) Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European journal of plant pathology*. 2007; 119: 329-339.

(9) Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya CS, Kalra A. ACC deaminase-containing Arthrobacter protophormiae induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in Pisum sativum. *Journal of plant physiology*. 2014; 171(11): 884-894.

(10) Shagol CC, Subramanian P, Krishnamoorthy R, Kim K, Lee Y, Kwak C. et al. ACC Deaminase Producing Arsenic Tolerant Bacterial Effect on Mitigation of Stress Ethylene Emission in Maize Grown in an Arsenic Polluted Soil. *Korean journal of soil science and fertilizer*. 2014; 47(3): 213-216.

(11) Yan J, Smith MD, Glick BR, Liang Y. Effects of ACC deaminase containing rhizobacteria on plant growth and expression of Toc GTPases in tomato (Solanum lycopersicum) under salt stress. *Botany*. 2014; 92(11): 775-781.

(12) Bal HB, Nayak L, Das S, Adhya TK. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*. 2013; 366(1-2): 93-105.

(13) Jha CK, Annapurna K, Saraf M. Isolation of Rhizobacteria from Jatropha curcas and characterization of produced ACC deaminase. *Journal of basic microbiology*. 2012; 52(3): 285-295.

(14) Qin S, Zhang YJ, Yuan B, Xu PY, Xing K, Wang J, Jiang JH. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte Limonium sinense (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and soil*. 2014; 374(1-2): 753-766.

(15) Chen Y, Barak P. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*. New York: Academic Press; 1982.

(16) Johnson GV, Barton LL. Selected physiological responses associated with Fe (III) and Fe (II) metabolism. *Iron chelation*

www.SID.ir

Archive of SID

in plants and soil microorganisms. California: Academic Press; 1993.

(17) Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, Mengel K. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils.* 2000; 30(5-6): 433-439.

(18) Schroth MN, Hancock JG. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*. 1982; 216(4553): 1376-1381.

(19) Wright W, Little J, Liu F, Chakraborty R. Isolation and structural identification of the trihydroxamate siderophore vicibactin and its degradative products from Rhizobium leguminosarum ATCC 14479 bv. trifolii. *BioMetals.* 2013; 26(2): 271-283.

(20) Waheed A, Afzal A, Sultan T, Ijaz F, Manan S, Zia MA. et al. Isolation and biochemical characterization of rhizobium from pea crop at Swabi. *International Journal of Biosciences (IJB).* 2014; 4(8): 231-240.

(21) Jacobson CB, Pasternak JJ, Glick BR. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium Pseudomonas putida GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 1994; 40(12): 1019-1025.

(22) Shahzad SM, Khalid A, Arshad M. Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. *Soil and Environment.* 2010; 29(1): 38-46.

(23) Payne SM. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in enzymology*. 1994; 235: 329-344.

(24) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition, John Wiley and sons, Inc., New York, 1512 pp; 1995.

(25) Nezhad SS, Khorasgani MR, Emtiazi G, Yaghoobi MM, Shakeri S. Isolation of copper oxide (CuO) nanoparticles resistant Pseudomonas strains from soil and investigation on possible mechanism for resistance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014; 30(3):809-817.

(26) Murset V, Hennecke H, Pessi G. Disparate role of rhizobial ACC deaminase in root-nodule symbioses. *Symbiosis.* 2012; 57(1): 43-50.

(27) Abeles FB, Morgan PW, Saltveit Jr ME. *Ethylene in plant biology*. California: Academic Press. 1992.

(28) Spaink HP. Ethylene as a regulator of Rhizobium infection. *Trends in Plant Science.* 1997; 2(6): 203-204.

(29) Nukui N, Ezura H, Yuhashi KI, Yasuta T, Minamisawa K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in Lotus japonicus and Macroptilium atropurpureum. *Plant and Cell Physiology.* 2000; 41(7): 893-897.

(30) Lin Z, Zhong S, Grierson, D. Recent advances in ethylene research. *Journal of experimental botany*. 2009; 60(12): 3311-3336.

(31) Glick BR, Penrose DM, Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology.* 1998; 190(1): 63-68.

(32) Ma W, Penrose DM, Glick BR. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. *Canadian journal of microbiology*. 2002; 48(11): 947-954.

(33) Duan J, Müller KM, Charles TC, Vesely S, Glick BR. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microbial ecology.* 2009; 57(3): 423-436.

(34) Ma W, Sebestianova SB, Sebestian J, Burd GI, Guinel FC, Glick BR. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

www.SID.ir

Archive of SID

deaminase in Rhizobium spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2003; 83(3): 285-291.

(35) Kuhn S, Stiens M, Pühler A, Schlüter A. Prevalence of pSmeSM11a-like plasmids in indigenous Sinorhizobium meliloti strains isolated in the course of a field release experiment with genetically modified S. meliloti strains. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008; 63:118–131.

(36) Tittabutr PP, Awaya JD, Li QX, Borthakur D. The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2008; 31(2): 141-150.

(37) Hemantaranjan A, Garg OK. Introduction of nitrogen-fixing nodules through iron and zinc fertilization in the nonnodule-forming French bean (phaseolus vulgaris L.). *Journal of Plant Nutrition*. 1986; 9(3-7): 281-288.

(38) O'HARA GW, Dilworth MJ, Boonkerd N, Parkpian P. Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with Bradyrhizobium sp. *New Phytologist*. 1988; 108(1): 51-57.

(39) Rai R, Singh SN, Prasad V. Effect of pressmud amended pyrite on symbiotic N2-fixation, active iron contents of nodules, grain yield and quality of chick pea (cicer arietinum Linn.) Genotypes in calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition*. 1982; 5(4-7): 905-913.

(40) Marek-Kozaczuk M, Deryto M, Skorupska A. Tn5 insertion mutants of Pseudomonas sp. 267 defective in siderophore production and their effect on clover (Trifolium pratense) nodulated with Rhizobium leguminosarum bv. trifolii. *Plant and soil*. 1996; 179(2): 269-274.

(41) Carson KC, Meyer JM, Dilworth MJ. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. 2000; 32(1): 11-21.

(42) Mehdipour Moghaddam M, Emtiazi G, Bouzari M. Improvement of endophytic Azospirillum colonization by co-inoculation with Cellulomonas Uda ATCC 491. *Biological Journal of Microorganisms*. 2014; 3 (9) :99-112

(43) Reigh GERALDINE, O'Connell MICHAEL. Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of Rhizobium meliloti. *Journal of bacteriology*. 1993; 175(1): 94-102.

(44) Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L, Du B. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40(2): 276-284.

(45) Fabiano E, Gualtieri G, Pritsch C, Polla G, Arias A. Extent of high-affinity iron transport systems in field isolates of rhizobia. *Plant and soil*. 1994. 164(2): 177-185.

(46) Berraho EL, Lesueur D, Diem HG, Sasson A. Iron requirement and siderophore production in Rhizobium ciceri during growth on an iron-deficient medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1997; 13(5): 501-510.

[1]- 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase
[2]- Yeast Extract Mannitol Agar
[3]- National Center for Biotechnology Information [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]
[4]- Ma
[5]- Duan
[6]- Tian
[7]- Reigh and OConnel
[8]- Fabiano
[9]- Barraho

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation and screening of native ACC deaminase and siderophore producing rhizobia

Behnaz Oujand
M.Sc Student of plant breeding, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, behnaz.oujand@yahoo.com
Mahmood Maleki *
Assistant professor of Plant Breeding, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, maleki.li@gmail.com
Shahryar Shakeri
Assistant professor of Microbiology, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, shahryar.shakeri@yahoo.com
Sedigheh Norouzpoor
MSc Student of plant breeding, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, sedighe.poorahmadi@yahoo.com
Parvaneh Abedi
M.Sc. Student of Microbiology, Shahid Bahonar university, Kerman, Iran, parvanehabedi2008@gmail.com
Abdolhamid Namaki-Shoushtari
Associate professor of Microbiology, Shahid Bahonar university, Kerman, Iran, genabns2@yahoo.com

Abstract

Introduction: Rhizobia are bacteria that have a symbiosis with legumes. Rhizobia that have some capabilities like ACC deaminase and siderophore production in addition to nitrogen fixation are successful competitors in different environmental conditions for production of more nodules. The aim of this study was the screening of ACC deaminase and siderophore producing Rhizobia.

Materials and methods: For screening of ACC deaminase producing rhizobia, all isolates were cultured on M9 medium with two different nitrogen sources, ACC and NH4Cl, and M9 medium without nitrogen source was considered as a control treatment. ACC deaminase producing Rhizobia were identified based on statistical comparison of growth rate on M9 medium with ACC against other mediums. Chrome Azurol S (CAS) liquid assay was used for siderophore producing Rhizobia. All treatments repeated two times and all data analyzed in the base of the completely randomized design. 16S rRNA gene sequencing was used for identifying the best ACC deaminase and siderophore producing strain.

Results: 14 isolates of *Rhizobium* were used for screening of ACC deaminase and siderophore producing isolates. Results showed that just R8 strain was isolated with the capability of ACC deaminase production. This isolate could have better growth on M9 with ACC than two other mediums. In the next experiment, it was determined that 8 isolates are siderophore producing rhizobia based on CAS liquid assay. The result showed that R12 isolate could produce more siderophore than others. According to 16S rRNA gene sequencing, R8 and R12 isolates identified as *Sinorhizobium meliloti*.

Discussion and conclusion: The R8 strain that have the capability of ACC deaminase production probability can prevent adverse effects of ethylene during nodulation and abiotic stress. On the other side, R12 that are able to produce siderophore can prevent the growth of soil born pathogen in addition to facilitating nodulation and iron uptake by plants.

Key words: *Rhizobium, ACC deaminase, Siderophore*

* Corresponding author
Received: June 1, 2015 / **Accepted:** October 28, 2015

www.SID.ir