

تأثیر سودوموناس‌های فلورسنت با فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز بر شاخص‌های

رشد کلزا در شرایط شور

فرزاد جلیلی^{1*}، کاظم خاوازی²، هادی اسدی رحمانی²

تاریخ دریافت: 89/5/10 تاریخ پذیرش: 90/4/22

1- عضو هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد خوی

2- اعضاء هیئت علمی موسسه تحقیقات خاک و آب

* مسئول مکاتبه: Email:farjalili@yahoo.com

چکیده

شوری خاک، یکی از مهمترین تنش‌های غیر زنده‌ای است که باعث کاهش قابلیت تولید محصول می‌شود. این پژوهش به منظور بررسی تاثیر سودوموناس‌های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز بر شاخص‌های رشد کلزا در سطوح مختلف شوری اجرا شد. آزمایش بصورت فاکتوریل در پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در شرایط کنترل شده و در گلخانه صورت گرفت. فاکتور باکتری در 4 سطح شامل جدایه‌های P.p.11، P.p.108، P.f.169 و P.f.196 و یک سطح بدون باکتری به عنوان شاهد، فاکتور شوری نیز در 4 سطح شامل شوری های 0/335 (به عنوان شاهد)، 5، 10 و 15 دسی‌زیمنس بر متر بود که از رقیق کردن آب شور طبیعی به درجات مختلف حاصل شدند. نتایج نشان داد که تلقیح با باکتری‌های منتخب در تعدیل اثرات مضر شوری در دوره رشد رویشی و زایشی کلزا موثر بوده است. با افزایش در میزان شوری شاخص‌های ارتفاع گیاه، سطح برگ، وزن تازه و خشک، مقدار آب نسبی، پتانسیل آب برگ، تعداد خورجین‌های نابارور، عملکرد بیولوژیک و دانه، همگی کاهش ولی مقاومت روزنه‌ای افزایش یافت. مقایسه میانگین نتایج نشان می‌دهد که در هر سطح شوری مورد مطالعه، تلقیح با باکتری‌های منتخب باعث کند شدن روند کاهش در صفات رشد مورد مطالعه در اثر شوری بوده است. بطوری که باکتری‌ها توانستند شاخص‌های رشد گیاه را در شرایط شور به‌طور معنی‌داری بهبود بخشند.

واژه های کلیدی: تنش شوری، سودوموناس های فلورسنت، کلزا، ACC-دآمیناز

Effects of Fluorescent Pseudomonads with ACC Deaminase Activity on Growth Characteristics of Canola (*Brassica napus* L.) under Salinity Condition

F Jalili¹, K Khavazi² and H Asadi Rahmani²

Received: 01 July 2011 Accepted: 13 August 2010

¹Scientific member of Khoy Azad University, Khoy, Iran

²Research Assistant Professor of Soil and Water Research Institute, Tehran, Iran

*Corresponding author: E-mail: farjalili@yahoo.com

Abstract

Salinity stress is of great importance due to reducing crop yield in arid and semiarid areas of the world. This research was conducted to evaluate of fluorescent pseudomonads with ACC deaminase activity on growth characteristics of canola (*Brassica napus* L.) under salinity conditions. The experiment was conducted by factorial experiments on the basis of completely randomized design with four replications and under controlled conditions in a green house. The bacterial species included P.p11, P.p.108, P.f.169 and P.f.196 and the control; the salinity levels were 0.335 (control), 5, 10, and 15 dS/m created by diluting a highly natural saline water by various degrees. According to the results inoculation with the selected species was effective on alleviating the unfavorable effects of salinity on canola growth during the vegetative and reproductive growth stages. Increase in salinity reduced plant height, leaf area index, fresh and dry weight, relative water content, leaf water potential, fertile ears, biological and grain yield. It, however, increased stomatal resistance. The mean comparisons indicated that at each level of salinity inoculation with the selected bacteria decreased the negative effects of salinity on the examined parameters.

Keywords: ACC Deaminase, Canola, Fluorescent Pseudomonads, Salinity

مقدمه

فعالیت اندک عناصر ضروری، نسبت زیاد Na/Ca، Mg/Ca، Na/K و Cl/NO₃ در گیاه، منجر به ناهنجاری‌های تغذیه‌ای، کاهش رشد و کیفیت محصول می‌شود (مانس 2002، هاسگاوا و همکاران 2000). در شرایط شور، اولین ناهنجاری فیزیولوژیکی در طی جوانه‌زنی اتفاق می‌افتد. علت این ناهنجاری پائین بودن پتانسیل آب در دسترس گیاه و در نتیجه جذب آب

شوری از مهمترین فاکتورهای محدود کننده تولید در اراضی کشاورزی بسیاری از مناطق دنیاست. شوری خاک به طرق مختلفی عملکرد محصول را متاثر می‌سازد. از مهمترین عوارض شوری می‌توان به کاهش آب قابل استفاده گیاه، ایجاد مسمومیت توسط برخی یون‌های سمی، تنش‌های اسمزی، کمبود عناصر غذایی،

مهم زراعی می‌شوند. مطالعات زیادی در مورد تأثیر باکتری‌های PGPR بر رشد و عملکرد گیاهان زراعی انجام شده است. یکی از مهمترین نشانه‌های تأثیر باکتری‌های محرک رشد روی گیاهان، افزایش رشد ریشه آنها می‌باشد که مورد توجه بسیاری از محققان بوده است (گلیک و همکاران 1995). چن و همکاران (1994) سویه‌هایی از باکتری‌های محرک رشد گیاه را از ریشه گیاه کلزا و از منطقه ریزوسفری جداسازی کردند و با تلقیح 5 سویه از آنها به کلزا، افزایش 11/5 درصدی در عملکرد مشاهده کردند، سویه‌های فوق توانسته بودند سرعت جوانه‌زنی و رشد رویشی کلزا را افزایش دهند.

به منظور بررسی تأثیر تلقیح باکتری *Azospirillum lipoferum* بر کاهش اثرات منفی تنش شوری بر گیاهچه‌های گندم، باسیلیو و همکاران (2004) نشان دادند که کلنیزاسیون ریشه‌های گندم تحت شوری‌های 80 و 160 میلی‌مولار NaCl مشابه کلنیزاسیون این گونه باکتری تحت شرایط غیر شور بود. این میزان شوری تأثیر بازدارندگی معنی‌داری بر توسعه گیاهچه‌ها داشت اما رشد باکتری‌های مذکور را متأثر نکرد. همچنین تلقیح باکتری مذکور کاهش رشد گیاه را در شوری 160 میلی‌مولار NaCl تعدیل کرد. این محققان در توضیح پدیده تعدیل تنش شوری کلرید سدیم توسط باکتری‌های *Azospirillum spp.* در گندم چنین اظهار داشته‌اند که این باکتری ممکن است به دلیل بهبود جذب آب و در نتیجه افزایش فشار تورمی در پتانسیل کم آب بذرهای تلقیح شده منجر به بروز چنین عکس‌العملی شده باشد. در تحقیقات هامالوئی و همکاران (2001) نشان داده شده است که تلقیح خود و باقلا با *Azospirillum* در شرایط آبیاری با آب شور، رشد بهتری نسبت به گیاهان تلقیح نشده داشته است. همدیا و الکومی (1997) نشان داده‌اند که تلقیح ذرت با *Azospirillum sp.* در شوری‌های بالای حاصل از نمک NaCl افزایش معنی‌داری در میزان کلروفیل، Ca، K، قندهای محلول و پروتئین نسبت به شاهد (تلقیح نشده) داشته است. در بررسی مکانیسم‌های تحمل به نمک و

کمتر می‌باشد. این وضعیت منجر به یک سری فعالیت‌های متابولیکی از قبیل تغییر در فعالیت آنزیم‌ها، ناهماهنگی در متابولیسم نیتروژن و عدم تعادل در سطوح تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌گردد (مانس 2002).

عکس‌العمل ارقام براسیکا به شوری، به غلظت نمک در بافت گیاهی، ترکیب نمک، مدت زمان قرار گرفتن در معرض نمک و شرایط آب و هوایی بستگی دارد. کلزا بر اساس تقسیم بندی ماس و هافمن (1977) در گروه گیاهان متحمل به شوری قرار دارد. مطالعه علی و همکاران (2003) بر روی کلزا رقم دانکلد نشان دادند که افزایش غلظت کلرید سدیم از 30 به 60 و 90 میلی‌مولار به ترتیب باعث کاهش 23 و 42 درصدی وزن خشک ساقه‌چه و نیز به ترتیب کاهش 30 و 20 درصدی وزن ریشه‌چه در مقایسه با تیمار شاهد (30 میلی‌مولار) گردید. بر اساس تحقیقات جمیل و همکاران (2005) شوری اثرات معنی‌داری بر کاهش سطح برگ و تعداد برگ در گونه‌های براسیکا داشت. همچنین با افزایش در میزان شوری وزن تازه ریشه و اندام هوایی کاهش یافت. تنش شوری میزان نمک‌های آلی را در ارقام براسیکا تحت تأثیر قرار می‌دهد. قاسم (2002) دریافت که با افزایش مقدار NaCl در محیط رشد ارقام کلزا، مقدار قند افزایش اندکی پیدا کرد، رقم متحمل به شور دانکلد کمترین مقدار قند و نوع حساس یعنی سیکلون در مرتبه دوم قرار داشت.

شوری خاک مشکلات بی‌شماری را برای کشاورزی تحت آبیاری بوجود آورده است استفاده از مهندسی ژنتیک در تولید گیاهان تراریخته مقاوم به شوری و همچنین استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه جهت تلقیح بذر یا گیاهچه و نیز استفاده از قارچ‌های میکوریز شاید از راهکارهای مفید و سودمند برای تسهیل رشد گیاهان در خاک‌های شور باشد (مایاک و همکاران 2004 الف، باسیلیو و همکاران 2004). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه یا (PGPR)¹ موجب افزایش رشد و عملکرد محصولات

¹ Plant growth promoting rhizobacteria

آنزیم ACC - دآمیناز است. آنزیم کاتالیز کننده این واکنش ACC - دآمیناز می باشد که ACC را به آلفاکتوبوتیرات و آمونیاک هیدرولیز می کند (پنروز و گلیک 2003). هیدرولیز ACC توسط باکتری مستقر در خارج گیاه موجب کاهش میزان ACC موجود در ریزوسفر یا اندوریزوسفر می گردد.

سودوموناس ها دارای اثرات مثبت در افزایش رشد گیاه بوده و باعث می شود که توانایی گیاه در تحمل بیمارگرهای گیاهی بیشتر شود در نتیجه باعث افزایش عملکرد محصول می گردد (نانداکومار و همکاران 2001). با این حال دانش ما در مورد مکانیسم عمل سودوموناس های فلورسنت در گیاه در مقابله با تنش نمک ناچیز می باشد. اکثر مطالعات در ارتباط با باکتری های دارای آنزیم ACC - دآمیناز در ترفیع رشد گیاه در شرایط تنش ناشی از غرقاب، خشکی، پاتوژن های گیاهی و فلزات سنگین بوده و در کاهش تنش شوری گیاهان تحقیقات کمی صورت گرفته است. با توجه به اینکه سویه های بومی سودوموناس های فلورسنت از نظر نقش مفیدی که احتمالاً به طور مستقیم در تحریک رشد و نمو گیاه در شرایط تنش شوری داشته باشند بررسی نشده است لذا این تحقیق با هدف بررسی تاثیر گونه های مختلف سودوموناس های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC - دآمیناز، بر شاخص های فیزیولوژیکی کلزا در سطوح مختلف شوری انجام شد.

مواد و روش ها

به منظور بررسی اثرات محرک رشد چهار سویه P.f.11, P.p.108, P.f.169 و P.f.196 بر عملکرد کلزا در شرایط شور پژوهشی بصورت آزمایشات فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با 4 تکرار در گلدان و در گلخانه اجرا گردید. در این تحقیق P.p و P.f به ترتیب بیانگر *Pseudomonas fluorescence* و *Pseudomonas putida* می باشد که به صورت سویه های 11, 108, 169 و 196 نامگذاری شده اند و در کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک

اثرات متقابل تلقیح با *Azospirillum brasilense* در ارقام ذرت رشد کرده در شرایط تنش شوری حمدی و همکاران (2004) نشان داده اند که تحمل به نمک در ارقام تلقیح شده افزایش یافته است، و باعث افزایش عملکرد ماده خشک، سطح برگ، قندهای کل و محلول، پروتئین محلول در بخش هوایی و پروتئین کل ریشه در تیمارهای تحت تنش شوری شده است. ایشان همچنین نتیجه گیری کرده اند که تجمع پرولین در گیاهان تلقیح شده به طور معنی داری کاهش یافته است با این حال جذب سدیم را کاهش، اما جذب پتاسیم و کلسیم را افزایش داده است.

در بررسی افزایش مقاومت گوجه فرنگی به تنش نمک از طریق باکتری های محرک رشد گیاه دارای فعالیت آنزیم ACC - دآمیناز، مایاک و همکاران (2004 الف) نشان دادند که تلقیح باکتری *Achromobacter piechaudii* وزن تازه و خشک گوجه فرنگی را در غلظت نمک 172 میلی مولار NaCl افزایش و تولید اتیلن را کاهش داده است، اما بر میزان سدیم گیاه تأثیر نداشت. تلقیح همچنین کارایی مصرف آب و طول گیاهچه های کوچک را در شرایط شور افزایش داده است. در ادامه این بررسی، ایشان نتیجه گیری کرده اند که باکتری از طریق آنزیم ACC - دآمیناز و کاهش تولید اتیلن توسط گیاهچه ها، مقاومت گیاه را به تنش شوری افزایش داده و در نتیجه کاهش رشد را جبران کرده است. همچنین با اینکه تلقیح نتوانسته بود وضعیت آبی گیاه را تغییر دهد ولی کارایی مصرف آب را افزایش داده بود.

محققان زیادی اثرات مثبت باکتری های محرک رشد گیاه دارای آنزیم ACC - دآمیناز در کاهش تنش و در نتیجه افزایش رشد را در شرایط تنش زا مثل غرقاب (گریچکو و گلیک 2001)، آلودگی به فلزات سنگین (گریچکو و همکاران 2000)، حضور بیمارگرهای گیاهی (ونگ و همکاران 2000)، شوری فزاینده و خشکی بالا (مایاک و همکاران الف و ب 2004) گزارش داده اند.

یکی از مکانیسم های اصلی باکتری های محرک رشد گیاه، کاهش دادن میزان اتیلن گیاه از طریق تولید

برای تهیه محلول‌های شور مورد استفاده از آب شور طبیعی دریاچه نمک واقع در قم استفاده شد. مشخصات آن در جدول 2 آمده است. با استفاده از آب شرب با EC برابر 0/335 دسی‌زیمنس بر متر شوری‌های 5، 10 و 15 دسی‌زیمنس بر متر تهیه گردید. برای خارج کردن اضافی نمک‌ها از خاک گلدان از آبشویی بهره گرفته شد.

خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در جدول 1 آمده است. پس از کاشت، گلدان‌ها درون اتاق رشد قرار داده شدند. بعد از سبز شدن کامل، بوته‌ها تنک شده و در هر گلدان 6 بوته نگه داشته شد. طول مدت روشنایی 16 و تاریکی 8 ساعت بوده و گلدان‌ها در دمای 26 درجه سلسیوس و در رطوبت محدوده ظرفیت مزرعه‌ای (FC) به مدت 150 روز نگهداری شدند.

فاکتورهای مورد مطالعه در دوره رشد رویشی

پس از رسیدن گیاه به مرحله گلدهی از 6 بوته موجود در گلدان، 3 بوته را از طوقه بریده و بلافاصله پس از توزین در آون با دمای 70 درجه سلسیوس به مدت 96 ساعت خشک و سپس وزن شد. سی روز پس از اعمال تنش شوری در طی دوره رشد رویشی میزان سبزی‌نگی به وسیله کلروفیل متر مدل SPAD 502 و سطح برگ با مساحت سنج دوربین مدار بسته تعیین گردید. با اعمال 15 دقیقه دوره تاریکی، فلئورسانس کلروفیل با استفاده از کلروفیل فلئورومتر² بر روی سطح رویی برگ اندازه‌گیری گردید.

فاکتورهای مورد مطالعه در دوره رشد زایشی

برای تعیین مقدار نسبی آب (RWC) برگ‌های سوم و چهارم از انتهای گیاه (برگ کاملاً توسعه یافته) قطع و پس از اندازه‌گیری پتانسیل آب آنها توسط دستگاه محفظه فشار، مقدار نسبی آب در دیسک‌های برگ تعیین گردید. چهل و پنج و 65 روز بعد از اعمال

و آب نگهداری می‌شدند. فاکتورهای آزمایش شامل فاکتور شوری آب آبیاری با 4 سطح 0/335 (شاهد)، 10.5 و 15 dS/m، سویه باکتری با 4 سطح باکتری شامل سویه‌های P.p.11، P.p.108، P.f.169 و P.f.196 و یک تیمار بدون باکتری بود.

سویه‌های مورد استفاده در این تحقیق، قبلاً توسط جلیلی و همکاران (2008) جداسازی شده‌اند. این باکتری‌ها شامل P.p.11، P.p.108، P.f.169 و P.f.196 بودند، که توانایی تولید سیدروفور، مواد شبه اکسین و فعالیت ACC-دآمیناز داشتند. برای تهیه مایه تلقیح از این جدایه‌ها، یک لوپ از هر سویه باکتری به‌طور اسپتیک به ارلن‌های 100 میلی‌لیتری حاوی 50 میلی‌لیتر محیط کشت مایع TSB¹، شامل 2/5 گرم در لیتر دکستروز، 2/5 گرم در لیتر K₂HPO₄، 5 گرم در لیتر NaCl، 3 گرم در لیتر پپتون سویا و 17 گرم در لیتر تریپتون) انتقال داده شد. سپس ارلن‌ها روی شیکر با دور 120 در دقیقه و دمای 28 درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از 36 ساعت رشد باکتری‌ها در این محیط، مایه تلقیح سویه‌ها آماده شد. قبل از تلقیح، تراکم جمعیت باکتری‌ها به روش شمارش کلونی تعیین گردید.

بذر کلزا (*Brassica napus* L.) رقم هیولا 308 تهیه شده از بانک ژن موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر با استفاده از الکل 70 درصد به مدت یک دقیقه و هیپوکلریت سدیم 1/5 درصد به مدت 10 دقیقه استریل سطحی شد. سپس به منظور حذف هیپوکلریت سدیم، بذرها با استفاده از آب مقطر استریل 10 بار شستشو شده و به مدت 24 ساعت در زیر هود بیولوژیک قرار داده شدند. بذرها استریل سطحی شده به ارلن‌های حاوی مایه تلقیح باکتری اضافه و به مدت 30 دقیقه بر روی شیکر با 120 دور در دقیقه و دمای 28 درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس بذرها از داخل ارلن خارج و به منظور حذف رطوبت اضافی بر روی دستمال کاغذی استریل قرار داده شدند.

² Hansatech Instruments Ltd.England (Handy PEA model)

¹ Trypton soya broth

جدول 1- خصوصیات شیمیایی و فیزیکی خاک مورد مطالعه (جلیلی 1386)

Cu	Zn	Mn	Fe	K	P	OC (%)	N (%)	بافت	درصد اشباع	EC (dS/m)	pH
(mg/kg)											
1/32	0/8	14/4	5/4	269	8/1	0/47	0/05	Loam	30	2/19	7/57

جدول 2- خصوصیات شیمیایی آب شور دریاچه نمک در زمان نمونه برداری (جلیلی 1386)

B	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	CO ₃ ⁻²	Na	K	Ca	Mg	EC (dS/m)	pH
(mg/L)									
54	3687/1	144/6	141/5	3485/3	7/7	341/2	376	521	8/5

گردید (جدول 3). شاخص سطح برگ نیز در اثر تلقیح با هر چهار سویه، نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) یافت. تلقیح بذرها با سویه‌های P.p.11 و P.p.108 تاثیر معنی‌دار مثبتی بر شاخص سبزیگی داشت. همچنین هیچ یک از سویه‌ها تاثیر معنی‌دار مثبتی بر وزن تازه و خشک و فلئورسانس کلروفیل (Fv/Fm) نگذاشتند.

در تیمارهای با شوری 15 دسی‌زیمنس بر متر، فلئورسانس کلروفیل کاهش یافت. در شوری 5 دسی‌زیمنس بر متر تلقیح با هر چهار سویه باعث افزایش معنی‌دار شاخص سبزیگی، سطح برگ و وزن خشک اندام هوایی شد، اما ارتفاع گیاه را فقط سویه‌های P.p.11 و P.f.169 افزایش معنی‌داری دادند. تلقیح با سویه‌های P.f.169 و P.f.196 و وزن تازه، و تلقیح با سویه‌های P.f.196، P.f.169، و P.p.108 فلئورسانس کلروفیل (Fv/Fm) را به‌طور معنی‌داری افزایش دادند.

در شوری 10 دسی‌زیمنس بر متر نیز شاخص سبزیگی و سطح برگ، در اثر تلقیح با تمامی سویه‌ها، افزایش یافت، اما ارتفاع گیاه را سویه‌های P.f.169، P.p.108، و P.f.196 افزایش معنی‌داری دادند. وزن تازه در تلقیح با سویه‌های P.f.196 و P.f.169، و وزن خشک با تلقیح سویه‌های P.p.108، P.f.196، و P.f.169 و فلئورسانس کلروفیل در تلقیح با سویه P.p.11 به‌طور معنی‌دار افزایش یافتند.

سطوح شوری، مقاومت روزنه‌ای، با استفاده از پورومتر اتوماتیک¹ این اندازه‌گیری گردید. سرعت رشد نسبی (RGR) با استفاده از رابطه $RGR = (Lnw2 - Lnw1) / (t2 - t1)$ محاسبه گردید (کینگ بوری و همکاران، 1984) در رابطه $w1$ و $w2$ وزن‌های خشک بدست آمده در زمان‌های 30 و 100 روز بعد از اعمال تیمار شوری می‌باشد. پس از برداشت، کل اندام هوایی به مدت 92 ساعت در دمای 75 درجه سلسیوس در آون خشک گردیده و عملکرد بیولوژیک تعیین گردید. قبل از برداشت ارتفاع گیاه اندازه‌گیری شد و تعداد خورجین‌های بارور و نابارور در ساقه اصلی شمارش شد. با تعیین میزان دانه هر گل‌دان عملکرد اقتصادی محاسبه شد.

تجزیه واریانس کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

نتایج

تاثیر باکتری در مرحله رشد رویشی

در شرایط غیر شور، تلقیح کلزا با سویه‌های P.p.108 و P.f.196 باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع گیاه

¹ Delta- T. Devices, MK3 model

جدول ۳- بررسی تاثیر باکتری‌های منتخب بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی کارزا در مرحله رشد رویش

F_v, F_m	وزن خشک تک برته (g)	وزن تازه تک برته (g)	سطح برگه (mm ²)	شاخص سبزیگی (L)	ارتفاع (cm)	سویه	شوری (dS/m)						
۰.۸۲۱	a	۱۲۰۰	ac	۱۲۷۴	ab	۱۹۲۰	fh	۲۵۷۰	df	۲۵/۵۷	ef	۱۴.۱	۲۲۵
۰.۸۲۹	a	۰.۹۷	bc	۱۱۷۸	bd	۲۴۵/۵	a	۲۰/۲۲	ab	۲۶/۸۵	cf	P.p.11	
۰.۸۲۸	a	۱/۰۰	ac	۱۲۴۴	ac	۲۲۲/۰	ac	۲۹/۰۷	ac	۲۹/۲۰	ac	P.p.108	
۰.۸۲۵	ac	۱/۱۰	a	۱۲۰۷	a	۲۱۱/۲	de	۲۷/۱۲	bd	۲۷/۷۰	ae	P.f.1۶9	
۰.۸۲۶	ac	۱/۰.۸	ab	۱۲۰.۹	a	۲۲۲/۵	bd	۲۷/۲۰	bd	۲۸/۵۲	ad	P.f.196	
۰.۸۰۸	g	۰.۵۶	g	۸/۹۹	hi	۱۹۷/۷	eg	۲۶/۲۰	ε	۱۶/۲۵	dg	۱۴.۱	۵
۰.۸۱۲	eg	۰.۷۵	f	۹۶۰	fh	۲۲۲/۵	bd	۲۷/۵۲	be	۲۰/۰.۵	a	P.p.11	
۰.۸۲۴	ae	۰.۷۵	f	۹۶۵	fh	۲۲۷/۰	ab	۲۵/۶۰	df	۲۷/۲۵	bf	P.p.108	
۰.۸۲۰	af	۰.۸۱	df	۱۰/۱۱	fg	۲۲۲/۷	bd	۲۶/۹۰	eg	۲۹/۷۲	ab	P.f.1۶9	
۰.۸۲۶	ab	۰.۸۰	ef	۱۱/۲۷	de	۲۴۷/۷	a	۲۵/۵۰	df	۲۸/۸۲	ad	P.f.196	
۰.۸۱۱	fg	۰.۷۰	f	۹۶۰	fh	۱۸۲/۲	gi	۲۶/۲۵	fg	۲۲/۹۷	g	۱۴.۱	۱۰
۰.۸۲۵	ad	۰.۷۲	f	۹/۱۲	gi	۲۰۷/۲	df	۲۸/۰	bc	۲۶/۸۷	fg	P.p.11	
۰.۸۲۲	af	۰.۹۵	c	۹/۸۹	fh	۲۱۱/۰	de	۲۹/۵۰	ab	۲۷/۲۰	bf	P.p.108	
۰.۸۱۵	bg	۰.۹۰	ce	۱۰/۴۴	ef	۲۱۷/۲	cd	۲۹/۱۷	ab	۲۷/۲	ae	P.f.1۶9	
۰.۸۲۰	af	۰.۹۲	cd	۱۱/۶۰	vd	۲۱۲/۷	de	۲۰/۲۰	ab	۲۹/۴۵	ac	P.f.196	
۰.۸۹۵	h	۰.۸۲	df	۷/۹۲	j	۱۷۵/۵	hi	۳۶/۲۵	cf	۲۰/۲۷	h	۱۴.۱	۱۵
۰.۸۱۱	fg	۰.۸۱	df	۸/۱۹	ij	۱۶۵/۵	ij	۲۸/۷۵	bc	۲۰/۸۷	h	P.p.11	
۰.۸۱۴	dg	۰.۷۵	f	۸/۲۱	ij	۱۸۰/۸	hi	۲۹/۵۷	ab	۲۰/۸۷	h	P.p.108	
۰.۸۱۵	cg	۰.۸۱	df	۹/۰۷	hi	۱۵۲/۰	j	۲۷/۲۲	bd	۲۰/۹۲	h	P.f.1۶9	
۰.۸۱۲	fg	۰.۸۸	ce	۹/۲۶	gh	۱۸۲/۸	gh	۴۱/۶۵	a	۲۱/۱۰	h	P.f.196	
۰.۸۱۴	۰/۱۲	۰/۱۲	۱/۰۲	۱/۶۸	۱/۶۸	۲/۶۸	۲/۶۸	۲/۶۸	۲/۶۸	۲/۶۸	۲/۶۸	LSD _(0.05)	

+ F_{۱۱} داتورسانس متغیر، F_{۱۰} داتورسانس حداکثر

در شوری 15 دسی زیمنس بر متر فلئورسانس کلروفیل در اثر تلقیح با هر چهار سویه افزایش معنی‌داری داشت، سویه‌های P.p.108 و P.f.196 شاخص سبزیگی و سویه‌های P.f.196 و P.f.169، وزن تازه را افزایش معنی‌داری دادند.

تاثیر باکتری در مرحله رشد زایشی

در شرایط غیر شور، تلقیح با هر چهار سویه منتخب باعث افزایش مقدار آب نسبی و نرخ رشد نسبی شدند (جدول 4). سویه‌های P.p.108، P.p.11، و P.f.196 ارتفاع گیاه در زمان برداشت، سویه‌های P.f.169 و P.f.196 عملکرد بیولوژیک را به طور معنی‌داری افزایش دادند در حالی که سویه‌های P.p.11 و P.f.196 تعداد خورجین‌های نابارور را به طور معنی‌داری کاهش دادند.

در شوری 5 دسی زیمنس بر متر، تلقیح با سویه‌های منتخب باعث افزایش معنی‌دار در مقدار آب نسبی بافت و ارتفاع گیاه در زمان برداشت شد. سویه P.f.196 پتانسیل آب برگ، سویه P.p.108 عملکرد بیولوژیک و سویه P.p.11 عملکرد دانه را به طور معنی‌دار افزایش دادند، در حالی که سویه‌های P.p.108 و P.f.169 تعداد خورجین‌های نابارور را به طور معنی‌داری کاهش دادند. در شوری 10 دسی زیمنس بر متر با تلقیح هر چهار سویه مقدار آب نسبی بافت، عملکرد دانه و پتانسیل آب برگ به طور معنی‌داری افزایش یافت و سویه‌های P.p.11 و P.p.108 عملکرد بیولوژیک، سویه P.f.196 ارتفاع گیاه و سویه P.p.11 نوع رشد نسبی را به طور معنی‌داری افزایش دادند در حالی که سویه‌های P.p.108 و P.f.169 تعداد خورجین‌های نابارور را به طور معنی‌داری کاهش دادند.

در شوری 15 دسی زیمنس بر متر، افزایش مقدار آب نسبی بافت در اثر تلقیح با هر چهار سویه نیز معنی‌دار شد. سویه‌های P.f.169، P.f.196 پتانسیل آب برگ، سویه P.p.108 ارتفاع گیاه، سویه P.p.11 عملکرد دانه و سویه‌های P.p.11، P.p.108، و P.f.169 نرخ رشد نسبی را به طور معنی‌داری افزایش دادند، در حالی که سویه‌های P.p.11 و P.f.169 مقاومت روزنه‌ای را در مرحله اول اندازه‌گیری به طور معنی‌داری کاهش دادند.

بحث

تنش شوری باعث کاهش در میزان رشد، عملکرد دانه و عملکرد بیولوژیک گردید. منتهی آهنگ کاهش رشد در پارامترهای مورد مطالعه در اثر تلقیح با باکتری‌های منتخب کاهش یافت. به طوری که تلقیح با سویه P.p.11 باعث افزایش نرخ رشد نسبی در شوری‌های 10 و 15 دسی زیمنس بر متر و تلقیح با برخی از سویه‌های باعث افزایش در عملکرد بیولوژیک در شوری‌های مورد مطالعه گردیدند (جدول 4). اندازه‌گیری ماده خشک اندام هوایی و سرعت رشد نسبی نشان داد که کلزا یک رقم حساس به شوری می‌باشد. کاهش در ماده خشک به خاطر افزایش هزینه انرژی متابولیکی و کاهش در جذب کربن می‌باشد که به خاطر سازش با شرایط تنش نمک بوده است (نتوند و همکاران 2004). علت کاهش رشد هم‌چنین به خاطر اثر نمک بر روی بافت‌ها، کاهش سرعت فتوسنتز در واحد سطح برگ و نگهداری حداکثر غلظت نمک بر روی برگ‌های کاملاً توسعه یافته می‌باشد.

یکی از روش‌های اندازه‌گیری‌های سریع و سودمند برای بررسی وضعیت فتوسنتزی گیاه، استفاده از فلئورسانس کلروفیل یا اثر کواتسکی (اسکریبر 1995) است که یک شناساگر حساس از تبدیل انرژی فتوسنتزی است. این تبدیل در طی واکنش‌های مرحله نوری اتفاق می‌افتد. استفاده از فلئورسانس کلروفیل در تعیین تحمل به تنش‌های غیر زنده در گیاهان نتایج متفاوتی داشته‌است (بایبر 2006، مورانت و همکاران 2004). در این آزمایش تمامی اندازه‌گیری‌ها از F_v / F_m نشان داد که برگ‌ها از نظر فتوسنتزی فعال هستند و نسبت‌های نزدیک 0/83 بیانگر سالم بودن عمل فتو سیستم است (داک و همکاران 2001). در تحقیق حاضر، تلقیح برخی باکتری‌های منتخب در شرایط شور باعث افزایش

معنی‌دار فلئورسانس کلروفیل شد، که با یافته‌های بابیر (2006) مطابقت نداشت، بنابراین، به نظر می‌رسد سویه‌های منتخب احتمالاً از طریق بهبود جذب آب، افزایش در نمک‌های آلی تنظیم‌کننده اسمزی، باعث افزایش در رشد گیاه و در نتیجه افزایش عملکرد فتوسنتزی گیاه (Fv/Fm) شدند.

با افزایش در مقدار نمک مقاومت روزنه‌ای افزایش اما شاخص سبزی‌نگی که بیانگر میزان کلروفیل است تغییر چندانی نکرد. عموماً سرعت آسمیله شدن CO₂ در اثر شوری کاهش می‌یابد که بخش عمده این کاهش به خاطر کاهش در هدایت روزنه‌ای است (سیمن و کریچلری 1985)، در نتیجه دسترسی به کربن جهت ماده سازی کاهش می‌یابد. مقایسه میانگین مقاومت روزنه‌ای پس از 45 روز (مرحله اول اندازه‌گیری) اعمال تنش شوری حاکی از آن است که با تلقیح بذرهاي کلزا با سویه‌های منتخب، هم در شرایط شور و هم غیر شور، مقاومت روزنه‌ای بطور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافته است. اندازه‌گیری مقاومت روزنه‌ای پس از 65 روز (مرحله دوم اندازه‌گیری) اعمال تنش شوری نیز روندی مشابه حالت اول داشته است لیکن کاهش در مقاومت روزنه‌ای در اثر تلقیح با سویه‌های منتخب به سطح معنی‌داری نرسیده است. داونتون و همکاران (1985) نشان داده بودند که ظرفیت فتوسنتز در اسفناج تحت تنش شوری تا 200 میلی مول NaCl ثابت ماند اما هدایت روزنه‌ای و میزان کلروفیل کاهش یافت.

از شاخص‌های مهم دیگر در مطالعه اثر تنش‌ها بر روی گیاهان، استفاده از روابط آبی است که منعکس‌کننده فعالیت‌های متابولیکی گیاه می‌باشد. شوری به‌طور معنی‌داری ($p \leq 0.05$) پتانسیل آب برگ و مقدار آب نسبی را کاهش داد (جدول 4). بیشترین کاهش در پارامترهای مذکور مربوط به شوری 15 دسی زیمنس بر متر و تیمار تلقیح نشده بود. در شوری‌های بالا تلقیح با سویه‌های منتخب باعث شد از شدت کاهش در پتانسیل آب برگ و مقدار آب نسبی جلوگیری شود. تلقیح بذرهاي کلزا با سویه‌های منتخب در تمامی سطوح شوری باعث افزایش معنی‌دار در مقدار آب نسبی بافت نسبت به شاهد بدون تلقیح شد. تلقیح بذر با باکتری‌های منتخب در هر سطح شوری، مقدار آب نسبی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. به نظر می‌رسد که باکتری‌های منتخب، گیاه را جهت تولید متابولیت‌های سازگار ترغیب نموده است، در نتیجه با کاهش پتانسیل اسمزی در داخل گیاه شرایط برای جذب آب در محیط شور فراهم شده است. مایاک و همکاران (الف 2004) نیز نشان داد که با تلقیح *Achromobacter piechaudii* مقدار آب نسبی و کارایی مصرف آب افزایش یافت.

مطالعه حاضر نشان داد که رشد کلزا تحت شرایط شور، تحت تاثیر کمبود آب (تنش اسمزی) قرار گرفت تولید ماده خشک و سطح برگ با افزایش در میزان شوری محیط ریشه، بیشتر تحت تاثیر قرار گرفتند. این نتایج با تغییراتی در فتوسنتز و تنفس گیاه تحت تنش نمک بوده است. سطح برگ، به‌طور مشخص با افزایش شوری، کاهش یافت. با این حال در شرایط غیر شور و در شوری‌های 5 و 10 دسی زیمنس بر متر، تلقیح با سویه‌های منتخب باعث افزایش در سطح برگ می‌شود. براساس یافته‌های هان و لی (2005) با تلقیح دو گونه از باکتری‌های محلول‌رک ریشه گیاه، شامل *Serratia proteamaculans* و *Rhizobium leguminosarum* bv. *vicia* وزن تازه و خشک، طول برگ، سطح برگ و میزان کلروفیل کاهو هم در شرایط شور و غیر شور افزایش یافت. کاهش در سطح برگ ممکن است به کاهش در سرعت رشد، تأخیر در ظهور گیاهچه، پیری زود رس و نهایتاً از بین رفتن برگ نسبت داده شود. اخگر و خاوازی (1389) در بررسی نقش آنزیم ACC-دآمیناز در کاهش اثرات منفی شوری بر رشد کلزا نشان دادند که سویه *Pseudomonas fluorescens* strain pm12 که دارای فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز بود توانست شاخص‌های رشد کلزا از قبیل وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و مقدار سبزی‌نگی برگ را افزایش دهد در نتیجه سویه pm12 می‌تواند تولید اتیلن را کاهش دهد. جلیلی و همکاران (1386) نیز نشان دادند که سویه‌های دارای فعالیت آنزیم ACC-دآمیناز نسبت به

سویه‌های فاقد این ویژگی در افزایش جذب میزان عناصر غذایی توسط کلزا در شرایط شور موثر بوده‌است و به نظر می‌رسد

که این اثر احتمالاً مربوط به نقش آنزیم ACC-دآمیناز در کاهش سطح اتیلن در گیاه است. با افزایش در مقدار نمک، پتانسیل آب برگ کاهش یافت و این عامل می‌تواند منجر به کاهش آماس سلولی و در نتیجه کاهش رشد شود (مانس 2002). تحقیق حاضر نشان داد که در شرایط شور، تلقیح با سویه‌های منتخب باعث افزایش در میزان پتانسیل آب گیاه شده است، به طوری که در شوری 5 دسی زیمنس بر متر سویه P.p.11، در شوری 10 دسی زیمنس بر متر، سویه‌های P.p.108 و P.f.169 و در شوری 15 دسی زیمنس بر متر، سویه‌های P.p.11 و P.f.196 در اکثر صفات مورد مطالعه نسبت به بقیه برتر بودند. در نهایت، بر اساس نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که سویه‌های با فعالیت ACC-دآمیناز می‌توانند با بهبود شاخص‌های رشد کلزا، اثرات حاصل از تنش شوری را در کلزا رقم هیولا 308 کاهش دهند. با این حال تحقیقات زیادی جهت بررسی تاثیر آنها در شرایط مزرعه برای این رقم لازم است.

منابع مورد استفاده

اخگر ع و خاوازی ک، 1389. نقش آنزیم ACC-دآمیناز باکتریایی در کاهش اثرات منفی شوری بر رشد کلزا. مجله آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد 24، شماره 1. صفحات 154-165.

جلیلی ف، خاوازی ک، پذیرا ا و اسدی رحمانی ه، 1386. بررسی تاثیر باکتری‌های سودوموناس فلورسنت محرک رشد گیاه بر تعدیل اثرات مضر شوری در کشت کلزا، رساله دکتری خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

Ali A, Salim M, Ahmad I, Mahmood IA and Sultana A, 2003. Nutritional role of calcium on the growth of rapeseed (*Brassica napus* L.) under saline conditions. Pakistan J Agric Sci 40: 99-105.

Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez JP and Bashan Y, 2004. Mitigation of salt stress in wheat seedling by *agfp-tagged Azospirillum lipoferum*. Biol Fertil Soils 40:188-193.

Biber PD, 2006. Measuring the effects of salinity stress in the red mangrove, *Rhizophora mangle* L. Afr J Agric Res 1:1-4.

Chen Y, Mei R, Lu S, Liu L and Kloepper JW, 1994. The use of a yield increasing bacteria as PGPR in Chinese agriculture. In: Gupta UK and Uthede R (eds.). Management of Soil Born Diseases Narosa Publishing House, New Delhi, India.

Downton WJS, Grant WJR and Robinson SP, 1985. Photosynthetic and stomatal responses of spinach leaves to salt stress. Plant Physiol 77:85-88

Duke NC, Roelfsema C, Tracy D and Godson L, 2001. Preliminary investigation into the dieback of mangroves in the Mackay region. p. 81. Report to the Queensland Fisheries Service. QDPI, Brisbane, Australia.

Glick BR, Karaturovic D and Newell P, 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting rhizobacteria. Can J Microbiol 41: 533-536.

- Grichko VP and Glick BR, 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase -containing plant growth promoting bacteria. *Plant Physiol Biochem* 39:11-17.
- Grichko VP, Filby B and Glick BR, 2000. Increased of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC-دآمیناز to accumulate Cd,Co,Cu,Ni,Pb,and Zn. *J Biotech* 81:45-53.
- Hamdia MA and El-Komy HM, 1997. Effects of salinity, gibberelic acid and *Azospirillum* inoculation on growth and nitrogen uptake of *Zea mays*. *Biol Plant* 40:109-120.
- Hamdi MA, Shaddad MAK and Doaa MM, 2004. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regul* 44: 165–174.
- Hamaoui B, Abbadi JM, Burdman S, Rashid A, Sarig S, and Okon Y, 2001. Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas(*Cicer arietinum*) and faba beans(*Vicia faba*) under different growth conditions. *Agronomie* 21:553-560.
- Han HS and KD, Lee, 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Res J Agric Biol Sci* 1: 210-215.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK and Bohnert HJ, 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 51:463–499.
- Jamil M, Lee CC, Rehman SU, Lee DB, Ashraf M and Rhales 2005. Salinity(NaCl) toletance of *Brassica* species at germination and early seedling growth. *Electron J Environ Agric Food Chem* 4:970-976.
- Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Asadi Rahmani H,Najati AR, Rasuli H and Miransari M, 2008. Isolation and characterization of ACC deaminase producing fluorescent pseudomonads to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *J Plant Physiol* 166:667-674.
- Kingsbury RW, Epstein E and Percy RW, 1984. Physiological responses to salinity in selected lines of wheat. *Plant Physiol* 74: 45-25.
- Moss DN and Hoffman GJ, 1977. Analysis of crop salt tolerance data Pp:258-271. In: Shain I and Shalhevet J(eds.). *Soil salinity under irrigation: process and management*. Ecological Studies, No 51. Springer-Verlag. New York.
- Munns R, 2002. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell Environ* 25:239–250.
- Mayak S, Tirosh T and Glick BR, 2004a. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants salt stress. *Plant Physiol Biochem* 42:565-572.
- Mayak S, Tirosh T and Glick BR, 2004b. Plant growth promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci* 166:524-530.
- Morant A, Pradier E and Tremblin M, 2004. Osmotic adjustment, gas exchanges and chlorophyll fluorescence of a hexaploid triticale and its parental species under salt stress. *J Plant Physiol* 161:25-33.

- Nandakumar R, Babu S, Viswanathan R, Raguchander T and Samiyappan R, 2001. Induction of systemic resistance in rice against sheath blight disease by plant growth promoting rhizobacteria. *Soil Biol Biochem* 33: 603–612.
- Netondo GW, Onyango JC and Beck E, 2004. Sorghum and salinity. I: Response of growth, water relations, and ion accumulation to NaCl salinity. *Crop Sci* 44:797–805.
- Penrose DM and Glick BR, 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* 118:10-15.
- Qasim M, 2000. Physiological and biochemical studies in a potential oilseed crop canola (*Brassica napus* L.) under salinity (NaCl) stress. Ph.D thesis. Department of Botany, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan.
- Schreiber U, Bilger W and Neubauer C, 1995. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of *in vivo* photosynthesis Pp 49-70. In: Schulze ED, and Caldwell MM (eds.). *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer-Verlag, Berlin.
- Seemann JR and Critchley C, 1985. Effects of salt stress on the growth, ion content, stomatal behaviour and photosynthetic capacity of a salt sensitive species, *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* 164:151-162.
- Wang C, Knill E, Glick BR and Defago G, 2000. Effectc of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid(ACC) deaminase genes into *Pseudomonase fluorescens* strain CHAO and its *gacA* derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities.Can J Microbiol 46:898-907.