Archive of SID

تعیین پتانسیل تعدادی از ریزوبیومهای بومی به عنوان باکتریهای محرک رشد گیاه و نقش آنها در کاهش اتیلن تنشی

هوشنگ خسروی[۱]، باقر یخچالی[۲،*] و حسینعلی علیخانی[۱]

[۱]کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، گروه مهندسی علوم خاک

[۲]تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۳۰ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۲/۲۷

چکیده

مقدار اتیلن در شرایط تنشی به میزان قابل توجهی در گیاه افزایش پیدا می‌کند و باعث پیری زودرس گیاه می‌گردد. برخی از باکتریهای محرک رشد گیاه حاوی آنزیمی به نام ACC deaminase هستند که قادر است ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC) که پیش‌ماده مستقیم اتیلن در گیاهان است را به آمونیوم و آلفاکتوبوتیرات تبدیل و از این طریق موجب کاهش سطح اتیلن ناشی از تنش شود. در این تحقیق ۳۳۰ سویه ریزوبیوم از چهار گروه *Sinorhizobium meliloti* (۱٦۸ سویه)، *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (٤٤ سویه)، *R. leguminosarum* bv *phaseoli* (۵۸ سویه) و *Mesorhizobium ciceri* (٦۰ سویه) بومی خاکهای مناطق مختلف ایران از نظر توان تولید آنزیم ACC deaminase مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که ۲۸/۲ درصد از کل سویه‌ها دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase می‌باشند. بر اساس این طبقه‌بندی ٤٦/۵ درصد از سویه‌های *S. meliloti* ، ۱۳/٦ درصد از سویه‌های *Viciae* bv *R. leguminosarum*، ۸/٦ درصد از سویه‌های *R. leguminosarum* bv *Phaseoli* و ٦/۷ درصد از سویه‌های *M. ciceri* مورد مطالعه دارای این آنزیم تشخیص داده شدند. سویه‌های دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase بر اساس اندازه قطر کلنی روی محیط کشت ریزوبیوم حاوی ACC نسبت به شاهد در پنج گروه صفر، ٤-۲، ٦-٤، ۸-٦ و ۱۰-۸ میلی‌متر تقسیم‌بندی شدند. از هر گروه چهار سویه برای ادامه تحقیقات انتخاب شدند. توان تولید اکسین (IAA)، سیانید هیدروژن (HCN)، سیدروفور و توان حل‌کنندگی فسفاتهای آلی و معدنی نامحلول توسط سویه‌های انتخابی نیز بررسی شد. نتایج نشان داد که توان تولید ایندول استیک اسید (IAA) در سویه‌های مختلف انتخابی بین صفر تا ۲۱ میکروگرم در میلی‌لیتر در ۲٤ ساعت بود. توان تولید سیدروفور بر اساس میانگین نسبت قطر هاله به کلنی بر روی محیط CAS آگار بین صفر تا ۲/۷ بود. توان حل کنندگی فسفاتهای آلی و معدنی نامحلول و تولید سیانید هیدروژن در سویه‌های انتخابی مشاهده نگردید. توسعه کودهای زیستی دارای مزیت تولید آنزیم ACC deaminase یکی از مهمترین اهداف ادامه تحقیق بر روی این سویه‌ها است.

واژه های کلیدی: ریزوبیوم، ACC deaminase، اتیلن، کودهای زیستی.

* نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۰۲۱٤٤۸۵۰۳۵۳، پست الکترونیک: bahar@nigeb.ac.ir

مقدمه

باکتریهای محرک رشد گیاه یا اصطلاحاً PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) از طریق مکانیسمهای متفاوتی بر شاخصهای مختلف رشد گیاه تأثیر می‌گذارند. از جمله این مکانیسمها می‌توان به توانایی تولید هورمون ایندول استیک اسید یا IAA، جیبرلیک اسید، سیتوکینین، تثبیت غیر همزیستی نیتروژن، توان حل‌کنندگی

www.SID.ir

Archive of SID

فسفاتهای نامحلول و سایر عناصر غذایی، کنترل پاتوژنهای گیاهی از طریق ایجاد رابطه آنتاگونیستی با آنها که ممکن است بوسیله تولید آنتی‌بیوتیک، سیانید هیدروژن، کیتیناز و سیدروفور باشد اشاره کرد (۵). از جمله باکتریهای PGPR می‌توان به *Azospirillum*، *Acetobacter*، *Azotobacter* و *Pseudomonas* اشاره نمود. ریزوبیومها نیز معمولاً از طریق تثبیت همزیستی نیتروژن می‌توانند بر رشد لگومها مؤثر واقع شوند. برخی از سویه‌های ریزوبیوم قادرند بر رشد گیاهان غیر لگوم نیز از طریق مکانیسمهای غیر از تثبیت نیتروژن مؤثر واقع شوند. هوفلیچ و همکاران (۱۹۹٤) گزارش دادند که تلقیح باکتری *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* به طور قابل توجهی موجب افزایش عملکرد ماده خشک گندم، ذرت و جو شد (۱۲).

اتیلن یکی از هورمونهای تنظیم کننده رشد گیاهی است که در مراحل رسیدگی میوه، فتوسنتز، تنفس، تعرق، جنین‌زایی، ریشه‌زایی، تکامل اندامهای جنسی، جوانه‌زنی بذور و بسیاری خصوصیات دیگر گیاه نقش دارد (۱). همچنین اتیلن علاوه بر این اثرات دارای اثرات بازدارندگی در رشد گیاهان نیز می‌باشد. اتیلن از طویل شدن ریشه و ساقه و گلدهی در گیاهان ممانعت و در واقع فرآیند پیر شدن در گیاه را تسریع می‌نماید (۱). مقدار گاز اتیلن در شرایط تنشی به میزان قابل توجهی در گیاه افزایش و باعث پیری زودرس گیاه می‌گردد. طبق گزارشات که مقدار اتیلن در حدود ۰/۰۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم موجب کاهش ۲۵ درصدی عملکرد گندم شده است (۱٤).

در جدیدترین تحقیقات مشخص شده که بسیاری از باکتریهای PGPR حاوی آنزیمی به نام ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات دآمیناز deaminase ACC هستند که قادر است ACC (۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات) که پیش‌ماده مستقیم اتیلن در گیاهان است را به آمونیوم و آلفاکتوبوتیرات تبدیل و از این طریق موجب کاهش اتیلن ناشی از تنش شود. در این فرآیند آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن برای باکتری استفاده می شود (۷ و ۸). شیهی و همکاران (۱۹۹۱) رشد یک سویه *Pseudomonas*در حضور ماده ACC و استفاده از آن به عنوان منبع نیتروژن را گزارش نمودند (۲۳).

کاتلان و همکاران (۱۹۹۹) از ۱۱٦ سویه باکتریهای مختلف جداسازی شده از خاک اطراف ریشه(Rhizosphere) سویا هشت سویه را دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase گزارش کردند (۵).

همانطوری‌که اشاره شد کودهای زیستی حاوی باکتریهای افزاینده رشد گیاه از طریق مکانیسمهای متفاوتی می‌توانند بر رشد گیاه تأثیر بگذارند. لذا چنانچه سویه یا سویه‌هایی از باکتریهای PGPR دارای مزیتهای مختلفی باشند می‌توانند اثرات بهتری در رشد گیاه داشته باشند. به عنوان نمونه کاهش اثرات تنشی اتیلن بر روی رشد گیاه می تواند از طریق استفاده از باکتریهای دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase حاصل شود. بدیهی است که در شرایط تنشی شوری و خشکی خاکهای ایران این موضوع دارای اهمیت بیشتری می باشد. در مورد اثر ریزوبیومهای دارای مزیتACC deaminase بر رشد و گره‌بندی لگومها گزارش شده است که تلقیح گیاه یونجه با سویه *Sinorhizobium meliloti* که ژن ACC deaminase به آن منتقل شده بود نسبت به همان سویه ولی فاقد ژن ACC deaminase، ۳۵ تا ٤۰ درصد کارآیی گره‌بندی را افزایش داده است (۱۷). لذا توسعه کودهای بیولوژیک دارای مزیت تولید آنزیم ACC deaminase یکی از مهمترین اهداف تحقیق جاری است که لازمه آن شناسایی باکتریهای تولید کننده این آنزیم است. در تحقیق حاضر برخی باکتریهای ریزوبیوم بومی از این نظر بررسی شده اند.

مواد و روشها

در این پژوهش تعداد ٤۰۰ سویه از باکتریهای ریزوبیوم بومی موجود در بانک ژن دانشکده مهندسی آب و خاک

www.SID.ir

Archive of SID

پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران بررسی و مطالعه شدند. این باکتریها از گرههای ریشه نخود، لوبیا، باقلا و یونجه در مرحله گل‌دهی این محصولات از مناطق مختلف زیر کشت این گیاهان از استانهای آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، کردستان، همدان، کرمانشاه، لرستان، ایلام، خوزستان، فارس، چهارمحال و بختیاری، اصفهان، مرکزی، زنجان، قزوین، تهران، گیلان، مازندران، گلستان، خراسان شمالی، خراسان رضوی و خراسان جنوبی جداسازی و در بانک مذکور نگهداری می-شوند. این باکتریها در محیط گلیسرول و در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری می‌شوند. قبلاً بر روی این سویه‌ها توسط سایر محققین آزمونهای مختلف از جمله آزمون آلودگی گیاه (Plant infection test) که از روشهای قابل اطمینان در شناسایی این باکتریها می‌باشد صورت گرفته است. برای اطمینان بیشتر از خلوص سویه‌ها برخی آزمونها ازجمله شکل میکروسکوپی با استفاده از آزمایش رنگ‌آمیزی گرم(Gram) و شکل کلنی سویه‌ها با مشخصات موجود در منابع مطابقت داده شد. آزمایش تحرک باکتریها نیز در محیط کشت مایع در زیر میکروسکوپ فازکنتراست بررسی گردید (داده‌ها نشان داده نشده است). تعداد ۳۳۰ سویه رشد یافته بر روی محیط کشت YMA (YeastMannitol Agar)، تأیید و برای ادامه تحقیق انتخاب شدند. انواع و تعداد سویه های ریزوبیوم مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- نوع و تعداد باکتری مورد استفاده و رشد یافته

نام باکتری	گیاه میزبان	تعداد سویه مورد بررسی	تعداد سویه رشد یافته و انتخاب شده
Sinorhizobium meliloti	یونجه	۱۷۵	۱٦۸
Rhizobium leguminosarum bv *viciae*	باقلا	٤٤	٤٤
Rhizobium leguminosarum bv *phaseoli*	لوبیا	۷۰	۵۸
Mesorhizobium ciceri	نخود	۱۱۱	٦۰
		٤۰۰	۳۳۰

برای تهیه کشتهای فرعی از محیط کشت YMA با ترکیب ; K_2HPO_4 ،۰/۵ ;$MgSO_4.7H_2O$ ،۰/۱ ;NaCl ۰/۲ ،Mannitol ،۱۰ ;Yeast extract ۰/۵ و آگار ۱۵ گرم در یک لیتر آب مقطر و pH برابر با هفت استفاده شد. برای غربال‌گری سویه‌های مختلف ریزوبیوم از نظر توان تولید آنزیم ACC deaminase از روش پنرز و گلیک (۲۰۰۳) استفاده شد(۲۰). در حین غربال‌گری با روش مذکور برای گروه‌بندی و طبقه‌بندی نسبی سویه‌ها از نظر توان تولید آنزیمACC deaminase از روش نیمه کمی اندازه‌گیری قطر کلنی که روشی ارزان و سریع است استفاده شد (۱۵). خلاصه این دو روش به شرح زیر است. برای غربال‌گری و گروه‌بندی سویه‌ها از محیط کشت حداقل ریزوبیومی (Rhizobium Minimal Medium) استفاده شد. این محیط کشت متشکل از سه جزء I، II وIII است که در جدول ۲ آورده شده است.

برای تهیه محیط کشت مذکور اجزاء I و II به طور جداگانه اتوکلاو و سپس با هم مخلوط و جزء III توسط فیلتر میلی‌پور ۰/۲۵ میکرون استریل شدند. قبل از انجماد آگار در دمای حدود ۵۰ درجه سانتی گراد مقدار یک میلی‌لیتر از جزء III به محلولها اضافه و درون پلیتهای استریل ۹ سانتیمتری ریخته شد.

جدول۲- اجزاءومقدار مواد تشکیل دهنده محیط کشت حداقل ریزوبیومی

www.SID.ir

Archive of SID

اجزاء محیط کشت	مقدارماده	نوع ماده
جزء I)**	2.05 gr	K_2HPO_4
	1.45 gr	KH_2PO_4
	200 ml	Distilled water
جزء II)**	0.15gr	NaCl
	0.01 gr	$CaCl_2$
	0.5 gr	$MgSO_4.7H_2O$
	10.0 gr	Mannitol
	0.5 ml	Microelements solution*
	800 ml	Distilled water
	15 gr	Agar
جزء III)	$1mg.ml^{-1}$	Pantathonic acid
	$1mg.ml^{-1}$	Biotin
	$1mg.ml^{-1}$	Thiamine

* محلول عناصر میکرو شامل: مولیبدات پتاسیم، بورات سدیم، سولفات کبالت، سولفات مس و سولفات روی هر کدام ۰/۵ گرم دریک لیتـر آب مقطر. ** pH اجزاء I و II روی ۷ تنظیم می‌شود

بر روی هر پلیت ۱۲ سویه ریزوبیوم با فواصل مناسب کشت شد. پس از رشد حداکثر باکتریها (حدود یک هفته) قطر کلنیها اندازه‌گیری و اختلاف قطر کلنی بر روی محیط حاوی ACC و شاهد محاسبه گردید. برای هر سری ۱۲ تایی سه محیط کشت در دو تکرار در نظر گرفته شد. محیط اول شاهد بدون نیتروژن، محیط دوم حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلات (ACC) ۰/٤٥ مولار و محیط سوم حاوی ۱۰۰ میکرولیتر NH_4Cl ۰/٤٥ مولار (به عنوان کنترل مثبت) بودند. ACC و NH_4Cl قبل از تلقیح باکتری بر روی سطح پلیتهای مورد نظر پخش شد. برای اندازه‌گیری توان تولید سیانید هیدروژن (HCN) توسط سویه‌های انتخابی دو سری پلیت حاوی محیط کشت YMA برای هر سویه در نظر گرفته شد. هر پلیت توسط لوپ استریل با سویه مورد نظر به صورت خطی کشت گردید. یک عدد کاغذ صافی به ابعاد یک سانتیمتر مربع با محلول معرف کربنات سدیم ۱۰ درصد و اسید پیکریک ۱ درصد آغشته و در قسمت درب پلیت قرار داده شد. پلیتها توسط نوار پارافیلم با دقت بسته تا از خروج گاز HCN تولیدی توسط سویه‌ها ممانعت شود. پلیتها دردمای ۲۸ درجه به مدت دو هفته به صورت واژگون در انکوباتور قرار داده شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی نشانه تولید HCN است، به طور معمول رنگ کرم نشانه حداقل تولید و رنگ آجری نشان دهنده حداکثر مقدار تولید HCN می‌باشد (۳). برای اندازه‌گیری میزان حل‌کنندگی فسفاتهای معدنی و آلی نامحلول از محیط کشت اسپربر به تعداد چهار تکرار برای هر سویه در هر پلیت با خلال دندان استریل کشت و نسبت قطر هاله شفاف اطراف کلنی به قطر کلنی محاسبه شد (٢٤). آزمون کمی توانایی تولید ایندول استیک اسید (IAA) با استفاده از روش رنگ سنجی در محیط کشت باکتری انجام شد در این روش پس از تهیه استانداردهای اکسین، کشت باکتری به نسبت دو به یک با محلول سالکوفسکی مخلوط و مقدار جذب نمونه‌ها در ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۱). آزمون نیمه کمی توان تولید سیدروفور بر روی پلیت حاوی دو لایه مختلف از محیط کشت انجام شد. لایه زیرین شامل محیط CAS-Agar (Chrome Azurol S) به مقدار ۲۵ میلی‌لیتر و لایه رویی YMA نازک به قطر حدود یک میلی‌متر بود. میانگین قطر هاله نارنجی رنگ اطراف کلنی به قطر کلنی در سه، پنج، هفت و ۱۰ روز پس از کشت بر روی محیط مذکور اندازه‌گیری شد(۲).

نتایج و بحث

نتایج بررسی توان تولید آنزیم ACC deaminase در چهار گروه ریزوبیومی در جدول شماره ۳ ارائه شده است. همان طوری که نتایج نشان می‌دهد ۲۸/۲ درصد از کل سویه‌های ریزوبیومی دارای توان تولید این آنزیم تشخیص داده شدند. بیشترین درصد سویه‌های دارای توان تولید آنزیم مذکور مربوط به گونه *Sinorhizobium meliloti* با ٤٦/٥ درصد و کمترین درصد مربوط به *Mesorhizobium ciceri* با ٦/٧ درصد بود.

ما و همکاران (۲۰۰۳) گزارش دادند که از ۱۳ سویه ریزوبیوم همزیست با لگومهای مختلف تعداد پنج سویه دارای فعالیت آنزیم ACC deaminase و در واقع دارای توان استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند (١٦).

www.SID.ir

Archive of SID

دوان و همکاران (۲۰۰۸) با بررسی ۲۳۳ سویه باکتری ریزوبیوم جمع‌آوری شده از ۳۰ نقطه مختلف ایالت ساسکاچوان کانادا ۲۷ نمونه را دارای توان تولید ACC deaminase گزارش دادند (٦).

جدول ۳- تعداد و فراوانی سویه‌های ریزوبیوم دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase

نام باکتری	تعداد سویه مورد بررسی	رشد در محیط حاوی ACC	
		تعداد	فراوانی
Sinorhizobium meliloti	۱٦۸	۷۸	٤٦/٥
Rhizobium leguminosarum bv *viciae*	٤٤	٦	۱۳/٦
Rhizobium leguminosarum bv *phaseoli*	٥۸	٥	۸/٦
Mesorhizobium ciceri	٦۰	٤	٦/۷
کل سویه‌ها	۳۳۰	۹۳	۲۸/۲

سویه‌های دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase بر اساس اختلاف قطر کلنی با شاهد در پنج گروه صفر، ٤- ٦،۲-٤ ، ۸-٦ و۱۰-۸ میلی‌متر تقسیم‌بندی شدند (جدول ٤). بر اساس این طبقه‌بندی گروه صفر به عنوان گروه فاقد توان تولید آنزیم مذکور تشخیص داده شدند. گروههای بعدی به ترتیب دارای توان ضعیف، متوسط، زیاد و خیلی زیاد از نظر توان تولید آنزیم ACC deaminase گروه‌بندی شدند.

جدول ٤- تعداد و فراوانی سویه‌های دارای تولید آنزیم ACC deaminase در گروههای مختلف ریزوبیوم

نوع سویه ریزوبیوم	اختلاف قطر کلنی در محیط ACC نسبت به شاهد (میلی‌متر)									
	صفر		٤-۲		٦-٤		۸-٦		۱۰-۸	
	فاقد توان		توان ضعیف		توان متوسط		توان زیاد		توان خیلی زیاد	
	فراوانی	٪	فراوانی	٪	فراوانی	٪	فراوانی	٪	فراوانی	٪
Sinorhizobium meliloti	۹۰	٥۳/٥	٥۰	۲۹/۸	۱۰	٦	۱٤	۸/۳	٤	۲/٤
Rhizobium leguminosarum bv *viciae*	۳۸	۸٦/٤	٤	۹/۱	۰	۰	۲	٤/٦	۰	۰
Rhizobium leguminosarum bv. *phaseoli*	٥۳	۹۱/٤	٤	٦/۹	۱	۱/۷	۰	۰	۰	۰
Mesorhizobium ciceri	٥٦	۹۳/۳	٤	٦/۷	۰	۰	۰	۰	۰	۰
کل سویه‌ها	۲۳۷	۷۱/۸	٦۲	۱۸/۸	۱۱	۳/۳	۱٦	٤/۹	٤	۱/۲

همان طوری که جدول ٤ نشان می‌دهد باکتریهای *S. meliloti* تنها باکتریهای ریزوبیومی بودند که دارای توان تولید مختلف از نظر آنزیم ACC deaminase و همچنین بیشترین میزان رشد بر روی محیط کشت حاوی ACC بودند. با توجه به اینکه برای ادامه بررسیهای آنزیمی، گلخانه‌ای و مولکولی و بدست آوردن رابطه‌ای منطقی بین میزان فعالیت آنزیم با خصوصیات ژنتیکی باکتری به همه گروههای پنج‌گانه صفر، ضعیف، متوسط، قوی و بسیار قوی نیاز می‌باشد لذا باکتریهای *S. meliloti* برای ادامه تحقیقات در این زمینه مد نظر قرار گرفتند. برای این منظور

www.SID.ir

Archive of SID

از هر گروه چهار سویه *S. meliloti* که دارای سرعت رشد بیشتری در محیط کشت YMA بودند برای مرحله بعدی تحقیق شامل بررسیهای مولکولی و گلخانه‌ای انتخاب شدند. در جدول ۵ سویه‌های انتخابی از گروههای پنج گانه آورده شده است.

مطالعات نشان داده که استفاده از باکتریهای طبیعی یا نوترکیب مولد آنزیم ACC deaminase منجر به مقابله با اتیلن تنشی ناشی از شرایط غرقابی (۹)، شرایط تنش خشکی (۱۸)، شرایط حاصل از تنش شوری خاک (۲۲)، افزایش مقاومت به عوامل بیماریزا (۲٦) و افزایش گره‌زایی توسط ریزوبیوم به میزان ٤۰-۳۵ درصد شده است (۱۷). گزارش شده که انتقال این ژن به گیاهان کلزا و گوجه فرنگی نیز باعث تحمل بیشتر این گیاهان نسبت به فلزات سنگین و سمی همچون نیکل، کادمیم، کبالت، سرب، روی و مس شده است (۱۰ و ۲۵).

جدول ۵- سویه‌های انتخابی *S. meliloti* از گروههای پنج‌گانه از نظر توان تولید آنزیم ACC deaminase

گروه ریزوبیوم از نظر توان تولید آنزیم	اختلاف قطر کلنی در محیط حاوی ACC نسبت به شاهد (میلی‌متر)	توان تولید آنزیم ACC deaminase	سویه ریزوبیوم انتخابی			
گروه اول	۱۰-۸	بسیار زیاد	Sino5	Sino40	Sino166	Sino130
گروه دوم	۸-٦	زیاد	Sino60	Sino71	Sino97	Sino44
گروه سوم	٦-٤	متوسط	Sino62	Sino49	Sino74	Sino27
گروه چهارم	٤-۲	ضعیف	Sino72	Sino64	Sino15	Sino45
گروه پنجم	صفر	فاقد توان	Sino95	Sino58	Sino37	Sino43

جدول ٦ – توان تولید اکسین (IAA) و تولید سیدروفور توسط سویه‌های انتخابی

سویه ریزوبیوم	میزان IAA تولید شده*	میزان تولید سیدروفور**	سویه ریزوبیوم	میزان IAA تولید شده*	میزان تولید سیدروفور**
Sino5	۱٦	۰	Sino60	۱/۲	۲/۷
Sino15	۵/۵	۱	Sino62	۱۱/۲	۰
Sino27	۱/۵	۱	Sino64	۲/۲	۰
Sino37	۳/۲	۱/۷	Sino71	۱/۸	۱/٦
Sino40	۱/۳	۱/٤	Sino72	۳/۷	۰
Sino43	۷/۳	۰	Sino74	۰	۰
Sino44	۱۲/۸	۲/۲	Sino97	۷/۳	۱/۳
Sino45	۲۱	۱	Sino95	۱/۷	۱/۷
Sino49	۲/۸	۰	Sino130	۱	۰
Sino58	٤	۰	Sino166	٦/۷	۰

* میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت در ۲٤ ساعت، ** **میانگین نسبت قطر هاله به کلنی بر روی محیط کشت CAS آگار**

با توجه به اینکه در ایران شرایط تنشی از جمله خشکی، شوری، عوامل بیماری‌زای گیاهی و در مواردی آلودگیهای زیست محیطی از عوامل محدود کننده رشد گیاهان محسوب می‌شوند بنابراین استفاده از مایه تلقیح باکتریهای

www.SID.ir

Archive of SID

دارای آنزیم مذکور در گیاهان به ویژه محصولات کشاورزی برای مقابله با این تنشها دارای اهمیت است و دستیابی به سویه‌های بومی برتر از نظر توان تولید آنزیم ACC deaminase در راستای تأمین این نیاز است.

نتایج میانگین قطر هاله به قطر کلنی سویه‌های انتخابی بر روی محیط اختصاصی CAS آگار در جدول ٦ آورده شده است. همان طوری که جدول نشان می‌دهد تولید سیدروفور در سویه‌های انتخابی با هم متفاوت هستند. نقش سیدروفورهای میکروبی در افزایش رشد گیاه می‌تواند به صورت غیر مستقیم و از طریق بیوکنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و یا تحریک مستقیم رشد گیاه به واسطه افزایش قابلیت جذب آهن توسط گیاه باشد (۱۱).

اکسینها نیز به عنوان یکی از مهمترین هورمونهای گیاهی که نقش بسیار مهمی در گسترش و توسعه سیستم گیاهی و در نتیجه رشد و عملکرد گیاهان دارند گزارش شده‌اند (۱۹). باکتریهای مولد ACC deaminase منتخب دارای توان تولید اکسین متفاوت بودند (جدول ٦) که تولید آن مزیت بیشتری به این باکتریها برای کاربرد به عنوان باکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) به صورت کود زیستی می‌دهد.

نتایج بررسی توان حل‌کنندگی فسفاتهای آلی و معدنی نامحلول در باکتریهای مورد بررسی نشان داد که هیچیک از بیست سویه مذکور این توانایی را ندارند. به علاوه هیچ کدام از سویه‌ها توان تولید سیانید هیدروژن را از خود نشان ندادند. HCN بر فعالیت آنزیم سیتوکروم اکسیداز اثر بازدارندگی شدیدی دارد. این آنزیم یکی از عوامل مهم در چرخه تنفسی و چرخه تولید ATP بسیاری از موجودات زنده محسوب می‌شود و لذا HCN به عنوان یک بازدارنده رشد گیاهان گزارش شده است. (٤).

با توجه به اینکه تنشهای خشکی، شوری خاکها، برخی آلودگیهای زیست محیطی و بیماریهای گیاهی موجب کاهش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی می‌شوند، ارائه راهکارهای لازم برای مقابله با این عوامل تنش‌زا امری ضروری می‌باشد. بنابراین مطالعه باکتریهای ریزوبیومی به عنوان یکی از باکتریهای محرک رشد گیاه از نظر میزان تولید آنزیم ACC deaminase که آنزیمی برای مقابله با تنش شناخته شده دارای اهمیت فراوان است. به علاوه استفاده از کودهای زیستی باعث کاهش استفاده از کودهای شیمیایی و در نتیجه کاهش آلودگیهای زیست محیطی ناشی از مصرف این کودها می‌شود. با توجه به خصوصیات آنزیم ACC deaminase که pH بهینه برای فعالیت آن ۸/۵–۸ و Tm آن حدود ٦۰ درجه سانتی‌گراد گزارش شده که نشان دهنده مقاومت قابل توجه آنزیم در درجه حرارت بالا است (۷ و ۱۳) بنابراین استفاده از باکتریهای حاوی این آنزیم در شرایط خاکهای ایران به عنوان مایه تلقیح میکروبی از نظر فعالیت آنزیم مذکور تحت این شرایط امیدوار کننده است. از دیگر نتایج ادامه این تحقیق دستیابی به ژن ACC deaminase است که می‌تواند در تحقیقات آتی برای انتقال آن به سایر باکتریهای PGPR که دارای مزیتهای دیگری از نظر اثر بر رشد گیاه می‌باشند و یا تولید گیاهان تراریخته با ژن مذکور مورد استفاده قرار گیرد.

همان طوری که نتایج نشان داد باکتریهای *Sinorhizobium meliloti* دارای طیف وسیع‌تری از نظر میزان تولید آنزیم ACC deaminase بودند به طوری که در هر چهار گروه طبقه‌بندی این باکتریها از خود توان تولید نشان دادند. در مورد سایر گروههای ریزوبیومی درصد کمی از آنها دارای توان تولید آنزیم مذکور بودند به علاوه در این باکتریها توان بالائی در تولید آنزیم مشاهده نشد. بنابراین می‌توان از باکتریهای *S. meliloti* گروه‌بندی شده حاصل از این پژوهش برای تحقیقات آتی و مطالعات تکمیلی بهره فراوانی حاصل نمود. از جمله این مطالعات می‌توان به بررسی دیگر جنبه‌های آنزیم ACC deaminase و مطالعه تلقیح سویه‌های برتر آنها بر روی سایر محصولات کشاورزی به عنوان مایه تلقیح PGPR و یا مایه تلقیح

www.SID.ir

Archive of SID

اختصاصی ریزوبیومی برای محصول مهم یونجه اشاره نمود. در ضمن می توان از سایر باکتریهای ریزوبیومی مورد مطالعه در این تحقیق در بررسی تلقیح آنها به لگومهای اختصاصی و حبوبات مهمی همچون لوبیا، نخود، عدس و باقلا استفاده کرد. لازم به ذکر است که تاکنون در موارد ذکر شده به ویژه در مورد اثر ریزوبیومهای بومی دارای مزیت تولید آنزیم ACC deaminase بر گره‌بندی و رشد لگومها در ایران تحقیقی صورت نگرفته است.

منابع

۱. فهیمی، ح. ۱۳۷٦. تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران، ۱۷۲ صفحه.

2. Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12:39-45.
3. Alström, S. and Burns, R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, 7:232-238.
4. Baker, A.W. and Schippers, B. 1986. Microbial cyanide production in the rhizosphere in relation to potato yield reduction and *pseudomonas* spp.-mediated plant growth-stimulation. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 451-457.
5. Cattelan, A.J. ; Hartel, P.G. and Fuhrmann, J.J. 1999. Screening for Plant growth–promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Science Society of America Journal*, 63:1670-1680.
6. Duan, J.; Müller, K.M. ; Charles, T.C. ; Vesely, S. and Glick B.R. 2008. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia from Southern Saskatchewan. *Microbial Ecology*, DOI .1007/s00248-008-9407-6.
7. Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:109–117.
8. Glick, B.R. ; Penrose, D.M, and Li., J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 190: 63–68
9. Grichko, V.P. and Glick, B.R. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39:11-17.
10. Grichko, V.P.; Filby, B. and Glick, B.R. 2000. Increased ability of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb and Zn. *Journal of Biotechnology*, 81: 45 53.
11. Guerinot, M.L. 1991. Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbiosis. *Plant and Soil*, 130:199-209.
12. Hoflich, G. ; Wiehle, W. and Kuhn, G. 1994. Plant growth stimulation by inoculation with symbiotic and associative microorganisms. *Experientia*, 50: 897-905.
13. Hontzeas, N. ; Hontzeas, C.E. and B. R. Glick. 2006. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biochemistry advances*, 24:420-426.
14. Klassen, S. and Bugbi, B. 2000. Differential sensitivity of crops to ethylene and interactions with elevated CO_2. *Life support and biosphere science*, 7: 23-83.
15. Lemieux, J. 2004. Présence de l'enzyme ACC désaminase chez les bactéries de la famille des Rhizobiacées. Mémoire de maitrise, Université Laval, Quebec,Canada, 109 pages.
16. 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. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83 285-291
17. Ma, W. ; Charles, T.C. and Glick, B.R. 2004. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-aarboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 5891–5897.
18. Mayak, S. ; Tirosh, T. and Glick, B.R. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science*, 66: 525-530.
19. Nordustrum, A.C. and Eliasson, L. 1984. Regulation of root formation by auxine-ethylene

www.SID.ir

Archive of SID

interaction in pea stems cuttings. Physiologia *Plantarum*, 61:298-302.

20. Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118:10-15.

21. Rubio, M.G.T. ; Plata, S.A. ; Castillo, J.B. ; and. Nieto, P.M. 2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* and *Pseudomonas* producers of Indole acetic acid and siderophores from Colombian rice rhizosphere. *Revista Latinoamrican de Microbiologia*, 5: 171- 176.

22. Saravanakumar, D. and Samiyappan, R. 2007. ACC deaminase from *Pseudomonas fluoresce*ns mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 120(5): 1283-1292.

23. Sheehy, R. E.; Yamada, M.H.; Sasaki, T.; Martineau, B. and Hiatt, W.R. 1991. Isolation, sequence, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas sp*. strain ACP gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Journal of Bacteriology*, 173: 5260-5265.

24. Sperber, J.I. 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9:782-787.

25. Stearns, J.C. ; Shah, S. ;. Greenberg, B.M. ; Dixon, D.G. and Glick, B.R. 2005. Tolerance of transgenic canola expressing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase to growth inhibition by nickel. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 701-708.

26. Wang, C. ; Knill, E. ; Glick, B.R. and Défago, G. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 and its *gac*A derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. *Canadian Journal of Microbiology*, 46:898-907.

www.SID.ir

Archive of SID

Potential Evaluation of Some Native Rhizobia as Plant growth Promoting Bacteria and their Role in Decreasing of Stress Ethylene

Khosravi H[1]., Yakhchali. B.[2] and Alikhani H.A.[1]

[1] Soil Science Dep., Faculty of Agriculture, Tehran University, Tehran, I.R. of IRAN

[2] National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

The amount of ethylene increases in stress conditions in plants. Some of plant growth rhizobacteria contain ACC deaminase enzyme that is capable to convert 1-aminocyclopropane-1-carboxylate, the immediate precursor of ethylene in higher plants to ammonia and α-ketobutyrate that causes decrease in stress ethylene level. In this study 330 strains of indigenous rhizobia including *Sinorhizobium meliloti* (168 strains), *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (44 strains), *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (58 strains) and *Mesorhizobium ciceri* (60 strains) native to different soils of Iran were evaluated for ACC deaminase production. The results showed that 28.2% of strains synthesized ACC deaminase enzyme. The most number was belonged to the *Sinorhizobium meliloti* (46.5%) and the least number to the *Mesorhizobium ciceri* (6.7%). The strains with ACC deaminase enzyme were categorized in five groups of 0, 2-4, 4-6, 6-8 and 8-10 mm based on the colony diameter as compared to control. Four isolates of each group were selected for future investigation. The selected isolates did not show phosphate solubilizing properties and HCN production as well. The selected strains synthesize auxine (IAA) between 0-21 $\mu gr.ml^{-1}.24h^{-1}$. In these strains, the ability to produce siderophores based on the ratio of corona to colony diameter on CAS agar medium was zero up to 2.7. The future work on these strains would be the development of biofertilizers with ACC deaminase properties.

Keywords: *Rhizobium,* ACC deaminase, Ethylene, Biofertilizers.

www.SID.ir