جداسازی، شناسایی و تعیین فعالیت آنزیم ACC Deaminase باکتری های غالب ریزوسفر کلزا در خاکهای شور

عبدالرضا اخگر،[۱*] ناهید صالح راستین، کاظم خاوازی و علیرضا شعرای نجاتی

دانشجو دوره دکتری گروه مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران؛ arakhgar@yahoo.com

دانشیار گروه مهندسی خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

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

کارشناس موسسه تحقیقات خاک و آب

چکیده

بهره‌برداری صحیح از خاکهای شور برای نیل به حداکثر عملکرد گیاهان زراعی همواره از چالش‌های عمده بخش کشاورزی بوده است. گیاهان کاشته شده در این خاکها به طرق مختلف از شوری متأثر شده و به حداکثر رشد و عملکرد خود نمی‌رسند. یکی از راههای صدمه شوری به بعضی از گیاهان منجمله کلزا، تجمع اتیلن در ریشه است. تجمع اتیلن باعث کاهش رشد ریشه و در نتیجه افت عملکرد گیاه می‌شود. در صورت وجود باکتری‌هایی با توان تولید ACC deaminase در ریزوسفر، این امکان وجود دارد تا در این شرایط با تبدیل پیش‌ساز اتیلن (ACC) به آلفا- کتوبوتیرات و آمونیاک، سطح اتیلن در گیاه میزبان کاهش یابد. لذا با توجه به اهمیت گسترش سطح زیر کشت کلزا در ایران و لزوم کشت آن در اراضی شور و لب شور ضرورت داشت تا در اولین قدم، باکتری‌هایی با صفت مذکور از ریزوسفر کلزای کاشته شده در این اراضی جداسازی و شناسایی شوند. بدین منظور تعداد ۲۱ نمونه مرکب خاک بهمراه ریشه گیاه کلزا از ۲۱ منطقه تحت کشت آن در اراضی شور و نسبتاً شور استانهای قم و قزوین تهیه شد. پس از تعیین برخی مشخصات شیمیایی و بیولوژیکی نمونه‌های خاک، تعداد ۱۰۵ جدایه از خاک ریزوسفری کلزا انتخاب گردید. براساس توانایی رشد جدایه‌ها در محیط حداقل DF حاوی ACC بعنوان تنها منبع نیتروژن مشخص گردید که تعداد ۱۵ جدایه دارای توان تولید ACC deaminase بودند. شناسایی این جدایه‌ها با استفاده از نتایج آزمونهای میکروسکوپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مندرج در کتاب سیستماتیک باکتریولوژی Bergey نشان داد که کلیه جدایه‌ها در گروه سودوموناسهای فلورسنت قرار می‌گیرند. آزمون‌های مربوط به تعیین گونه نیز نشان داد که ۱۴ جدایه متعلق به گونه *P. fluorescens* بودند. در خصوص یکی از جدایه‌ها نیز به دلیل عدم تطابق نتایج با مندرجات کتاب Bergey، به صورت *Pseudomonas* sp. معرفی گردید. همچنین نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC deaminase جدایه‌ها نشان دادکه فعالیت این آنزیم در جدایه‌های مورد آزمایش متفاوت بوده و از ۱/۴۳ تا ۸/۱۷ میکرومول آلفا- کتوبوتیرات برمیلی گرم در ساعت متغییر بود. با توجه به نتایج بدست آمده و مقایسه این داده با داده‌های سایر محققین این امیدواری وجود دارد تا تلقیح بذر کلزا با جدایه‌های فوق اثرات منفی تنش شوری را تعدیل نماید.

واژه‌های کلیدی: ACC deaminase ، *Pseudomonas* ، کلزا

---

۱ – نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، دانشگاه ولیعصر، دانشکده کشاورزی، گروه خاکشناسی

* دریافت: ۸۵/۱۱/۱۴ و پذیرش: ۸۶/۶/۴

مقدمه

ریزوسفر به لایه نازکی (معمولاً یک الی سه میلی‌متر) از خاک اطراف ریشه اطلاق می‌شود که موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه (نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای) قرار دارند (Boven, and Rovira, 1999). باکتریهای ریزوسفری[1] که بخش عمده میکروارگانیسم‌های موجود در ریزوسفر را تشکیل می‌دهند می‌توانند اثرات مثبت یا منفی بر رشد گیاه داشته باشند. آن گروه از باکتری‌های ریزوسفری که باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه یا PGPR[2] نامیده می‌شوند (Burdman *et al.*, 2000). این باکتری‌ها از گروه‌های متنوع خاکزی هستند که می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلف باعث تحریک رشد گیاهان شوند. تولید وآزادسازی متابولیتهای ثانویه (مانند تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، هورمون‌های گیاهی و ترکیبات فعال بیولوژیک)، کاهش یا جلوگیری از تأثیرات منفی میکروارگانیسمهای بیمارگر گیاهی در ریزوسفر و همچنین تسهیل در قابلیت دسترسی و افزایش جذب برخی عناصر غذایی، به عنوان مهمترین مکانیسم‌های موثر بر رشد گیاهان معرفی شده‌اند (Davison, 1988; Glick, 1995; Kloepper *et al.*,1988). باکتری‌های محرک رشد گیاهی که تا کنون شناخته شده‌اند عمدتاً متعلق به جنسهای *Azoarcus* , *Azospirillum* , *Pseudomonas* , *Bacillus* , *Klebsiella* , *Azotobacter* , *Rhizobium* و *Serratia* , *Burkholderia* , *Enterobacter* می‌باشند (Burdman *et al.*, 2000).

طی دهه گذشته توانایی تولید ACC deaminase[3] توسط باکتریها، به عنوان مکانیسم جدیدی برای افزایش رشد گیاه مطرح شده است (Klee *et al.*, 1991). این مکانیسم، عموماً در شرایط اعمال تنش‌های محیطی بر گیاه اهمیت پیدا می‌کند و نتیجه نهایی آن، برآیند اثرات متقابل بسیار پیچیده این آنزیم با هورمونهای گیاهی و بالاخص اکسین‌ها (عمدتاً ایندول استیک اسید، IAA) و اتیلن می‌باشد.

براساس پژوهش‌های انجام شده، پاسخ گیاهان در مواجهه با تنشهای محیطی، اغلب به صورت افزایش و تجمع اتیلن در ریشه‌ها است. افزایش غلظت اتیلن باعث کاهش رشد ریشه و متعاقباً کاهش جذب آب و عناصر غذایی و در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه می‌گردد (Abeles *et al.*, 1992; Hyodo, 1991). ثابت شده است که تلقیح گیاه با باکتری‌هایی که قادر به تولید آنزیم ACC deaminase هستند می‌تواند در کاهش سطح اتیلن در گیاه و در نتیجه کاهش اثرات منفی آن موثر باشد. بنابراین، باکتریهایی با چنین توانایی می‌توانند گیاهان را در برابر اثرات مضرّ تنشهای محیطی چون غرقاب (Grichko and Glick, 2001)، بیمارگرها (Wang, 2004)، عناصر سنگین (Belimov *et al.*, 2001 , 2005) ، خشکی (Mayak *et al.*, 2004a) و شوری (Mayak *et al.*, 2004b) محافظت می‌کند. گلیک و همکاران (Glick *et al.*, 1997a) مکانیسم عمل این باکتری‌ها را اینچنین شرح داده‌اند: زمانی که باکتری دارای توانایی تولید ACC deaminase به سطح بذر یا ریشه گیاه در حال توسعه متصل می‌شود، این باکتری بواسطه وجود تریپتوفان و سایر مولکولهای کوچک موجود در ترشحات بذر یا ریشه، IAA تولید و ترشح می‌نماید. قسمتی از IAA تولید شده توسط باکتری مذکور، بوسیله گیاه جذب و همراه IAA تولید شده توسط خود گیاه باعث افزایش تعداد و اندازه سلولها می‌شود. از طرف دیگر IAA می‌تواند فعالیت آنزیم ACC synthase را که S-adenosylmethionine را به ACC تبدیل می‌کند تحریک نماید. بخش قابل توجهی از ACC از بذرها یا ریشه‌های گیاه به خارج ترشح می‌شود و باکتری به منظور استفاده از آن به عنوان منبع نیتروژن، آنزیم ACC deaminase را ترشح می‌کند که موجب هیدرولیز ACC به آمونیاک و آلفا-کتوبوتیرات می‌شود. جذب و متعاقباً تجزیه ACC توسط باکتری، مقدار آن را در خارج از ریشه گیاه کاهش می‌دهد و لذا گیاه به منظور حفظ تعادل بین سطح ACC خارجی و داخلی بایستی مقدار زیادتری از ACC را به خارج از ریشه ترشح نماید. پیامد افزایش ترشح ACC، کاهش سطح آن در ریشه گیاه است و کاهش ACC منجر به کاهش اتیلن در ریشه گیاه و متعاقباً کاهش اثرات بازدارندگی آن می‌شود. هال و همکاران (Hall *et al.*, 1996) در تحقیقی نشان دادند *Pseudomonas putida* GR12-2 که یک باکتری ریزوسفری مفید و دارای توان تولید ACC deaminase است، موجب افزایش رشد ریشه گیاهچه‌های کلزا، کاهو، گوجه‌فرنگی و گندم شد. گلیک و همکاران (Glick *et al.*, 1997b) با مقایسه تأثیر تلقیح سویه وحشی و موتانت باکتری *P. putida* GR12-2 بر کلزا نشان دادند که سویه وحشی در هر دو نوع روش تلقیح (بذر و خاک) باعث افزایش قابل ملاحظه‌ای در طول ریشه، وزن خشک و وزن‌تر ریشه‌های کلزا گردید. لیکن سویه موتانت که فاقد فعالیت ACC deaminase بود تأثیر مشخصی بر هیچیک از شاخص‌های رشد نداشت. برد و همکاران (Burd *et al.*, 1998 , 2000) نشان دادند که کاربرد

1- Rhizobacteria
2 - Plant growth promoting rhizobacteria
3- 1-amino cyclopropan -1-carboxylate deaminase

باکتری دارای توان مصرف ACC به نام *Kluyvera ascorbata* SUD165، رشد گیاهچه‌های کلزا، گوجه‌فرنگی و خردل هندی را که با غلظتهای سمی از نیکل، سرب و روی تیمارشده بودند، بهبود بخشید. گریکو و گلیک (Grichko and Glick, 2001) بمنظور بررسی اثر تلقیح باکتریهای دارای توان تولیدACC deaminase بر کاهش اثرات منفی غرقاب در گیاهان از چند باکتری واجد و فاقد این صفت جهت تلقیح بذرهای گوجه‌فرنگی استفاده کردند. آنها نشان دادند گیاهان گوجه فرنگی که با باکتری‌های دارای توان تولید ACC deaminase تلقیح شده بودند نسبت به گیاهان تلقیح نشده یا تلقیح شده با باکتری‌های فاقد این صفت از مقاومت بالاتری نسبت به تنش غرقاب برخوردار بودند. در رابطه با تأثیر تلقیح گیاهان با باکتری‌های دارای توان تولید ACC deaminase بر ایجاد مقاومت به خشکی، مایاک و همکاران (Mayak *et al.*, 2004a) تأثیر تلقیح گوجه‌فرنگی و فلفل با سویه ARV8 از باکتری *Achromobacter piechaudii* را تحت شرایط تنش رطوبتی (خشکی) بررسی و مشاهده کردند که این باکتری وزن خشک و تر هر دو گیاه را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داد. در تحقیقی دیگر مایاک و همکاران (Mayak *et al.*, 2004b) از همین باکتری جهت بررسی تأثیر آن بر ایجاد مقاومت به شوری در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی استفاده کردند. نتایج نشان داد که گیاهان تلقیح شده، رشد بیشتری نسبت به تیمار بدون باکتری (شاهد) داشتند.

نظر به پتانسیل باکتری‌های دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase در کاهش اثرات زیانبار تنش‌های محیطی بر رشد گیاهان، وجود مشکل تنش شوری در بسیاری از خاکهای زیر کشت ایران و ضرورت استفاده از راهکارهای بیولوژیک برای مقابله با این قبیل تنش‌ها به منظور دستیابی به تولید بهینه محصولات زراعی، توان کلزا برای رشد در خاکهای نسبتاً شور و لزوم توسعه سطح زیر کشت آن در این خاکها برای تولید هر چه افزون‌تر روغن گیاهی در ایران و نبود سابقه پژوهشی در مورد باکتری‌های بومی ریزوسفر کلزا که در ضمن دارا بودن توان تولید آنزیم ACC deaminase، قادر به تحمل تنش شوری باشند، برنامه این تحقیق طراحی گردید. بنابراین براساس مواردی که فوقاً بدان اشاره شد، شناسایی و انتخاب باکتری‌هایی که بطور همزمان سه ویژگی مهم: برخورداری از فعالیت بالای آنزیم ACC deaminase، پتانسیل لازم برای کلنیزاسیون مطلوب ریشه‌های کلزا و توان رشد و فعالیت در شرایط خاکهای شور را دارا باشند، هدف این تحقیق قرار گرفت. انتظار این است که با دستیابی به چنین سویه‌هایی، امکان تهیه کود بیولوژیک مناسب برای تولید بیشتر کلزا حتی در صورت کشت در شرایط تنش‌های محیطی مانند شوری فراهم گردد.

مواد و روشها

نمونه‌برداری از ریزوسفر گیاه کلزا

بدین منظور تعداد ۲۱ نمونه مرکب خاک به همراه ریشه گیاه کلزا از ۲۱ منطقه تحت کشت کلزا در اراضی شور و نسبتاً شور استانهای قم و قزوین تهیه و نمونه‌ها جهت جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوسفری به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور اطلاع از میزان شوری و همچنین pH خاکها، مقدار این دو پارامتر به ترتیب با روش اندازه‌گیری EC در عصاره اشباع و pH گل اشباع تعیین گردید.

تعیین جمعیت باکتری‌های ریزوسفری، جداسازی و خالص‌سازی باکتریهای مورد نظر

بدین منظور برای هر نمونه، ۱۰ گرم از ریشه‌ها و خاک ریزوسفری اطراف آن بطور آسپتیک به ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک (کلرید سدیم ۰/۸۵ درصد) اضافه و برای مدت ۲۰ دقیقه بر روی شیکر با دمای ۲۸°C و ۱۱۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس از ارلن مذکور رقّتهای مختلف (10^{-2} تا 10^{-10}) تهیه و مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت بر روی ظروف پتری حاوی محیط کشت NA[1] پخش گردید. پس از ۴۸ ساعت از رشد باکتری‌ها در دمای ۲۸°C، ضمن تعیین جمعیت کل باکتری‌های ریزوسفری با استفاده از روش شمارش کلنی، تعداد ۱۰۵ کلنی از بالاترین رقّتهای هر نمونه کشت شده انتخاب و جهت خالص‌سازی بر روی محیط جامد NA کشت داده شدند. پس از اطمینان کامل از خلوص جدایه‌های فوق، باکتری‌ها تا زمان استفاده بعدی بر روی محیط کشت شیبدار نگهداری شدند. بدین ترتیب تعداد ۱۰۵ جدایه برای آزمایشات بعدی آماده گردیدند.

تعیین توانایی جدایه‌ها برای استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن

توانایی تولید ACC deaminase جدایه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته گلیک و همکاران (Glick *et al.*, 1995) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور یک لوپ از هرجدایه به ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSB[2] موجود در یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری تلقیح شد. محیط مذکور شامل پپتون کازئین (۱۷ گرم در لیتر)، پپتون سویا (۳ گرم در لیتر)، NaCl (۵ گرم در لیتر)، K_2HPO_4 (۲/۵ گرم در لیتر) و دکستروز (۲/۵ گرم در لیتر) بود. پس از

1- Nutrient Agar
2- Tryptic soybean broth

گذشت ۲۴ ساعت از رشد باکتری‌های فوق در دمای ۲۸°C، مقدار ۵۰ میکرو لیتر از آن مجدداً به ۳۰ میلی لیتر از محیط کشت TSB اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸°C تکان داده شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون مذکور به هر یک از ظروف ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر از محیط حداقل DF (Dworkin.and Foster, 1958)، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط حداقل DF حاوی ۳ میلی مولار ACC و ۲۰ میلی لیتر از محیط حداقل DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم اضافه و به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر با دمای ۲۸°C و ۱۸۰ دور در دقیقه تکان داده شدند. آنگاه جذب نور[1] این محیط ها بعنوان معیاری از رشد باکتری در آن محیط، در طول موج ۴۰۵ nm اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است که محیط DF شامل گلوکز (۲ گرم در لیتر)، گلوکونیک اسید (۲ گرم در لیتر)، سیتریک اسید (۲ گرم در لیتر)، KH_2PO_4 (۴ گرم در لیتر)، Na_2HPO_4 (۶ گرم در لیتر)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۲ گرم در لیتر)، $FeSO_4.7H_2O$ (۱۰ میلی گرم در لیتر)، H_3BO_3 (۰/۰۱ میلی گرم در لیتر)، $MnSO_4.H_2O$ (۰/۰۱۱۲ میلی‌گرم در لیتر)، $ZnSO_4.7H_2O$ (۰/۱۲۴۶ میلی‌گرم در لیتر)، $CuSO_4.5H_2O$ (۰/۰۷۸۲ میلی‌گرم در لیتر) و MoO_3 (۰/۰۱ میلی گرم در لیتر) بود.

شناسایی جدایه‌های مورد نظر

به منظور شناسایی جدایه‌هایی که قادر به تولید ACC deaminase بودند، آزمونهایی بر مبنای شاخص‌های معرفی شده در کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی انجام گرفت (Krieg, 1984). بدین منظور ابتدا با استفاده از محلول ۳٪ KOH و رنگ آمیزی گرم، واکنش گرم جدایه‌ها تعیین و سپس مورفولوژی آنها مورد بررسی قرار گرفت. آنگاه برای تمام جدایه‌ها آزمون O/F[2] گذاشته شد تا بتوان آنها را از نظر نحوهٔ متابولیسم کربوهیدراتهایی مانند گلوکز به دو گروه دارای متابولیسم اکسایشی (تنفسی) و یا تخمیری تفکیک نمود (Mac Faddin, 1980). بعد از انجام آزمون فوق، توانایی جدایه‌ها از نظر تثبیت نیتروژن ارزیابی گردید. بدین منظور از محیط Rennie درون لوله (بصورت مایع) و همچنین در پلیت (بصورت جامد) استفاده شد. این محیط شامل سوکروز (۵ گرم در لیتر)، مانیتول (۵ گرم در لیتر)، لاکتات سدیم (۰/۳ گرم در لیتر)، K_2HPO_4 (۰/۸ گرم در لیتر)، KH_2PO_4 (۰/۲ گرم در لیتر)، NaCl (۰/۱ گرم در لیتر)، $Na_2MoO_4.2H_2O$ (۰/۰۲۵ گرم در لیتر)، NaFeEDTA (۰/۰۲۸ گرم در لیتر)، $CaCl_2.2H_2O$ (۰/۰۶ گرم در لیتر)، $MgSO_4.7H_2O$ (۰/۰۲ گرم در لیتر)، بیوتین (۰/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر)، PABA[3] (۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر) و آگار نوبل (درمحیط مایع ۱/۵ گرم در لیتر و برای محیط جامد ۱۵ گرم در لیتر) بود که در پی اچ ۷/۲ تنظیم گردید(Rennie, 1980). آنگاه آزمونهای رشد بر روی محیط اتانول و همچنین رشد بر روی محیط YMA حاوی کنگورد (۲۵ میلی‌گرم در لیتر) برای کلیه جدایه‌ها انجام شد. محیط YMAشامل مانیتول (۱۰ گرم در لیتر)، عصاره مخمر (۰/۵ گرم در لیتر)، $MgSO_4$ (۰/۲ گرم در لیتر)، K_2HPO_4 (۰/۵ گرم در لیتر)، NaCl (۰/۱ گرم در لیتر) و آگار (۱۷ گرم در لیتر) بود (Atlas, 1993). در مرحله بعد آزمون تشخیص تحرک جدایه‌ها انجام گرفت (Mac Faddin, 1980). سپس رشد جدایه‌ها بر روی محیط‌های پایه حاوی اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی (استات، فومارات، لاکتات، مالات و ساکسینات) مورد بررسی قرار گرفت (Atlas, 1993). پس از بررسی توانایی رشد جدایه‌ها در pH = ۳/۶، جدایه‌ها بر روی محیط KingB کشت داده شدند و بعد از ۴۸ ساعت رشد در دمای ۲۸ °C، پلیت‌ها با استفاده از لامپ UV از نظر وجود کلونی‌های با خاصیت فلورسنس بررسی شدند (Schaad, 2001). پس از شناسایی جنس جدایه‌ها به منظور شناسایی گونه آنها، بر روی کلیه جدایه‌ها آزمون‌های هیدرولیز آرژینین ، کاتالاز، اکسیداز، رشد در دمای ۴۱°C و ۴°C، ذوب ژلاتین، استفاده از قندهای ترهالوز و آرابینوز، توانایی تشکیل لوان[4] از سوکروز و آزمون احیای نیترات انجام گرفت (Bossis *et al.*, 2000). درآزمون هیدرولیز آرژینین از روش تورنلی (Thornley, 1960) استفاده شد. برای آزمون کاتالاز از روش اضافه کردن (H_2O_2 (۳٪ بر روی گسترده هر جدایه استفاده شد و کاتالاز مثبت آن جدایه با ظهور حباب‌های اکسیژن مشخص گردید (Schaad, 2001). جهت انجام آزمون اکسیداز، چند قطره از معرف اکسیداز (محلول ۱٪ دی‌متیل پارافنیلن دی آمین هیدروکلراید) بر روی گسترده هر جدایه ریخته شد و تغییر رنگ به سمت آبی تیره به عنوان اکسیداز مثبت بودن آن جدایه در نظر گرفته شد (Schaad, 2001). در آزمون ذوب ژلاتین از محیط NA حاوی ۵ ٪ ژلاتین استفاده گردید (Schaad, 2001). برای آزمون توان رشد در دمای ۴۱°C و ۴°C، جدایه‌ها بر روی محیط NA کشت داده شدند و توان رشد هر جدایه در دمای مورد آزمایش به مدت یک هفته بررسی شد (Schaad, 2001). در آزمون تولید لوان، از محیط کشت NA حاوی ۵ ٪ سوکروز استفاده شد (Schaad, 2001). برای بررسی توانایی استفاده جدایه‌ها از

1- Absorbance
2- Oxidation-Fermentation Test
3- p-aminobenzoic acid
4- Levan

قندهای ترهالوز و آرابینوز از محیط پایه Ayer استفاده شد. این محیط شامل فسفات آمونیم (۱ گرم در لیتر)، کلرور پتاسیم (۰/۲ گرم در لیتر)، سولفات منیزیم (۰/۲ گرم در لیتر)، برم تیمول‌بلو (۱ میلی‌لیتر ۱/۶٪) و آگاروز (۱۲ گرم در لیتر) بود. قندها بطور جداگانه در غلظت ۰/۲٪ بوسیله فیلتر کردن با کاغذ صافی (۰/۴۵ میکرون) استریل و سپس به محیط پایه اضافه شدند (Mac Faddin, 1980). در آزمون احیای نیترات، از محیط NA به مقدار ۸ گرم و نیترات پتاسیم به مقدار ۱ گرم در یک لیتر آب مقطر استفاده شد (Mac Faddin, 1980).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC deaminase جدایه‌ها

بدین منظور از روش پنروز و گلیک (Penrose and Glick, 2003) استفاده شد. در این روش ابتدا هر باکتری در یک ارلن ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت غنیTSB تلقیح گردید. سپس ارلن تلقیح شده به مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه و ۲۸ ^{o}C تکان داده شد. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاصل به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط TSB منتقل گردیده و به مدت ۱۲ ساعت بر روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ ^{o}C قرار داده شد. سپس محتویات ارلن به لوله سانتریفوژ منتقل و برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰g و در دمای ۴ ^{o}C سانتریفیوژ گردید. پس از سانتریفیوژ کردن محتویات لوله، محلول روئی دور ریخته شد. آنگاه سلول‌های باقی مانده در ته لوله دو بار با محیط حداقل DF شسته شدند و هر بار محلول رویی دور ریخته شد. پس از آن سلول‌های باقی مانده در ته لوله سانتریفیوژ در ۷/۵ میلی‌لیتر از محیط حداقل نمک‌های DF حل شدند و کل محتویات به ارلن ۵۰ میلی‌لیتری استریل منتقل گردید. سپس مقدار ۴۵ میکرو لیتر از محلول ۰/۵ مولار ACC که از قبل تهیه شده بود، به سوسپانسیون باکتریایی فوق اضافه گردید. آنگاه سوسپانسیون باکتریایی برای مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ ^{o}C قرارداده شد تا فعالیت آنزیم فوق القاء شود. سپس سوسپانسیون باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g و در دمای ۴ ^{o}C سانتریفیوژ گردید و محلول روئی دور ریخته شد. پس از آن سلول‌های باقی مانده در ته لوله با ۵ میلی‌لیتر از Tris-HCl یک دهم مولار (پ‌هاش ۷/۶) دو بار شسته شدند. آنگاه سلول‌های فوق در یک میلی‌لیتر از Tris-HCl یک دهم مولار (پ‌هاش ۷/۶) حل و کل محتویات به لوله میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید و برای مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g و دمای سانتریفیوژ، و محلول روئی دور ریخته شد. پس از آن سلول‌های باقی مانده در ته لوله در ۶۰۰ میکرو لیتر از Tris-HCl یک دهم مولار (پ‌هاش ۸/۵) معلق شدند. سپس به لوله میکروسانتریفیوژ محتوی سوسپانسیون باکتریایی فوق۳۰ میکرو لیتر تولوئن اضافه و به مدت ۳۰ ثانیه بشدت ورتکس گردید. در ادامه مقدار ۲۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون فوق بطور جداگانه به سه لوله میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل گردید (یک لوله بعنوان شاهد و دو لوله برای دو تکرار هرجدایه باکتری) و۱۰۰ میکرو لیتر نیز برای تعیین مقدار پروتئین سلولی کنار گذاشته شد (در ۴ ^{o}C. مقدار ۲۰ میکرو لیتر از محلول ACC نیم مولار به هر یک از لوله‌های میکروسانتریفیوژ محتوی ۲۰۰ میکرو لیتر ازسلولهای تولوئنی شده اضافه شد. لوله ها ابتدا ورتکس شده و سپس برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ ^{o}C درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنگاه یک میلی‌لیتر HCl ۰/۵۶ مولار به هر لوله اضافه گردید. پس از آن محلول نهایی درون هر لوله با استفاده از ورتکس مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g و در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول روئی درون هر لوله میکروسانتریفیوژ برداشته و با ۸۰۰ میکرو لیتر از HCl ۰/۵۶ مولار، درون یک لوله آزمایش کوچک ورتکس گردید. سیصد میکرو لیتر ازمحلول ۲،۴- دی‌نیتروفنیل ئیدرازین (محلول ۰/۲ درصد ۲،۴- دی‌نیتروفنیل ئیدرازین در HCl ۲ مولار) به هر لوله اضافه و ورتکس گردید. محتویات هرلوله برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ ^{o}C نگهداری شد. پس از آن به محلول فوق ۲ میلی‌لیتر سود (NaOH) ۲ مولار اضافه و مخلوط گردید تا یکنواخت شود. در پایان هم مقدار جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید. برای تهیه محلولهای استاندارد از آلفا- کتوبوتیرات استفاده شد. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین سلولی نیز از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد.

نتایج و بحث

نمونه های خاک از نظر میزان شوری از توزیع نسبتاً پیوسته و مناسبی برخوردار بودند. متوسط شوری خاکهای مورد مطالعه ۶ دسی‌زیمنس بر متر و محدوده آن از ۰/۹ تا ۱۱ دسی‌زیمنس بر متر متغیر بود. خاکهای مورد مطالعه از نظر pH نیز از توزیع خوبی برخوردار بودند که محدوده آن از ۷/۴ تا ۸/۱ متغیر بود. جدول ۱، EC عصاره اشباع و pH گل اشباع نمونه‌های خاک منتخب را نشان می‌دهد.

همچنین جمعیت کل باکتری‌ها در نمونه‌های خاک ریزوسفری کلزا از $۱/۸ \times ۱۰^{۶}$ تا $۵/۹ \times ۱۰^{۱۰}$ سلول به ازای هر گرم خاک متغیر بود (جدول۱). به عقیده ویپس (Whipps, 1990) اکثریت جمعیت میکروبی خاک

می‌توانند با ریشه‌های گیاه رابطه همیاری داشته باشند، بطوری که تعداد آنها می‌تواند حتی به بالاتر از 10^9 تا 10^{12} در هر گرم خاک ریزوسفری برسد. این فراوانی در خاکهای دارای پوشش گیاهی بواسطه وجود مواد غذایی در خاک ریزوسفری است که از طریق ترشحات ریشه در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار می‌گیرد. این ترشحات گیاهی می‌توانند رشد میکروبی را در نزدیکی ریشه‌های گیاه تحریک نمایند (Brimecombe *et al.*, 2001).

با در نظر داشتن ویژگی توان بالای کلنیزاسیون ریشه در انتخاب باکتری‌ها، تعداد ۱۰۵ کلونی باکتری از رقت های بالای خاک ریزوسفری کلزا بصورت تصادفی جداسازی و خالص‌سازی شدند. نتیجه کشت این ۱۰۵ جدایه بر روی محیط حداقل DF حاوی ACC ، نشان داد که فقط ۱۵ جدایه دارای توان استفاده از ACC بعنوان تنها منبع نیتروژن بودند.

جدول ۲ جذب نور سوسپانسیونهای حاصل از کشت این جدایه‌ها را در سه محلول DF , DF + ACC و $DF + (NH_4)_2SO_4$ ، را نشان می‌دهد. ۱۵جدایه مندرج در جدول ۲ قادر بودند که در محیط واجد ACC رشد کنند و بقیه جدایه‌ها فاقد این توانایی بودند.

رشد قابل ملاحظه این جدایه‌ها در محیط DF حاوی ACC در مقایسه با محلول DF بعنوان شاهد منفی می تواند حاکی از این امر باشد که این جدایه‌ها با دارا بودن آنزیم ACC deaminase توانسته اند ACC را هیدرولیز و از آن بعنوان منبع نیتروژن استفاده کنند (Jacobson *et al.*, 1994). وجود آنزیم ACC deaminase در تعداد زیادی از باکتری‌های محرک رشد گیاه و همچنین تعدادی از مخمرها و قارچها گزارش شده است (Jia *et al.*, 2000; Minami *et al.*, 1998; Shah *et al.*, 1998). همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود محلول DF تلقیح شده با جدایه‌ها که فاقد هر گونه نیتروژن بود نیز دارای مقداری هر چند کم جذب نوری است که این می تواند نشان از رشد محدود جدایه‌ها در این محلول باشد. به عقیده جاکوبسون و همکاران (Jacobson *et al.*, 1994) این رشد محدود ممکن است ناشی از استفاده باکتری از محیط کشتی باشد که در هنگام تلقیح جدایه به محلول DF همراه با سوسپانسیون باکتری منتقل شده است. همچنین کاتابولیسم برخی از متابولیتهای سلولی نیز ممکن است در این امر نقش داشته باشند.

شناسایی جدایه‌های دارای توان تولید آنزیم ACC deaminase با استفاده از نتایج آزمونهای میکروسکوپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مندرج در کتاب Bergey انجام گرفت. در ابتدا مورفولوژی باکتری‌ها بررسی و مشخص گردید که تمام جدایه‌ها به شکل باسیل یا کوکوباسیل بودند. همچنین رنگ‌آمیزی گرم و آزمون KOH نشان داد که کلیه جدایه‌ها گرم منفی بودند. جهت مشخص نمودن مسیر بعدی شناسایی، آزمون O/F انجام شد که نتیجه آن برای همه جدایه‌ها متابولیسم تنفسی (و نه تخمیری) و نشانه هوازی بودن این باکتری‌ها بود. لذا جدایه‌ها در گروه Gram negative aerobic (O^+F^-) rod and cocci قرار گرفتند. سپس آزمونهای بعدی جهت تعیین جنس جدایه‌ها انجام گرفت که ابتدا شامل آزمونهای تثبیت نیتروژن، رشد بر روی محیط اتانول و رشد بر روی محیط YMA + Congo red بود. نتایج نشان داد که هیچ یک از جدایه‌ها توانایی تبدیل اتانول به اسید استیک و همچنین تثبیت نیتروژن را نداشتند. از طرف دیگر چون تمام جدایه‌ها در ابتدای رشد در محیط YMA رنگ کنگورد را جذب کردند لذا احتمال قرار گرفتن آنها در بین جنس‌های مختلف ریزوبیومی وجود نداشت. در ضمن ویژگی‌های رشد جدایه‌ها و بخصوص مرفولوژی کلنی‌ها و ترتیب قرار گرفتن سلولها احتمال قرار گرفتن جدایه‌ها را در جنس‌های *Lampropedia* , *Janthinobacterium* , *Serpens* نیز منتفی کرد. با توجه به دمای مناسب برای رشد جدایه‌ها (۲۸ ^oC)، عدم نیاز آنها به درصد بالای نمک برای رشد و نیز محیطی که باکتری‌ها از آن جدا سازی شدند (خاک زراعی با تهویه خوب و نه زمین‌های غرقاب و باتلاقی)، احتمال قرار گرفتن جدایه‌ها در جنس‌های *Thermus* و *Thermomicrobium* و نیز جنس‌های مربوط به خانواده‌های *Halobacteriaceae* و *Methylococaceae* را منتفی ساخت. با عنایت به متحرک بودن جدایه‌ها و در ضمن عدم نیاز آنها به آب دریا جهت رشد، رشد جدایه‌ها بر روی محیط‌های پایه DF حاوی اسیدهای آمینه و اسیدهای آلی (استات، لاکتات، مالات، فومارات و ساکسینات) مورد بررسی قرار گرفت و از آن جهت که استفاده جدایه‌ها از نمکهای اسیدهای آلی موجب قلیایی شدن محیط کشت نگردید و نیز جدایه‌ها توانایی رشد در پی اچ ۳/۶ را نداشتند لذا تمامی جدایه‌ها در جنس *Pseudomonas* قرار گرفتند. در مرحله بعدی و پس از بررسی خاصیت فلورسنت جدایه‌ها بر روی محیط King B، مشخص گردید که کلیه جدایه‌ها در گروه سودوموناسهای فلورسنت قرار می‌گیرند. برای تعیین گونه جدایه‌ها از آزمونهای پیشنهاد شده توسط بوسیس و همکاران (Bossis *et al.*, 2000) استفاده شد. با توجه به نتایج آزمونهای تعیین گونه که در جدول ۳ ارائه شده است، همه جدایه‌ها بجز جدایه ۴۸ تحت عنوان *P. fluorescens* نامگذاری شدند. جدایه ۴۸ با وجود دارا

بودن واکنشهای کاتالاز و اکسیداز، به این دلیل که قادر به هیدرولیز آرژنین نبود ابتدا بنام *P. cichorii* نامگذاری شد ولی چون آزمونهای بعدی بر روی این جدایه مانند رشد در دمای ^{o}C ۴، ذوب ژلاتین، توانایی تشکیل لوان از سوکروز و آزمون احیای نیترات با نتایج مندرج در کتاب سیستماتیک باکتریولوژی برگی مطابقت نداشت لذا جدایه مذکور به صورت *Pseudomonas* sp. معرفی گردید.

به عقیده ساسلو و همکاران (Suslow *et al.*, 1982) باکتری‌های آزادزی مفید یا PGPR ها عمدتاً شامل سودوموناسهای فلورسنت هستند که پتانسیل بالایی در کلنیزه کردن ریشه گیاهان دارند. همچنین برخی تحقیقات بر روی جوامع باکتریایی محیط ریشه گیاهان نیز نشان داده شد که سودوموناسهای فلورسنت بخش مهمی از باکتری‌های ریزوسفری را تشکیل می‌دهند (Vlassak *et al.*, 1992; Benizri *et al.*, 1998).

بهرحال همانطور که نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد غالب سودوموناسهای جدا شده از ریزوسفر کلزا از گونه سودوموناس فلورسنس بودند. *P. fluorescens* یک باکتری فراوان و رایج خاک و ریزوسفر است که سیدروفور فلورسنسی بنام پیووردین یا سودوباکتین تولید می‌کند. تولید این سیدروفور مشخصه سودوموناسهای فلورسنت است (Abdallah, 1991).

پس از شناسایی جنس و گونه جدایه‌های قادر به تولید آنزیم ACC deaminase و به منظور انتخاب سویه‌های برتر، فعالیت این آنزیم در جدایه‌ها مورد سنجش قرار گرفت. ACC deaminase یک آنزیم چند واحدی است که جرم ملکولی هر واحد آن حدود ۳۵ تا ۴۲ کیلو دالتون می‌باشد. این آنزیم از طریق باز کردن حلقه سیکلوپروپان و جدا کردن گروه آمین، سوبسترای خود یعنی ACC را به آلفا– کتوبوتیرات و آمونیاک تجزیه می‌کند. بطور کلی تمایل یک آنزیم به سوبسترای خاص (مقدار Km)، بیش از آنکه نشان دهنده شدت اتصال بین آنزیم و سوبسترا باشد، منعکس کننده سرعت تبدیل سوبسترا به آنزیم است. مقدار Km برای اتصال ACC به ACC deaminase در عصاره‌های آنزیمی چندین میکروارگانیسم مختلف در پی اچ ۸/۵ تعیین گردیده و مشخص شده که Km در دامنه‌ای از ۱/۵ تا ۱۷/۴ میلی‌مولار تغییر می‌کند. این مقدار کم Km نشان می‌دهد که آنزیم ACC deaminase تمایل زیاد و خاصی برای ACC ندارد. از طرف دیگر چون آنزیم ACC oxidase که تشکیل اتیلن از ACC را کاتالیز می‌کند نسبت به آنزیم ACC deaminase تمایل خیلی بیشتری برای اتصال به ACC دارد لذا تنها راهی که از طریق آن ACC deaminase می‌تواند رقابت موثری با ACC oxidase داشته باشد و به تبع آن باعث کاهش سطح اتیلن در گیاه شود این است که مقدار ACC deaminase خیلی بیشتری (حدود ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ برابر) نسبت به مقدار ACC oxidase تولید شود. این مسئله دور از واقع نیست چون ACC oxidase که یک آنزیم القا شده است بطور طبیعی در بافتهای جوان و در شرایط بدون تنش فقط به مقدار خیلی کم وجود دارد (Glick, 2005). بهر حال بنظر می‌رسد اندازه‌گیری کمی آنزیم ACC deaminase و به عبارت دیگر تعیین فعالیت آنزیم ACC deaminase جدایه‌ها احتمالاً می‌تواند در انتخاب جدایه برتر جهت استفاده در تولید مایه تلقیح محرک رشد گیاه مفید واقع شود.

بطور کلی فعالیت آنزیم ACC deaminase به دو طریق تعیین می‌شود. ۱- از طریق اندازه‌گیری غلظت آلفا– کتوبوتیرات تولید شده حاصل از اثر آنزیم بر سوبسترا (ACC) در واحد پروتئین سلولی در ساعت. ۲- از طریق اندازه‌گیری غلظت آمونیاک تولید شده حاصل از اثر آنزیم بر سوبسترا (ACC) در واحد پروتئین سلولی در ساعت در این تحقیق فعالیت آنزیم ACC deaminase جدایه‌ها بر طبق روش پنروز و گلیک (Penrose and Glick, 2003) و از طریق اندازه‌گیری غلظت آلفا-کتوبوتیرات تولید شده بر واحد پروتئین سلولی در ساعت انجام گرفت. مقادیر فعالیت آنزیم ACC deaminase جدایه‌ها در جدول ۴ آمده است. همانطورکه نتایج نشان می‌دهند، فعالیت آنزیم ACC deaminase تولید شده توسط جدایه‌های مورد آزمایش متفاوت بوده و در دامنه‌ای از ۱/۴۳ تا ۸/۱۷ میکرومول آلفا– کتوبوتیرات بر میلی‌گرم در ساعت تغییر می‌کرد. همچنین تعیین ضریب همبستگی بین فعالیت آنزیم ACC deaminase جدایه‌ها با سرعت رشد آنها در محیط واجد ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن نشان داد که هیچ همبستگی معنی‌داری بین این دو پارامتر وجود ندارد. از این رو می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که انتخاب سویه برتر از نظر فعالیت آنزیم ACC deaminase نمی‌تواند براساس سرعت رشد باکتری در محیط واجد ACC صورت گیرد. رشد باکتری در محیط واجد ACC فقط می‌تواند معیاری برای تشخیص وجود این آنزیم در باکتری باشد.

فعالیت آنزیم ACC deaminase توسط برخی محققین در تعدادی از باکتری‌های خاک ریزوسفری و همچنین تعدادی از باکتری‌های نوترکیبی که ژن ACC deaminase را دریافت کرده بودند تعیین گردیده است (Belimov *et al.*, 2001 , 2005; Grichko & Glick, 2001; Ma *et al.*, 2003a , 2003b; Shah *et al.*, 1998).

Ma و همکاران (Ma *et al.*, 2003a) فعالیت آنزیم ACC deaminase باکترهای *P. putida* ATCC17399/PRKACC (تهیه شده از American Type Culture Collection)، *Enterobacter cloacae* strain UW4 (جداشده از ریزوسفر گیاه نی در واترلو کانادا) و *Enterobacter cloacae* strain CAL2 (جدا شده از ریزوسفر گیاه پنبه در کالیفرنیای آمریکا) را تعیین و بترتیب مقادیر ۳/۸ ، ۵/۲ و ۳/۶ میکرومول آلفا– کتوبوتیرات برمیلی‌گرم پروتئین در ساعت گزارش کردند. در تحقیق حاضر نیز نتایج بدست آمده از اندازه‌گیری فعالیت ACC deaminase جدایه‌ها با داده‌های فوق همخوانی دارد. همچنین Ma و همکاران (Ma *et al.*, 2003b) در تحقیقی دیگر فعالیت آنزیم ACC deaminase را در ۴ سویه از *R. leguminosarum* bv. *viciae* اندازه‌گیری نموده و مقادیر ۱/۰۶ ، ۰/۷۸ ، ۰/۹۳ و ۰/۴۳ میکرومول آلفا– کتوبوتیرات برمیلی‌گرم در ساعت را گزارش کردند. به عقیده گلیک (Glick, 2005) دامنه وسیعی از سطح فعالیت آنزیم ACC deaminase در بین میکروارگانیسم‌های مختلف خاک‌زی وجود دارد (بیش از ۱۰۰ برابر) بطوری که می‌توان این میکروارگانیسم‌ها را در دو گروه فرضی قرار داد. ۱- گروهی که دارای فعالیت آنزیمی بالایی هستند. ۲- گروهی که از سطح فعالیت آنزیمی پائینی برخوردارند. میکروارگانیسم‌هایی که فعالیت آنزیمی بالایی دارند معمولاً بطور غیر اختصاصی به سطوح بسیاری از گیاهان متصل می‌شوند. این گروه اکثراً شامل میکروارگانیسم‌های ریزوسفری، فیلوسفری و اندوفیت ها می باشند که می‌توانند مانند یک آبکش برای کاهش سطح ACC یی که متعاقب وقوع تنش بر گیاه تولید آن افزایش می‌یابد عمل کنند. میکروارگانیسم‌هایی که بیان آنزیم در آنها کم است فقط به گیاهان خاصی متصل می شوند و یا ژن مربوطه فقط در بافتهای خاصی از گیاه بیان می‌گردد. این میکروارگانیسم‌ها در مجموع سطح اتیلن در گیاه را کاهش نمی‌دهند ولی مانع افزایش موضعی اتیلن می‌شوند. این گروه عمدتاً (نه تماماً) از ریزوبیوم‌ها هستند. نفوذ در ریشه و تشکیل گره توسط ریزوبیوم‌ها باعث افزایش جزئی سطح اتیلن در گیاه می‌شود و از این رو فقط مقدار کمی از فعالیت آنزیم برای ممانعت از افزایش سطح اتیلن نیاز خواهد بود.

با توجه به گروه بندی فوق جدایه‌های مورد آزمایش در این تحقیق در گروه میکروارگانیسم‌هایی قرار می‌گیرند که از فعالیت آنزیمی بالایی برخوردارند. از این رو انتظار می‌رود که این جدایه‌ها بتوانند بطور غیر اختصاصی به سطوح ریشه انواعی از گیاهان متصل گردیده و متعاقب اعمال تنش باعث کاهش سطح اتیلن در گیاه و نتیجتاً کاهش اثرات مضّر تنشهای محیطی شوند.

در کشور ما خاکهای شور و لب شور فراوانی وجود دارند که هم اکنون در تولید برخی محصولات زراعی مانند کلزا مورد استفاده قرار می‌گیرند. کلزا (*Brassica napus* L.) از جمله گیاهان روغنی است که از حیث تحمل به شوری تا حدودی مشابه با گندم می باشد (Adolphe, 1980). لیکن درصد کاهش عملکرد آن پس از حد آستانه، نسبت به گیاهانی که آستانه تحمل مشابهی دارند شدیدتر است (Mass and Haffman, 1977). کشت کلزا در اراضی شور باعث اعمال تنش بر گیاه و کاهش عملکرد آن می‌شود. تنش شوری و مبارزه با آن از عمده مسائلی است که بشر از هزاران سال پیش تا کنون با آن دست به گریبان بوده است، بطوری که می‌توان آن را یکی از علل اصلی کاهش قابلیت استفاده اراضی برای تولید محصولات کشاورزی دانست. در شرایط کشت کلزا در خاکهای شور با توجه به اینکه در این تحقیق به سویه‌هایی با توان تولید آنزیم ACC deaminase دست یافته‌ایم که اکثراً دارای فعالیت آنزیمی بالایی هستند، بنابر این می‌توان چنین انتظار داشت که کاربرد آنها به عنوان مایه تلقیح، بتواند در کاهش سطح اتیلن در گیاهان و بویژه در شرایط کشت کلزا در خاکهای شور و متعاقباً در کاهش اثرات زیانبار این قبیل تنشهای محیطی موثر باشد. همچنین تعلق این سویه‌ها به گروه سودوموناسهای فلورسنت که از قدرت استقرار در ریزوسفر و پتانسیل کلنیزاسیون بالایی برخوردارند این نوید را می‌دهد که در صورت استفاده از آنها بعنوان مایه تلقیح، این سویه‌ها به خوبی بتوانند در ریزوسفر گیاهان و بخصوص کلزا مستقر شده، بذر و ریشه آنها را کلنیزه کنند. بهر حال هر گونه اظهار نظر قطعی در موارد فوق منوط به انجام تحقیقات تکمیلی و از جمله آزمایشات گلخانه‌ای است.

جدول۱- برخی مشخصات شیمیایی و بیولوژیکی خاک‌های مورد مطالعه

شماره نمونه خاک	EC $dS.m^{-1}$	pH	جمعیت کل باکتری‌های ریزوسفری
۱	۴/۶	۸	۱/۲ ×۱۰^{۸}
۲	۲/۵	۸	۹/۷ ×۱۰^{۹}
۳	۷/۳	۷/۶	۸ ×۱۰^{۸}
۴	۹/۹	۷/۵	۷/ ۲×۱۰^{۸}
۵	۹/۶	۷/۴	۴/۵ ×۱۰^{۱۰}
۶	۶/۵	۷/۶	۷/ ۳×۱۰^{۷}
۷	۴/۵	۷/۹	۱/۵ ×۱۰^{۱۰}
۸	۷/۳	۷/۷	۶/ ۲×۱۰^{۷}
۹	۷/۱	۷/۵	۲/ ۱×۱۰^{۷}
۱۰	۵/۶	۸/۱	۶/۹ ×۱۰^{۷}
۱۱	۳/۱	۸	۱/۸ ×۱۰^{۶}
۱۲	۲/۵	۸	۲/۷ ×۱۰^{۹}
۱۳	۲/۲	۸/۲	۱/۹ ×۱۰^{۷}
۱۴	۷/۹	۷/۸	۲/۲ ×۱۰^{۹}
۱۵	۳/۵	۷/۹	۴/۵ ×۱۰^{۷}
۱۶	۵/۲	۸	۲/۵ ×۱۰^{۷}
۱۷	۳/۹	۷/۸	۷/۳ ×۱۰^{۷}
۱۸	۱۱	۷/۶	۸/ ۲×۱۰^{۷}
۱۹	۱/۸	۸/۱	۲/۵ ×۱۰^{۶}
۲۰	۰/۹	۸	۵/۹ ×۱۰^{۱۰}
۲۱	۲/۳	۷/۵	۲/۳ ×۱۰^{۷}

جدول۲ – مقادیر جذب نور محلولهای تلقیح شده با جدایه‌های دارای

	مقدار جذب قرائت شده در ۴۰۵ نانومتر			
شماره خاک	شماره جدایه	DF	D F+ ACC	DF + $(NH_4)_2SO_4$
۱	۲	۰/۲۷۱	۰/۶۷۲	۳/۰۴۰
۲	۶	۰/۲۷۲	۲/۱۵۱	۳/۰۴۳
۶	۲۶	۰/۳۴۳	۱/۸۳۱	۲/۹۴۵
۶	۲۹	۰/۳۱۹	۱/۸۱۶	۲/۹۵۷
۹	۴۵	۰/۳۱۹	۲/۳۵۰	۳/۰۶۵
۱۰	۴۸	۰/۳۵۴	۲/۰۳۵	۲/۹۵۳
۱۲	۵۸	۰/۲۸۸	۲/۱۵۵	۲/۹۰۱
۱۳	۶۲	۰/۳۱۴	۱/۶۹۵	۲/۸۸۰
۱۴	۶۷	۰/۲۹۷	۱/۷۲۶	۳/۰۳۶
۱۴	۶۸	۰/۳۳۶	۱/۸۱۴	۳/۰۴۱
۱۵	۷۱	۰/۳۳۳	۱/۹۴۰	۳/۰۵۶
۱۶	۷۷	۰/۲۲۴	۱/۸۰۵	۲/۹۰۷
۱۷	۸۲	۰/۲۹۳	۱/۷۳۹	۳/۰۴۹
۱۸	۸۸	۰/۲۳۵	۱/۷۸۱	۲/۹۸۵
۲۰	۹۹	۰/۲۳۹	۱/۷۵۵	۳/۱۸۱

جدول ۳ – نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی جدایه‌های منتخب جهت تفکیک گونه

گونه پیشنهادی	تولید نور فلورسنس	هیدرولیز آرژنین	آزمون کاتالاز	آزمون اکسیداز	رشد در $41^{O}C$	رشد در $4^{O}C$	آزمون ذوب ژلاتین	استفاده از ترهالوز	استفاده از آرابینوز	آزمون تشکیل لوان	احیای نیترات
P. fluorescens strain RA2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA26	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA29	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA45	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
*Pseudomonas sp.*strainRA48	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA58	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA62	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
P. fluorescens strain RA67	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA68	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA71	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA77	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA82	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA88	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
P. fluorescens strain RA99	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-

جدول ۴ – مقدار فعالیت آنزیم ACC deaminase جدایه‌های منتخب

سویه	فعالیت ACC deaminase ($\mu moles\ .mg^{-1}.h^{-1}$)
P. fluorescens strain RA2	۳/۴۵
P. fluorescens strain RA6	۳/۵۸
P. fluorescens strain RA26	۲/۱۰
P. fluorescens strain RA29	۸/۱۷
P. fluorescens strain RA45	۲/۴۷
Pseudomonas sp strain RA48	۴/۲۵
P. fluorescens strain RA58	۱/۴۳
P. fluorescens strain RA6	۱/۴۸
P. fluorescens strain RA67	۴/۴۵
P. fluorescens strain RA68	۲/۳۷
P. fluorescens strain RA71	۴/۳۳
P. fluorescens strain RA77	۴/۶۱
P. fluorescens strain RA82	۳/۵۶
P. fluorescens strain RA88	۳/۶۶
P. fluorescens strain RA99	۱/۹۱

فهرست منابع:

1. Abdallah, M. A. 1991. Pyoverdins and pseudobactins, *In* G. Winkelmann (ed.) Handbook of Microbial Iron Chelates. CRC. Press, Inc., Boca Rato, Fla.
2. Abeles, F.B., D.W. Morgan and M. E. Saltveit Jr. 1992. Ethylene in Plant Biology. 2nd (ed). Academic Press, New York.
3. Adolphe, D. 1980. Canola rapeseed corn. Agriculture Canada CPS Food, Ltd. University of Saskatchewan.
4. Atlas, R. M.1993. Handbook of microbiological media. L. C. Parks. (ed) CRC Press Inc.
5. Belimov, A. A., V. I. Safronova, T. A. Sergeyeva, T. N. Egorova, V. A. Matveyeva, V. E. Tsyganov, A. Y. Borisov, I. A. Tikhonovich, C. Kluge, A. Preisfeld, K. J. Dietz, and V.V. Stepanok. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soil and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can . J . Microbiol. 47: 642-652.
6. Belimov, A. A., N. Hotzeas, V. I. Safronova, S.V. Demchinskaya, G. Piluzza, S. Bullitta, and B . R. Glick. 2005. Cadmium-tolerant plant growth- promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). Soil Biol . Biochem. 37: 241-250.
7. Benizri, E., A. Courtade, C. Picard, and A. Guchert. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxins by *Pseudomonas fluorescens*. Soil Biol. Biochem. 30: 1481-1484.
8. Bossis, E., P. Lemenceau, X. Latour, and L. Gardan, 2000. The taxonomy of *pseudomonas fluorescens* and *pseudomonas putida*: current status and need for revision. Agron. 20: 51-63.
9. Boven, G. D., and A. D. Rovira. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. Advances in Agronomy 66: 1-102.
10. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-258.
11. Brimecombe, M. J., F. A. De Leij, and J. M. Lynch. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. *In* R. Pinton, Z. Varanini, P. Nannipieri, (eds.) The Rhizosphere. Marcel Dekker, New York, pp: 95-140.
12. Burd, G. I., D. G. Dixon, and B. R. Glick. 1998. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in plant seedlings. Appl . Environ. Microbiol. 64: 3663-3668.
13. Burd, G. I ., D. G. Dixon, and B. R. Glick. 2000. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can . J . Microbiol. 46: 245-247.
14. Burdman, S., E. Jurkevitch, and Y. Okon. 2000. Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture. *In* N. S. Subba Rao and Y. R. Domergues (eds.) Microbial Interactions in Agriculture and Forestry. Science Publisher. Inc. pp: 229-242.
15. Davison, J . 1988. Plant beneficial bacteria. Biotech. 6: 282-286.
16. Dworkin, M. and J. Foster. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen J. Bacteriol. 75:592-601.
17. Glick, B . R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Can. J. Microbiol. 41: 109-117.
18. Glick, B. R., D. M. Penrose, and J. Li. 1997a. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth- promoting bacteria. J. Theor. Biol. 190: 63-68.

19. Glick, B . R., C. Liu, S. Ghosh, and E . B. Dumbroff. 1997b. Early development of canola seedlings in the presence of the root elongation. Soil Biol. Biochem. 29: 1233-1239 .
20. Glick, B . R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacteria enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiol. Let. 251: 1-7
21. Glick, B . R., D. M. Karaturovic, and P.C. Newell. 1995. A novel for rapid isolation of plant growth-promoting pseudomonads. Can . J . Microbiol. 41: 533-536
22. Grichko, V. P., and B .R. Glick. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiol. Biochem. 39: 11-17 .
23. Hall, J . A., D. Peirson, S. Ghosh, and B . R. Glick. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 . Israel J. Plant Sci. 44: 37-42 .
24. Hyodo, H. 1991. Stress/wound ethylene. *In* A. K. Matoo and J. C. Suttle (eds.) The Plant Hormone Ethylene. CRC Press . Boca Raton, FL . pp: 65-80 .
25. Jacobson, C. B., J. J. Pasternak, and B. R. Glick. 1994. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Can. J. Microbiol. 40: 1019-1025.
26. Jia, Y.J., H. Ito, and M. Honma, 2000. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase induced by ACC synthesized and accumulated in *Penicillium citrinum* intracellular spaces. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 299-305.
27. Klee, H . J., M . B. Hayford, K . A. Kretzmer, G . F. Barry, and G . M. Kishore. 1991. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. Plant Cell. 3: 1187-1193.
28. Kloepper, J . W., R. Lifshittz, and R . M. Zablotowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enchancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7: 39-43.
29. Krieg, N. R. 1984. Bergey,s Manual of Systematic Bacteriology. Vol(1). Williams & Wilkins Press.
30. Ma, W., S. B. Sebestianova, J. Sebestian, G. I. Burd, F. C. Guinel, and B . R. Glick. 2003a. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp. Antonie Van Leeuwenhoek. 83: 285-291
31. Ma, W., F. C. Guinel, and B . R. Glick. 2003b. *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase promotes nodulation of pea plants. Appl . Environ. Microbiol. 69: 4396-4402
32. Mac Faddin, J. F. 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd (ed) Waverly Press, Inc.
33. Mass, E .V., and G. J. Hoffman. 1977. Crop salt tolerance: Current assessment. J. Irrigation Drain. 103: 115- 134.
34. Mayak, S., T. Tirosh, and B. R. Glick. 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer ressistance to water stress in tomatoes and pepers. Plant Science. 66: 525-530.
35. Mayak, S., T. Tirosh, and B .R. Glick. 2004b. Plant growth-promoting bacteria that confer ressistance in tomato plant to salt stress. Plant Physiol. Biochem. 42: 565-572.
36. Minami, R., K. Uchiyama, T. Murakami, J. Kawai, K. Mikami, and T. Yamada. 1998. Properties, sequence and synthesis in *E.coli* of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Hansenula saturnus*. J. Biochem. 123: 1112-1118.
37. Penrose, D. M., and B. R. Glick, 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant 118: 10-15.
38. Rennie, R. J. 1980. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen - fixing) bacteria from soils. Can. J. Microbiol. 27: 8-14.

39. Schaad, N. W. 2001. Laboratory guide for identification of plant phathogenic bacteria. 3nd (ed). APS Press
40. Shah, S., J. Li, B. A. Moffatt, and B. R. Glick. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 44: 833-843.
41. Suslow, T. V., and M. N. Schroth. 1982. Rhizobacteria of sugerbeens: effects of seed application and root colonization on yield. Phytopathol. 72: 199-206.
42. Thornley, M. J. 1960. The identification of Pseudomonads from other gram- negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Appl. Bacteriol. 13: 37-52.
43. Vlassak, K., L. V. Holm, L. Duchateau, J. Vanderleyden, and R. D. Mot. 1992. Isolation and characterization of fluorescent *pseudomonas* associated with the roots of rice and banana growth in Srilanka. Plant Soil. 145: 51-63.
44. Wang, C., D. Wang, and Q. Zhou. 2004. Colonization and persistence of a plant growth promoting bacterium *pseudomonas fluorescens* strain CS85, on roots of cotton seedlings. Can . J. Microbiol. 50: 475-481
45. Whipps, J. M. 1990. Carbon economy. *In* J. M. Lynch (ed.) The Rhizosphere. Jonh Wiley & Sons, New York. pp: 59-97.