بررسی توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در جدایه های ریزوبیومی بومی برخی خاکهای ایران

عاطفه رمضانیان- حسینعلی علیخانی- ناهید صالح راستین- امیر لکزیان[1]

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۰/۲۵

چکیده

ریزوباکتریهای محرك رشد گیاه (PGPR) علاوه بر مکانیزمهای متعدد دیگر، می توانند رشد گیاه را از طریق تولید آنزیم ACC دآمیناز نیز افزایش دهند. باکتریهای PGPR مولد این آنزیم، با مصرف ACC (پیش ماده اولیه تولید اتیلن در گیاهان عالی) ترشح شده از بذر و ریشه های گیاه، مانع تبدیل آن به اتیلن شده و از اثرات سوء و بازدارنده رشد اتیلن تنشی که در پاسخ به تنشهای محیطی در گیاه تولید می شود، جلوگیری می نماید. برخی جدایه های باکتریهای ریزوبیومی نیز قادر به تولید ACC دآمیناز می باشند. این پژوهش با هدف بررسی توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در جدایه های ریزوبیومی بومی برخی خاکهای ایران و یافتن جدایه های برتر از این نظر انجام شد. در این راستا تعداد ۱۰۰ جدایه ریزوبیومی خالص سازی شده از برخی از خاکهای ایران در جنسها و گونه های مختلف، بر روی محیط RMM با دو منبع نیتروژن متفاوت (ACC و کلرید آمونیوم) کشت داده شدند. همچنین محیط RMM فاقد نیتروژن نیز به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد که از میان ۱۰۰ جدایه ریزوبیومی، ۶۵ جدایه دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز بوده که این تعداد بر اساس قطر کلنی تشکیل شده بر روی محیط RMM+ACC در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف گروه بندی شدند. بر اساس این گروه بندی تمامی جدایه های قوی و بیشتر جدایه های متوسط در جنس *Sinorhizobium meliloti* قرار داشتند. سایر جدایه های ریزوبیومی اکثراً در گروه ضعیف قرار گرفتند. باکتری *S.meliloti* از توان خوبی در تولید ACC دآمیناز در بین سایر جنسها و گونه های آزمون شده برخوردار بود.

واژه های کلیدی: PGPR، اتیلن تنشی، ریزوبیوم، ACCدآمیناز

مقدمه

اتیلن (C_2H_4) یک هیدروکربن غیر اشباع با وزن مولکولی ۲۸/۵۰ می باشد. این ماده بی رنگ، قابل اشتعال، سبکتر از هوا و قابل حل در آب می باشد. در اواخر قرن نوزدهم، دیمیتری نلجوبوف دریافت که اتیلن یک ترکیب بیولوژیک فعال است. اکنون می دانیم که اتیلن یک فیتوهورمون مهم است که در تنظیم بسیاری از جنبه های رشد و نمو گیاه دخالت دارد. از اولین اثرات شناخته شده اتیلن در گیاه، نقش این هورمون در رسیدگی میوه هاست. گزارشات علمی نشان می دهند که اتیلن از طویل شدن سلولهای ریشه و ساقه گیاه جلوگیری می کند (۳) و نیز مانع گره زایی در لگوم ها توسط باکتری های ریزوبیومی می شود(۱۲). به عنوان مثال، با به کار بردن ACC (۱- آمینو سیکلوپروپان-۱- کربوکسیلیک اسید) که پیش ماده تولید اتیلن در گیاهان عالی است، تعداد گره ها در یونجه و نخود کاهش یافته است(۱۰). به علاوه با به کار بردن مواد بازدارنده سنتز اتیلن مانند آمینو اتوکسی وینیل گلایسین (AVG) و یا یون نقره (جلوگیری کننده از شناسایی اتیلن توسط سلولها) گره زایی در یونجه و نخود بهبود یافته است(۸). تحقیقات اخیر نشان داده است که اثر بازدارندگی اتیلن روی رشد طولی ریشه و گره زایی می تواند توسط آنزیم ACC دآمیناز کاهش یابد(۴). این آنزیم تا کنون فقط در میکروارگانیزم ها شناسایی شده است. آنزیم ACC دآمیناز، میکروارگانیزم های دارنده آن را قادر می سازد تا با تجزیه ACC به آمونیوم و آلفا- کتوبوتیرات از این ماده به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کنند. مدلی که عمل این آنزیم را در باکتری های محرك رشد گیاه توضیح می دهد توسط گلیک و همکاران در سال ۱۹۹۸ پیشنهاد شد(۴). بر اساس این مدل، باکتری های ریزوبیومی که به سطح ریشه

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد خاکشناسی، استادیار و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

گیاهان یا بذرها متصل می شوند، می توانند مقداری از ACC موجود در ریزوسفر ریشه گیاه را از طریق فعالیت آنزیم ACC دآمیناز تجزیه کنند. برای برقرار ماندن تعادل بین سطح ACC در داخل و خارج سلولهای ریشه، گیاه مقدار ACC بیشتری ترشح می کند و در نتیجه غلظت اتیلن درون گیاه کاهش می یابد(۴). بر اساس مدل گلیک، مسلم است که جدایه هایی از ریزوبیوم که توانایی سنتز آنزیم ACC دآمیناز را دارند، می توانند سطح اتیلن در گیاه میزبان را پایین آورده و اثرات منفی اتیلن روی رشد ریشه و گره زایی را خنثی کنند. آزمایشات نشان می دهد گیاهانی که با باکتری هایی دارای آنزیم ACC دآمیناز تلقیح شده اند، ریشه های طویل تری داشته و بهتر می توانند در مقابل اثرات سوء اتیلن تنشی روی رشد گیاه که بر اثر آلودگی با فلزات سنگین، بیمارگرهای گیاهی و یا حالت غرقاب ایجاد می شود، مقاومت کنند (۲، ۵، ۶ و۱۳). به علاوه جدایه های *Escherichia coli*، *Pseudomonas* و *Azospirillium* که ژن مولد ACC دآمیناز در آنها وارد شده بود، توانایی تحریک رشد طولی ریشه های گیاه کلزا را کسب کردند(۱۰).

بلیموف و همکاران چندین جدایه باکتری PGPR را از ریزوسفر گیاه خردل هندی رشد یافته در لجن فاضلاب، ضایعات معدن و خاکهای شدیداً آلوده به کادمیم خالص سازی و فعالیت ACC دآمیناز آنها را ارزیابی نمودند. آنها همچنین همبستگی خوبی بین تلقیح گیاه خردل هندی با این باکتری ها و بهبود رشد این گیاه در غلظتهای سمی کادمیم مشاهده کردند(۱).

اولین گزارش در مورد توان تولید ACC دآمیناز در ریزوبیوم ها مربوط به ما و همکاران می باشد. این پژوهشگران ۱۳ جدایه ریزوبیومی را برای یافتن فعالیت ACC دآمیناز آزمون کردند. از آن میان ۵ جدایه دارای این آنزیم تشخیص داده شد. همچنین حضور ژن این آنزیم با روشهای مختلف در ژنوم این باکتری ها تأیید گردید(۹).

به طور کلی اطلاعات در مورد باکتری های ریزوبیومی حاوی آنزیم ACC دآمیناز بسیار محدود است و به جرأت می توان گفت که تا کنون مطالعاتی پیرامون باکتری های ریزوبیوم حاوی این آنزیم در ایران صورت نگرفته است. لذا در این پژوهش، ۱۰۰ جدایه از گونه های مختلف ریزوبیومی بومی برخی خاکهای ایران به منظور مطالعه توان تولید آنزیم ACC دآمیناز مورد بررسی قرار گرفتند تا تنوع باکتری های ریزوبیومی از نظر این ویژگی بسیار مثبت تا حدودی آشکار گردد.

مواد و روشها

تفکیک جدایه ها از نظر سرعت رشد و اندازه کلنی: از آنجا که در آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACC دآمیناز، ۸ جدایه باکتری در دو تکرار یعنی جمعاً ۱۶ کلنی باکتری در یک تشتک پتری ۹ سانتی متری جای می گیرند و اگر باکتری ها دارای سرعت رشد های متفاوت باشند ممکن است کلنی باکتری های تند رشدتر در زمان کوتاهی که برای رشد باکتری های کند رشدتر کافی نبوده به حداکثر رشد خود برسند و باعث غلبه بر این کلنی ها شوند، بنابراین قبل از انجام آزمون مذکور جدایه های مورد مطالعه از نظر سرعت رشد تفکیک و مرتب شدند. همچنین چون برخی از جدایه های ریزوبیومی قادر به استفاده از نیتروژن موجود در کلرید آمونیوم نیستند، مرحله تفکیک جدایه ها از نظر سرعت رشد و اندازه کلنی با تهیه دو گروه تشتک پتری حاوی محیط کشت RMM با دو منبع نیتروژن متفاوت (کلرید آمونیوم و عصاره مخمر) انجام شد. به این ترتیب همراه با مرتب کردن باکتری ها از نظر سرعت رشد، این جدایه های خاص نیز شناسایی شدند. با استفاده از نتایج این مرحله از پژوهش، جدایه های ریزوبیومی بر اساس سرعت رشد و اندازه کلنی تشکیل شده در طی ده روز، گروه بندی گردیدند (اطلاعات نشان داده نشده است). سپس در آزمون بعد جدایه های کند رشدتر با تراکم بیشتر و جدایه های تند رشدتر با تراکم کمتر در تشتک های پتری کشت داده شدند. همچنین جدایه هایی که قادر به رشد در محیط با منبع نیتروژن کلرید آمونیوم نبودند نیز حذف و با جدایه های دیگری جایگزین شدند.

بدین منظور دو گروه تشتک پتری ۹ سانتی متری حاوی محیط کشت RMM با دو منبع نیتروژن متفاوت (کلرید آمونیوم و عصاره مخمر) تهیه و کلیه جدایه ها در دسته های چهارتایی با دو تکرار روی آنها کشت شدند. محیط کشت RMM شامل سه جزء A، B و C بود.

جزء A: مقدار ۱/۰۲۵ گرم K_2HPO_4 و ۰/۷۲۵ گرم KH_2PO_4 در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و پس از تنظیم pH برابر ۷، محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد اتوکلاو شد.

جزء B : مقدار ۰/۰۷۵ گرم NaCl ، ۰/۰۰۵ گرم $CaCl_2.2H_2O$، ۰/۲۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$ ، ۵ گرم مانیتول و ۰/۵ میلی لیتر از محلول عناصر میکروی هوگلند در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل و پس از تنظیم pH برابر ۷، مقدار ۹ گرم باکتوآگار به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شد. لازم به ذکر است که جزء B در دو نوع تهیه شد که در یکی مقدار ۰/۳ گرم بر لیتر عصاره مخمر و در دیگری به همان مقدار کلرید آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن اضافه گردید.

جزء C : محلول جداگانه یک میلی گرم در میلی لیتر پنتاتونیک اسید، بیوتین و تیامین که پس از عبور از صافی سترون میلی پور (۰/۲μm) در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید.

برای تهیه محیط کشت RMM ابتدا در شرایط سترون از هرکدام از محلولهای ویتامین دار جزء C مقدار ۰/۵ میلی لیتر برداشته و به محلول جزء A اضافه و در پایان نیز جزء A به آرامی به جزء B اضافه گردید. سپس این دو نوع محیط کشت به طور جداگانه به میزان ۲۰-۱۵ میلی لیتر در تشتک های پتری سترون توزیع شد. برای مشخص کردن محل تلقیح، پشت هر تشتک پتری به ۱۶ قسمت تقسیم بندی گردید.

هر جدایه ریزوبیومی مورد استفاده در این پژوهش که به طور جداگانه روی محیط کشت YMA (۰/۶۵ گرم $K_2HPO_4.3H_2O$، ۰/۱ گرم NaCl، ۰/۲ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۰ گرم مانیتول و ۱۸ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و pH = ۶/۸-۷) به صورت خطی کشت داده شده بودند، با استفاده از خلال های چوبی سترون به هر دو گروه تشتک پتری RMM با دو تکرار تلقیح شدند. تشتک های پتری به مدت ۱۰ روز در انکوباتور با دمای ۲۸°C خوابانیده شدند. از روز دوم هر ۱۲ ساعت یک بار تشتک های پتری از نظر رشد قطر کلنی بررسی گردیدند. همچنین باکتری ها از نظر قدرت رشد روی محیط دارای کلرید آمونیوم و عصاره مخمر نیز بررسی و مقایسه شدند.

آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACC دآمیناز: جدایه های مورد مطالعه در این پژوهش از جنسها و گونه های *S.meliloti*، *Rhizobium leguminosarum bv.phaseoli*، *Rhizobium leguminosarum bv. viciea*، *Bradyrhizobium sp.* و *Mesorhizobium ciceri* انتخاب شدند. برای تهیه سوسپانسیون باکتری، لوله های آزمایش محتوی ۸ میلی لیتر محیط کشت TY (تریپتون ۰/۵، عصاره مخمر ۰/۳ و $CaCl_2.2H_2O$ ۰/۰۴۴ درصد وزنی- حجمی) مایع سترون با جدایه های مورد مطالعه تلقیح شدند و به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه تکان دهنده دورانی با سرعت ۱۲۰rpm در دمای ۲۸°C خوابانیده شدند و جمعیت باکتری ها به روش مک فارلند در حدود ۳×۱۰^۹ سلول در میلی لیتر تنظیم گردید. مقدار یک میلی لیتر از این سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۱۰۰۰×g سانتریفوژ و مایع رویی دور ریخته شد. سپس برای اطمینان از باقی نماندن محیط کشت در اطراف سلولها، باکتری ها با ۱۰۰μl از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم دو بار شستشو شده و در ۵۰μl از همان محلول سوسپانسیون گردیدند. مقدار ۲μl از این سوسپانسیون در دو تکرار روی سه گروه ظروف پتری حاوی محیط کشت RMM فاقد نیتروژن در محل تعیین شده قرار داده شد. روی گروه اول از ظروف پتری مقدار ۱۵۰μl از محلول ۰/۳ مولار ACC و روی گروه دوم مقدار ۱۵۰μl از محلول ۰/۳ مولار کلرید آمونیوم (شاهد مثبت PC) به عنوان تنها منبع نیتروژن اضافه و پخش گردید. گروه سوم هیچ منبع نیتروژنی دریافت نکرده و به عنوان شاهد منفی (NC) در نظر گرفته شد. تلقیح هر سه ظرف با یک جدایه ریزوبیومی در یک زمان واحد انجام گرفت. تشتک های پتری تلقیح شده به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۸°C درون انکوباتور خوابانیده شدند. در روزهای چهارم، هفتم و دهم بعد از کشت قطر کلنی های رشد یافته در تمام تیمارها و تکرارهای مربوط به یک جدایه یادداشت گردید.

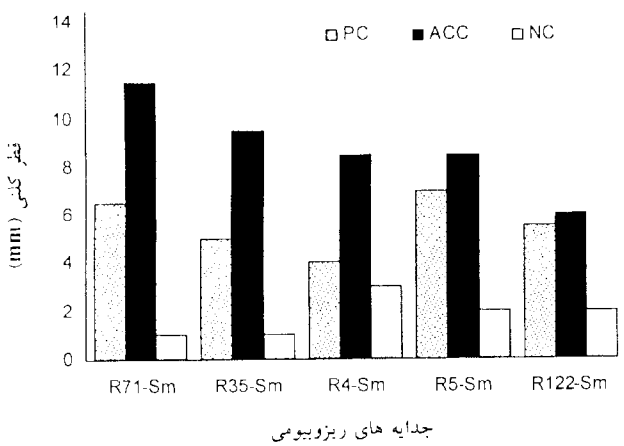
نتایج و بحث

نتایج حاصل از آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACC دآمیناز اندازه گیری شده در ۱۰۰ جدایه ریزوبیومی، نشان می دهد که برخی از باکتریهای ریزوبیومی بومی خاکهای ایران توان تولید این آنزیم را دارند و می توان آنها را در لیست باکتریهای مولد آنزیم ACC دآمیناز قرار داد. مشابه این نتایج اولین بار توسط ما و همکاران (۲۰۰۳) گزارش شده است (۹). همچنین این آنزیم در بسیاری از باکتری های محرک رشد گیاه، بعضی قارچها و مخمرها نیز یافت شده است(۷ و ۱۱).

نکته قابل توجه دیگر این است که توان تولید این آنزیم در بین

جدایه های مختلف ریزوبیومی مولد آن یکسان نیست و از این جهت جدایه ها بر اساس قطر کلونی تشکیل شده توسط هر جدایه بر روی محیط RMM+ACC فاقد نیتروژن، در سه گروه ضعیف (قطر کمتر از ۲/۵ میلیمتر)، متوسط (قطر بین ۲/۵ تا ۵/۵ میلیمتر) و قوی (قطر بیشتر از ۵/۵ میلیمتر) گروه بندی شده اند. جدول۱ لیست جدایه های ریزوبیومی تولید کننده ACC دآمیناز و جدول ۲ فراوانی (تعداد / درصد) آنها را نشان می دهد. از بین ۱۰۰ جدایه ریزوبیومی تعداد ۶۵ جدایه (۶۵٪) توانایی تولید آنزیم ACC دآمیناز را نشان دادند. طبق نتایج از بین ۱۵ جدایه از گونه *R.l.bv. phaseoli* جمعاً ۷ جدایه دارای توان تولید ACC دآمیناز شناسایی شدند که یک جدایه در گروه متوسط و ۶ جدایه در گروه ضعیف قرار گرفتند. از بین ۱۵ جدایه متعلق به گونه *R.l.bv. Viciea* ۸ جدایه $ACCd^+$[1] شناسایی شدند که همگی در گروه ضعیف قرار گرفتند و جدایه های متوسط و قوی در این گونه یافت نشد. از ۶۱ جدایه متعلق به گونه *S.meliloti* جمعاً ۴۴ جدایه $ACCd^+$ ارزیابی شد که ۲۴ جدایه در گروه ضعیف، ۱۵ جدایه در گروه متوسط و ۵ جدایه در گروه قوی قرار گرفتند. از ۶ جدایه انتخاب شده از گونه *M.ciceri* ۳ جدایه $ACCd^+$ یافت شد که ۲ جدایه در گروه ضعیف و ۱ جدایه در گروه متوسط قرار گرفت. از ۳ جدایه مربوط به جنس B.sp. همگی $ACCd^+$ ارزیابی اما در گروه ضعیف واقع شدند (جدول ۲). همانطور که مشاهده می شود از بین ۶۵ جدایه که دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز ارزیابی شدند ۵ جدایه، همگی متعلق به گونه *S.meliloti* در گروه قوی از نظر توان تولید آنزیم قرار گرفتند. در مورد سایر جنس و گونه ها مشاهده می شود که هیچ کدام در گروه قوی قرار نگرفته، تعداد جدایه های موجود در گروه متوسط بسیار اندك بوده و بیشتر جدایه ها در گروه ضعیف قرار گرفته اند. همچنین با محاسبه تعداد جدایه های $ACCd^+$ درون هر گروه ریزوبیومی، مشاهده می شود که صرفنظر از وضعیت گروه B.sp. که ۱۰۰٪ جدایه های آزمون شده آن دارای توان تولید ACC دآمیناز بودند (از این جهت می توانیم از این وضعیت صرفنظر کنیم چون تعداد جدایه ها در این گروه کم بوده و البته همگی نیز در گروه ضعیف قرار گرفته اند)، گونه *S.meliloti* دارای بالاترین درصد جدایه های $ACCd^+$ (۷۲/۱٪) می باشد و تقریباً نیمی از آنها در گروههای قوی و متوسط قرار گرفته اند. بر این اساس به نظر می رسد که گونه *S.meliloti* در بین سایر گونه های ریزوبیومی مورد مطالعه در این پژوهش، از توان بهتری در تولید آنزیم ACC دآمیناز برخوردار بودند.

شکل ۱ مقایسه قطر کلنی جدایه های ریزوبیومی گروه قوی بر روی محیط های حاوی ACC، کلرید آمونیوم و شاهد پس از ۱۰ روز را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود قطر کلنی حاصل از این جدایه ها بر روی محیط حاوی ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن بیشتر از کلنی حاصل بر روی محیط فاقد نیتروژن و حتی بیشتر از کلنی حاصل بر روی محیط دارای کلرید آمونیوم است. بر این اساس باکتری های گروه قوی با تولید مقدار قابل توجهی آنزیم ACC دآمیناز، توانسته اند به خوبی از ماده ACC به عنوان منبع نیتروژن و حتی بهتر از کلرید آمونیوم استفاده کنند. این نتیجه درشکل ۲ که یک جدایه برتر از نظر تولید آنزیم ACC دآمیناز را نشان می دهد نیز به خوبی مشاهده می شود.



شکل(۱) مقایسه قطرکلنی جدایه های ریزوبیومی گروه قوی بر روی محیط های حاوی ACC، کلرید آمونیوم و شاهد پس از ۱۰ روز

یافته های علمی بسیار ارزشمندی مبنی بر اینکه باکتریهای PGPR می توانند به طور موفق در کشاورزی پایدار مورد استفاده قرار گیرند در منابع علمی وجود دارد که نشان می دهد PGPR ها از طریق مکانیزمهای بسیار زیاد چه به صورت مستقیم و چه به صورت غیر مستقیم می توانند باعث کاهش معنی دار در کاربرد کودهای شیمیایی و آفت کش ها شوند. در این میان تولید آنزیم

۱- باکتریهای دارای توان تولید آنزیم ACC د آمیناز

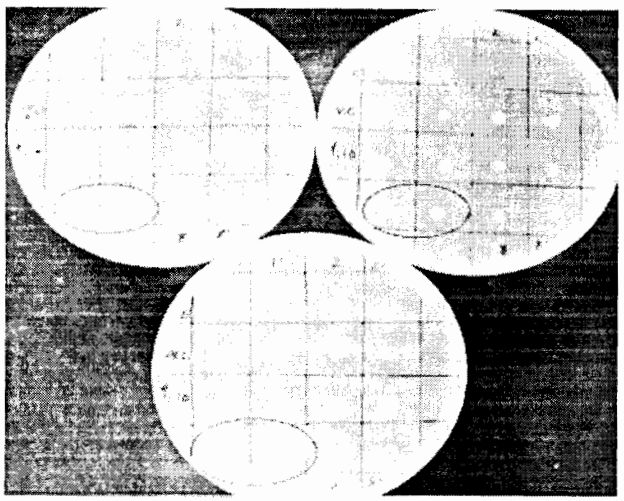
جدول(۱) جدایه های ریزوبیومی مولد آنزیم ACC د آمیناز

ردیف	جدایه ریزوبیومی	توانایی تولید آنزیم ACC دآمیناز		
		ضعیف	متوسط	قوی
۱	R71-*Sm*			+
۲	R35-*Sm*			+
۳	R4-*Sm*			+
۴	R5-*Sm*			+
۵	R122-*Sm*			+
۶	R17-*Sm*		+	
۷	R121-*Sm*		+	
۸	R81-*Sm*		+	
۹	R167-*Sm*		+	
۱۰	R159-*Sm*		+	
۱۱	R133-*Sm*		+	
۱۲	R123-*Sm*		+	
۱۳	R397-*Mc*		+	
۱۴	R277-*Rlp*		+	
۱۵	R21-*Sm*		+	
۱۶	R16-*Sm*		+	
۱۷	R14-*Sm*		+	
۱۸	R94-*Sm*		+	
۱۹	R119-*Sm*		+	
۲۰	R6-*Sm*		+	
۲۱	R23-*Sm*		+	
۲۲	R137-*Sm*		+	
۲۳	R64-*Sm*		+	
۲۴	R226-*Bsp*	+		
۲۵	R163-*Sm*	+		
۲۶	R15-*Sm*	+		
۲۷	R155-*Sm*	+		
۲۸	R22-*Sm*	+		
۲۹	R11-*Sm*	+		
۳۰	R69-*Sm*	+		
۳۱	R494-*Rlv*	+		
۳۲	R325-*Rlv*	+		
۳۳	R297-*Rlp*	+		
۳۴	R26-*Sm*	+		
۳۵	R18-*Sm*	+		
۳۶	R158-*Sm*	+		
۳۷	R141-*Sm*	+		
۳۸	R140-*Sm*	+		
۳۹	R129-*Sm*	+		
۴۰	R7-*Sm*	+		
۴۱	R493-*Rlv*	+		
۴۲	R492-*Rlv*	+		
۴۳	R491-*Rlv*	+		
۴۴	R406-*Mc*	+		
۴۵	R380-*Mc*	+		
۴۶	R348-*Rlv*	+		
۴۷	R341-*Rlv*	+		
۴۸	R321-*Rlv*	+		
۴۹	R310-*Rlp*	+		
۵۰	R289-*Rlp*	+		
۵۱	R284-*Rlp*	+		
۵۲	R281-*Rlp*	+		
۵۳	R261-*Rlp*	+		
۵۴	R24-*Sm*	+		
۵۵	R240-*Bsp*	+		
۵۶	R239-*Bsp*	+		
۵۷	R165-*Sm*	+		
۵۸	R149-*Sm*	+		
۵۹	R144-*Sm*	+		
۶۰	R13-*Sm*	+		
۶۱	R128-*Sm*	+		
۶۲	R127-*Sm*	+		
۶۳	R117-*Sm*	+		
۶۴	R10-*Sm*	+		
۶۵	R126-*Sm*	+		

جدول(۲)فراوانی و گروه بندی جدایه های ریزوبیومی از نظر توان تولید آنزیم ACC د آمیناز

گروههای مختلف ریزوبیومی			فراوانی جدایه های ACCd' در سطوح مختلف				
نام گروه (جنس-گونه-بیووار)		تعداد جدایه	قوی	متوسط	ضعیف	جمع	درصد درون هر گروه
R.leguminosarum	bv.*phaseoli* (*Rlp*)	۱۵	۰	۱	۶	۷	۴۶/۶
	bv.*viciae* (*Rlv*)	۱۵	۰	۰	۸	۸	۵۳/۳
Sinorhizobium meliloti (*Sm*)		۶۱	۵	۱۵	۲۴	۴۴	۷۲/۱
Mesorhizobium ciceri (*Mc*)		۶	۰	۱	۲	۳	۵۰
Bradyrhizobium spp.(Bsp)		۳	۰	۰	۳	۳	۱۰۰
جمع کل		۱۰۰	۵	۱۷	۴۳	۶۵	

ACC دآمیناز توسط برخی باکتریهای خاکزی از جمله ریزوبیوم ها که سودمندترین باکتریهای شناخته شده و همزیست گیاهان لگوم می باشند، یکی از جنبه های نوین کاربرد PGPR ها در زمینه های مختلف اعم از افزایش عملکرد و بهبود کیفیت محصولات کشاورزی بویژه در شرایط تنشهای محیطی موجود (غرقاب، خشکی، حمله عوامل بیمارگر گیاهی و آلودگی خاك با فلزات سنگین) می باشد(۱و۲). همچنین باکتریهای مولد ACC دآمیناز پتانسیل بسیار خوبی برای استفاده در سیستمهای زیست پالایی ریزوسفر برای تجزیه یا تجمع مواد غیر زیستی یا فلزات سنگین و سایر آلاینده ها دارند. با شناسایی ژن مولد این آنزیم و استخراج آن از باکتریها، می توان در موارد مختلف آن را به کار برد. این موارد شامل انتقال این ژن به باکتریهای شناخته شده و مفید که فاقد آن هستند و در نتیجه اضافه کردن این توانایی به سایر توانایی های باکتریهای مورد نظر و انتقال این ژن به گیاهان مخصوصاً گیاهانی که از آنها برای اهداف گیاه پالایی استفاده می شود، می باشد.



شکل(۲)نمایش جدایه برتر S.meliloti مولد آنزیم ACC دآمیناز تشتک پتری بالا راست: شاهد منفی (فاقد هرگونه منبع نیتروژن) تشتک پتری بالا چپ: شاهد مثبت (حاوی کلرید آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن) تشتک پتری پایین: حاوی ACC به عنوان منبع نیتروژن

منابع

1. Belimov, A.A., Hontzeas, N., Safronova, V.I., Demchinskaya, S.V., Piluzza, G., Bullitta, S., and Glick, B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth- promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (Brassica juncea L. Czern. Soil Biol. Biochem. 37: 241-250
2. Burd, G.I., Dixon, D.G., and Glick, B.R. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol. 46: 237-245.
3. Davies,P.J.,1990. Plant hormones and their role in plant growth and development.Kluwer Academic Publishers.
4. Glick, B.R., Penrose, D.M., and Li, J. 1998. A model for the lowering of plant Ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. J. Theor. Biol. 190: 63-68.
5. Grichko V.P. and Glick B.R. 2001. Amelioration flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiol. Biochem. 39: 11-17.
6. Hall, J. A., Peirson, D., Ghosh, S., and Glick, B. R. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium Pseudomonas putida GR 12-2 .Isr. J. Plant Sci. 44: 37-42.
7. Jia, Y. J., Ito, H., Matsui, H., and Honma, M., 2000. ACC deaminase induced by ACC synthesized and accumulated in Penicillium citrinum intracellular spaces. Biosci. Biothechnol. Biochem. 64: 299-305.
8. Lee K.H. and La Rue T.A. 1992. Exogenous ethylene inhibits nodulation of pisum sativum L. cv Sparkle. Plant Physiol. 100:1759-1763.
9. Ma, W., Sebestianova, S.B., Sebestian, J., Burd, G.I., Guinel, F.C., and Glick, B.R. 2003. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in Rhizobium spp. Antonie van Leeuwenhoek 83: 285-291.
10. Nukui, N., Ezura, H., Yuhashi, K.I., Yasuta, T., and Minamisawa, K. 2000.effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in Lotus japonicus and Macroptilium atropurpureum. Plant Cell Physiol. 41:893-897.
11. Shah, S., Moffat, B., and Glick, B.R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 44: 833-843.
12. Spaink H.P.1997.Ethylene as a regulator of Rhizobium infection. Trends Plant Sci. 2:203-204.
13. Wang C., Knill, E., Glick, B.R., and Defago, G. 2000. Effects of transferring Acc deaminase genes into Pseudomonas fluorescens strain CHA0 and its gacA derivative CHA96 on their growth-promoting and disease-suppressive capacities. Can. J. Microbiol. 46: 898-907.

Study on ACC deaminase-containing rhizobial isolates indigenous to some soils of Iran

A. Ramezanian – H. A. Alikhani – N. Salehrastin – A. Lakazian[1]

Abstract

In addition to various mechanisms through which Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) stimulate plant growth, they can also do this job through producing the enzyme of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase. ACC deaminase containing rhizobacteria by utilizing ACC which is the immediate precursor of ethylene biosynthesis in higher plants and exudated from roots and seeds, can modulate ethylene levels which is increased in respond to environmental stresses and called stress ethylene. Some strains of rhizobia are also able to produce ACC deaminase. This project was done in order to study the ability of ACC deaminase production in some strains of rhizobia, indigenous to some soils of Iran and finding super strains among them. In this research, 100 isolates of rhizobia were cultured on Rhizobial Minimal Medium (RMM) with two different sources of nitrogen (ACC and ammonium chloride) and a control with no nitrogen at all. Results showed that 65% of strains could produce ACC deaminase and were divided into three groups of strong, mild and weak due to their colony diameter. All strong strains and most of mild ones belonged to Sinorhizobium meliloti. Other strains mostly belonged to weak division. S. meliloti had a good ability to produce ACC deaminase among all tested strains.

Key words: PGPR, stress ethylene, Rhizobium, ACC deaminase

1- Contribution from Tehran University Karaj, and Ferdowsi University of Mashhad.