بررسی تأثیر باکتری‌های مولد آنزیم ACC دآمیناز و شوری خاک بر شاخص‌های رشدی و تغذیه‌ای گندم

احمدعلی پوربابایی[1]، ابراهیم بهمنی، حسینعلی علیخانی و سمیه امامی

دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران؛ **pourbabaei@ut.ac.ir**

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران؛ **bahmani.ebrahim@yahoo.com**

استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران؛ **halikhan@ut.ac.ir**

دانش‌آموخته دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران؛ **emamisomaye@ut.ac.ir**

دریافت: **98/11/26** و پذیرش: **99/7/23**

چکیده

باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه که حاوی آنزیم 1- آمینوسیکلوپروپان 1-کربوکسیلیک اسید (ACC) دآمیناز هستند می‌توانند برای بهبود رشد گیاه به ویژه در شرایط نامساعد محیطی به کار روند. در مطالعه حاضر، جدایه‌های باکتری از ریزوسفر گندم در سه استان زنجان، کردستان و همدان جدا شده و از نظر توان تولید آنزیم ACCدآمیناز و مقاومت به شوری غربال شدند. از میان 167 جدایه، شش جدایه قادر به تجزیه ACC به آلفاکتوبوتیرات و آمونیوم بودند که جدایه K78 به دلیل رشد بیشتر در غلظت‌های بالاتر نمک جهت استفاده در کشت گلخانه‌ای انتخاب شد. آزمایش گلخانه‌ای بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار روی گندم انجام گرفت. فاکتورها شامل شوری در پنج سطح (1/3، 8، 12، 14، 16 دسی‌زیمنس بر متر) و باکتری در سه سطح (بدون باکتری (B0)، جدایه مقاوم به شوری و تولید کننده ACCدآمیناز (B1)، جدایه مقاوم به شوری و فاقد توان تولید ACCدآمیناز (B2)) بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که شوری در تمامی سطوح تاثیر منفی و معنی‌داری بر رشد و جذب عناصر غذایی داشت و موجب کاهش طول اندام هوایی گندم شد. تأثیر تلقیح جدایه K78 نسبت به تیمار بدون باکتری معنی‌دار بوده و موجب افزایش طول اندام هوایی (21/5 درصد) و افزایش جذب پتاسیم (15 درصد) گردید؛ اما بر جذب سدیم تاثیری نداشت. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت استفاده از زادمایه جدایه K78 می‌تواند اثرات منفی شوری را بر شاخص‌های رشد و شرایط تغذیه‌ای گندم کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، *باسیلوس*، سدیم، تنش محیطی

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه علوم و مهندسی خاک.

مقدمه

شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیر زنده‌ای است که باعث کاهش قابلیت تولید محصول در خاک‌های مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌شود. مشخص شده است که گیاه گندم در مراحل رشد رویشی و اوایل رشد زایشی حساس، در مرحله گلدهی حساسیت متوسط و در مرحله پر شدن دانه حساسیت کمی به تنش شوری دارد. با افزایش سطوح شوری، سرعت تقسیم سلول‌های مریستمی ریشه ها کاهش می‌یابد (آولبو و همکاران، 2009). برخی از تنش‌ها از جمله کم آبی و شوری باعث تغییراتی در فیزیولوژی گیاهی می‌گردند که از جمله آنها افزایش بیوسنتز اتیلن و رسیدن غلظت آن در حد کاهش دهنده رشد گیاهی یا همان اتیلن تنشی می‌باشد. اتیلن تنشی باعث کاهش دوره رویشی و در نهایت کاهش عملکرد گیاه می‌گردد (مایاک و همکاران، 2004). گلیک و همکاران (2005) معتقدند که مقادیر کم اتیلن (در غلظت های کمتر از 0/05 میکرولیتر در لیتر عصاره گیاهی) برای جوانه زنی گندم لازم است اما افزایش بیشتر سطح اتیلن در اثر تنش‌های محیطی تحت عنوان اتیلن تنشی رشد گیاه را کاهش می‌دهد. سیداک و همکاران (2011) نیز اظهار داشتند که اتیلن تولید شده در پاسخ به تنش شوری، باعث کاهش رشد ریشه و در نتیجه کاهش جذب آب و عناصر غذایی و کاهش رشد گیاه می‌گردد.

کلاسن و بیگبی (2000) بیان کردند که غلظت اتیلن در حد 0/025 میلی‌گرم در کیلوگرم موجب کاهش 25 درصدی عملکرد گندم شد. بنابراین کاهش سطح اتیلن می‌تواند به کاهش برخی از اثرات مضر تنش در گیاهان منجر شود (گلیک، 2004). مکانیسم‌های شناخته شده برای کاهش اثرات منفی تنش شوری در محصولات کشاورزی که توسط ریزسازواره‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد، شامل تولید ACC[1] دآمیناز، بهبود رشد و توسعه گیاه به وسیله باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد[2]، تولید اگزوپلی‌ساکاریدها توسط برخی از باکتری‌ها و همچنین تنظیم اسمزی و تجمع پرولین توسط قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌باشند که موجب افزایش مقاومت گیاهان در برابر شوری می‌شوند (کروور و همکاران، 2011). تعدادی از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد دارای توانایی تولید آنزیمی به نام ACCدآمیناز هستند که می‌تواند با تجزیه ACC (پیش ماده لازم برای تولید اتیلن در گیاهان) به آلفاکتوبوتیریک اسید و آمونیوم، تولید اتیلن را تنظیم کنند. تلقیح گیاهان با باکتری‌های محرک رشد دارای آنزیم ACCدآمیناز باعث می‌شود که میزان تولید اتیلن در شرایط تنش کاهش یافته و به تبع آن رشد و نمو گیاه متعادل شود (اخگر و همکاران، 1390). کاملترین مدل برای توصیف نقش ACCدآمیناز در کاهش سطح اتیلن در گیاهان توسط گلیک و همکاران (1998) و اصلاح شده آن توسط گلیک و همکاران (2007) ارائه شده است. در این مدل، استدلال شده است که یک باکتری با توانایی تولید ACC دآمیناز پس از اتصال به بذر یا ریشه گیاه، حلقه مونومرهای ACC را در دو مرحله جدا کرده و موجب شکستن مولکول ACC به آلفا کتوبوتیرات و آمونیم می‌گردد. با کاهش غلظت ACC در سطح خارجی بافت‌های ریشه گیاه و برای برقراری تعادل بین سطح ACC در داخل و خارج از سلول‌های ریشه، مقدار بیشتری از ACC تولیدی گیاه به بیرون از ریشه (بدرون خاک) ترشح شده و ضمن ایجاد یک شیب غلظتی باعث کاهش غلظت ACC و درنتیجه غلظت اتیلن در درون بافت‌های ریشه گیاه می‌گردد. با این فرایند، باکتری‌های مولد آنزیم ACCدآمیناز باعث کاهش تولید اتیلن تنشی و اثرات سوء آن بر رشد گیاه می‌شوند؛ به طوری که بوته میری گیاهان به ویژه در اوایل رشد کاهش می‌یابد. ساراواناکومار و سمپایان (2007) با ارزیابی‌تأثیر چهار سویه *سودوموناس فلورسنس* بر ایجاد مقاومت گیاهان بادام زمینی در مقابل تنش شوری نشان داند که سویه *P. fluorescens* TDK1 که در بین سویه‌های دیگر *سودوموناس فلورسنس* مورد آزمایش تنها سویه دارای توان تولید ACCدآمیناز بود بیشترین‌تأثیر را بر افزایش پارامترهای رشد گیاهچه‌های بادام زمینی در شرایط آزمایشگاهی و پارامترهای محصول در کشت مزرعه‌ای و تحت شرایط خاک شور داشت.

آن‌ها در این تحقیق چنین نتیجه‌گیری کردند که احتمالاً توانایی سویه TDK1 نسبت به سایر سویه‌ها در افزایش مقاومت بادام‌زمینی مرهون توانایی آن در تولید آنزیم ACCدآمیناز بوده است. در تحقیقی دیگر مایاک و همکاران (2004) از باکتری *A. piechaudii* ARV8 جهت بررسی‌تأثیر آن بر ایجاد مقاومت به شوری در گیاهچه‌های گوجه فرنگی استفاده کردند. آن‌ها در این تحقیق تعدادی از گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی کاشته شده در ورمیکولیت را 10 روز پس از کشت با سوسپانسیون باکتریایی تیمار کردند و تعدادی را هم بعنوان شاهد در نظر گرفتند. سپس گیاهچه‌های گوجه-فرنگی را با محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از سدیم کلرید (0، 43، 86، 120، 172، 207 میلی مولار)

[1] AminoCyclopropane-1-Carboxylic acid
[2] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

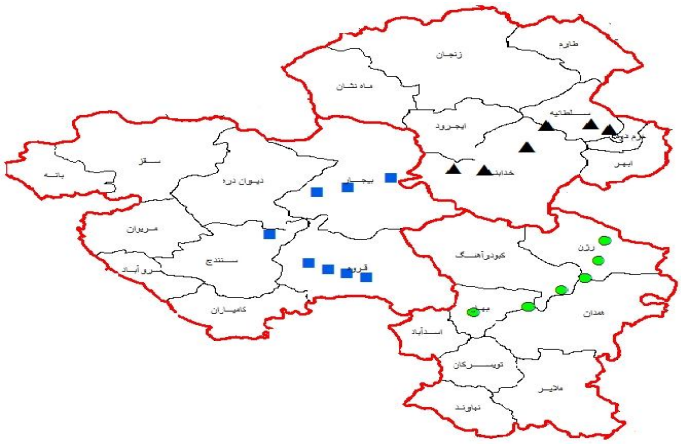
آبیاری نمودند. نتایج نشان داد که گیاهان مایه‌زنی شده با باکتری، رشد بیشتری نسبت به تیمار بدون باکتری داشتند. به عبارت دیگر باکتری مذکور توانسته بود وزن خشک و تر گیاه را افزایش دهد.

تحقیقات زیادی در زمینه استفاده از ریزسازواره‌های مولد آنزیم ACCدآمیناز برای کاهش اتیلن تنشی ناشی از شوری در گیاه انجام گرفته است؛ با این وجود استفاده از باکتری‌های مقاوم به شوری مولد ACCدآمیناز بخصوص در شوری‌های نسبتاً بالا به دلیل رشد و پایداری بهتر آن‌ها در محیط‌های شور می‌تواند قابل توجه باشد (دین و همکاران، 2019). با توجه به اهمیت اقتصادی و راهبردی گندم و نقش برجسته آن در تغذیه مردم ایران و با توجه به محدودیت‌های موجود نظیر شوری و کمبود آب، ارائه راهکارهای مفید در افزایش رشد و عملکرد آن لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. لذا این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های تولید کننده آنزیم ACCدآمیناز و مقاومت به شوری و بررسی نقش آنها در کاهش اثرات سوء تنش شوری در شرایط گلخانه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک ریزسفری

نمونه‌برداری از اراضی دیم زیر کشت گندم در سه استان زنجان، کردستان و همدان انجام شد (شکل 1). برای این منظور تعداد20 نمونه خاک ریزوسفری گندم از عمق 30-0 سانتی‌متری تهیه گردید. نمونه‌ها در فلاسک به آزمایشگاه انتقال داده شده و تا آغاز مراحل جداسازی در یخچال و در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شدند.



شکل 1- نقاط نمونه برداری شده در سه استان مورد مطالعه

جداسازی باکتری‌های مقاوم به شوری

جداسازی اولیه برمبنای شوری صورت گرفت؛ بدین صورت که ابتدا سری‌های رقت 10^{-1} تا 10^{-7} با استفاده از سرم فیزیولوژیک (0/85 درصد) تهیه شد و از هر یک از رقت‌ها یک میلی‌لیتر به محیط نوترینت آگار[1] حاوی 5 درصد نمک (ترکیبی از نمک‌های NaCl، $MgSO_4.7H_2O$، $MgCl_2.H_2O$، KCl، $CaCl_2.2H_2O$، NaBr و $NaHCO_3$) تلقیح شد و پلیت‌ها در گرمخانه با دمای 28 درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. کلنی‌های رشد یافته با ظاهر متفاوت، بصورت جداگانه در پلیت‌های حاوی نوترینت آگار حاوی 5 درصد نمک خالص‌سازی شدند. پس از رشد و خالص‌سازی، جدایه‌های باکتریایی کدگذاری و با تهیه لام و رنگ آمیزی گرم، خالص بودن آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (ژوهانسون و کارل، 1972).

غربالگری جدایه‌ها از حیث توانایی استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن

غربالگری جدایه‌ها از حیث توانایی استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن به صورت کمی با استفاده از محیط کشت DF^2 (شامل 4 گرم در لیتر KH_2PO_4، 6 گرم در لیتر Na_2HPO_4، 0/2 گرم در لیتر $MgSO_47H_2O$، 2 گرم در لیتر گلوکز، 2 گرم در لیتر گلوکونیک اسید، 2 گرم در لیتر اسید سیتریک و همچنین عناصر ریزمغذی شامل: 1 میلی‌گرم در لیتر $FeSO_47H_2O$، 10 میکروگرم در لیتر H_3BO_3، 10 میکروگرم در لیتر $MnSO_4H_2O$، 124/6 میکروگرم در لیتر $ZnSO_47H_2O$،

[1] Nutrient Agar

[2] Dworkin Foster

78/2 میکروگرم در لیتر $CuSO_4 5H_2O$، 10 میکروگرم در لیتر MoO_3 و در pH نهایی 7/2) تعیین شد. برای انجام این آزمایش از سه سری پلیت دارای محیط کشت DF که شامل ظروف پتری حاوی 20 میلی‌لیتر محیط کشت DF و 3 میلی‌مولار ACC؛ ظروف پتری حاوی 20 میلی‌لیتر محیط کشت DF و 2 گرم در لیتر سولفات آمونیوم به عنوان شاهد مثبت و ظروف پتری حاوی 20 میلی‌لیتر محیط کشت DF بدون هرگونه منبع نیتروژنی به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACCدآمیناز

میزان فعالیت آنزیم ACCدآمیناز جدایه‌هایی که قادر به مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن بودند به روش پنروز و گلیک (2003) و از طریق اندازه‌گیری مقدار آلفا کتوبوتیرات تولید شده در عصاره باکتریایی تعیین گردید.

تعیین مقاومت جدایه‌های تولید کننده ACCدآمیناز به شوری

محیط کشت نوترینت براث دارای، 0، 5، 10، 15 و 20 درصد نمک NaCl تهیه شد و جدایه‌های باکتری‌هایی که دارای توان تولید آنزیم ACCدآمیناز بودند به این محیط‌های کشت تلقیح شده و به مدت 72 ساعت در دمای 28 درجه سلسیوس با 120 دور در دقیقه شیک و گرماگذاری شدند. سپس رشد و عدم رشد جدایه‌ها به روش کدورت سنجی جهت تعیین محدوده رشد در غلظت‌های مختلف نمک اندازه‌گیری شد.

شناسایی جدایه‌های استفاده شده در گلخانه

برای شناسایی ابتدا جدایه های مورد نظر در محیط کشت نوترینت براث در دمای 28 درجه سلسیوس کشت داده شدند. سپس DNA ژنومی جدایه‌ها با استفاده از کیت جداسازی استخراج گردید. تکثیر 16S rDNA بر طبق شرایط توصیف شده توسط ادوارد و همکاران (1989) انجام گرفت. 16S rDNA با استفاده از پرایمرهای باکتریایی عمومی 27F (-'5 AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-'3) و 1520R (-'5 AAGGAGGTGATCCAGCCGCA -'3) تکثیر شد. فرایند PCR با 5 تا 25 نانوگرم DNA ژنومی، 100 نانوگرم از پرایمرها، 1/2 میکرولیتر از dNTP 10 میلی مولار، 1/5 میکرولیتر از کلرید منیزیم 10 میلی مولار، 1/5 میکرولیتر از بافر PCR (×10)، 0/3 میکرولیتر از Taq پلیمراز (1U/µl) و آب مقطر انجام گردید. حجم نهایی محلول PCR در لوله‌های PCR با استفاده از آب مقطر به 25 میکرولیتر رسانده شد. توالی ژن‌های 16S rRNA بعد از خالص‌سازی محصولات PCR با کیت خالص سازی (Promega, Madison, WI, USA) توسط دستگاه سنجنش توالی DNA با پرایمر 27F توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی تعیین شدند. تمام اطلاعات مربوط به توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA توسط نرم‌افزار Edit sequence (version 5.1) ویرایش گردید. توالی‌های نوکلئوتیدی تعیین شده در این مطالعه به پایگاه داده‌های GenBank ارسال شد و با شماره دسترسی‌های مختلف ثبت گردید.

آماده‌سازی مایه تلقیح

ابتدا جدایه‌های منتخب بر روی محیط نوترینت آگار رشد داده و جوان گردیدند. سپس کلونی‌های مجزای هر سویه در محیط نوترینت براث تلقیح و بر روی بهم زن دورانی با سرعت چرخش 120 دور در دقیقه درون گرمخانه با دمای 28 درجه سلسیوس به مدت 48 ساعت قرار داده شدند. برای یکسان کردن تراکم جدایه‌ها، جذب نوری حاصل از مایه تلقیح با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 600 نانومتر برابر یک تنظیم گردید.

آزمون گلخانه‌ای

آزمون گلخانه‌ای بصورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار روی گندم رقم افق (رقم مقاوم به شوری) که از موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر کرج تهیه شده بود انجام گرفت. فاکتورها شامل شوری در پنج سطح (1/3، 8، 12، 14، 16 دسی‌زیمنس بر متر) و باکتری در سه سطح (بدون باکتری (B0)، جدایه مقاوم به شوری و تولید کننده ACCدآمیناز (B1)، جدایه مقاوم به شوری و فاقد توان تولید ACCدآمیناز (B2)) بودند.

خاک مورد نیاز برای کشت گلدانی از منطقه کردان کرج، و به‌صورت نمونه مرکب از عمق 30-0 تهیه شد. برای رساندن شوری خاک‌ها به 8، 12، 14 و 16 دسی‌زیمنس بر متر در SAR 10، از سه نمک سدیم کلرید (NaCl)، منیزیم کلرید ($MgCl_2.6H_2O$) و کلسیم کلرید ($CaCl_2.2H_2O$) استفاده گردید. جهت کشت گیاه از گلدان‌های پلاستیکی با ارتفاع 19 و قطر دهانه 18 سانتی‌متر که با 4/5 کیلوگرم خاک هوا خشک عبور داده شده از الک چهار میلی‌متری پر شده بودند استفاده شد. اعمال تیمارهای شوری به خاک قبل از کشت گیاه صورت گرفت و بعد از رسیدن خاک گلدان‌ها به رطوبت مناسب (75 درصد ظرفیت زراعی) بذرها تلقیح و کشت شدند. جهت اعمال تیمارهای باکتری، مقداری خاک سطحی گلدان برداشته شد، سپس در هر گلدان 10 بذر گندم کشت و هر بذر با یک میلی‌لیتر از زادمایه جدایه باکتری مایه‌زنی و روی آنها با خاک پوشانده شد. پس از ظهور

گیاهچه‌های گندم، تعداد گیاهچه‌ها به پنج عدد در هر گلدان کاهش یافت. آبیاری گلدان‌ها در هفتهٔ اول هر دو روز یک بار و بعد از آن روزانه انجام گرفت. مقدار 66 میلی‌گرم کود اوره به ازای هرکیلوگرم خاک به همراه آب آبیاری و در دو مرحله به گلدان‌ها اضافه شد. همچنین مقدار 11 میلی‌گرم کود سکوسترین آهن 6 درصد به ازای هر کیلوگرم خاک در آب حل و به گلدان‌ها افزوده گردید. قبل از کشت نیز بر اساس آزمون خاک مقدار 6/7 میلی‌گرم سوپرفسفات تریپل به ازای هر کیلوگرم با خاک مخلوط گردید. گلدان‌های کشت شده در اتاقک رشد با دمای 20 تا 30 درجه سلسیوس و زمان روشنایی 12 ساعت با شدت نور 10000 لوکس نگهداری شدند.

پس از گذشت 70 روز از زمان کاشت، بخش هوایی در هر گلدان قطع و ریشه گیاهان نیز به دقت از خاک گلدان‌ها جدا گردید. پس از اندازه‌گیری ارتفاع گیاه، ابتدا بخش هوایی و ریشه نمونه‌های گیاهی به طور جداگانه به مدت 72 ساعت در دمای 65 درجه سانتی‌گراد خشک و سپس وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. نمونه‌های خشک شده توسط آسیاب پودر و پس از تهیه عصاره گیاهی میزان عناصر غذایی اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری فسفر از روش زرد (مولیبدووانادات) و با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل؛ UnicoTM 1100,USA)، کلسیم و منیزیم از روش کمپلکسومتری و سدیم و پتاسیم با دستگاه نورسنج شعله‌ای (فلیم فتومتری) مدل ELE اندازه‌گیری شد (اسپارک، 1996).

تجزیه‌های آماری

نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه شیمیایی و زیستی خاک‌های نمونه‌برداری شده نشان داد که محدوده شوری خاک‌ها بین 2/6 تا 7/2 دسی زیمنس بر متر قرار داشت. همچنین جمعیت باکتری و تنفس خاک به طور میانگین به ترتیب $2/2\times10^5$ و 0/92 ($mgCO_2g^{-1}w^{-1}$) و میانگین pH خاک‌ها 8/3 بود (جدول 1). در مجموع تعداد 167 جدایه باکتری از محیط کشت نوترینت آگار حاوی 5 درصد نمک که از نظر شکل ظاهری کلنی‌ها با هم تفاوت داشتند، جداسازی گردید.

از راهکارهای مفید برای مقابله با تنش شوری در گیاهان و کاهش آثار زیان‌بار آن معرفی باکتری‌های مقاوم به شوری است که بهبوددهندهٔ رشد گیاه نیز هستند. جداسازی ریزسازواره‌های بومی از خاک‌های تحت تأثیر تنش و غربالگری بر اساس تحمل به تنش و ویژگی‌های محرک رشد گیاه ممکن است در انتخاب سریع سویه‌های کارآمد مفید باشد که می‌تواند به‌عنوان تلقیح زیستی برای محصولات تحت تأثیر تنش استفاده شود (ثقفی و همکاران، 1398؛ شیرواستا و کومار، 2015).

توانایی جدایه‌ها در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن

از بین 167 جدایه که برای توانایشان در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن مورد آزمایش قرار گرفتند تنها شش جدایه دارای توان استفاده از ACC بودند. بر اساس نتایج، فعالیت جدایه‌های انتخاب شده در محدوده 47 تا 275 نانومول آلفاکتوبوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت قرار داشت (جدول 2). جدایه Z53 دارای بیشترین فعالیت ACC دآمیناز (275 نانومول آلفاکتوبوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت) و جدایه H41 دارای کمترین فعالیت (47 نانومول آلفاکتوبوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت) بود. مقدار فعالیت آنزیم ACCدآمیناز در جدایه‌های مورد مطالعه در حد نسبتا کم تا متوسط می‌باشد.

هر ریزسازواره‌ای که بتواند در محیط حداقل از نظر مواد غذایی از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کند به احتمال زیاد دارای ژن این آنزیم که بطور فعالی بیان می‌گردد، است. تحقیقات زیادی نشان دادند که توانایی استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن یک امتیاز در رقابت بهتر نسبت به باکتری فاقد این توانایی بوده است. در غربالگری باکتری‌های ریزوبیومی از نظر توان تولید این آنزیم در یک مطالعه‌ای مشخص شد که فقط پنج جدایه از 13 جدایه ریزوبیومی قادر به تولید این آنزیم بودند. همچنین جدایه ریزوبیومی فقط تا زمانی که درون گره‌ها هستند قادر به تولید این آنزیم می‌باشند (ما و همکاران، 2003).

جدول 1- برخی خصوصیات خاک‌های مورد استفاده برای جداسازی باکتری

نمونه خاک	EC ($dS\ m^{-1}$)	pH	تنفس ($mgCO_2\ g^{-1}\ w^{-1}$)	جمعیت میکروبی در 5% نمک (CFU)
H1	3/3	7/9	0/737	5×10^4
H2	4/1	8	0/89	9×10^3
H3	4/3	8/4	1/23	$2/1\times10^5$
H4	3/7	8/1	0/946	$5/6\times10^4$
H5	2/6	8/3	0/802	$1/3\times10^5$
H6	5/8	8/5	0/64	2×10^5
Z1	3	8	0/981	7×10^4
Z2	2/7	8/3	1/01	4×10^4
Z3	7/1	8/4	0/85	1×10^5
Z4	6	8/3	0/77	8×10^4
Z5	4/7	8/3	0/642	2×10^4
Z6	5/5	8/5	1/1	9×10^5
K1	4	8/1	0/65	1×10^5
K2	7/2	8/4	0/592	2×10^6
K3	5/4	8/3	0/952	4×10^4
K4	3/6	8/5	0/873	$2/1\times10^4$
K5	3/5	8/5	1/73	3×10^5
K6	2/9	8/2	0/95	2×10^3
K7	6/8	8/5	0/734	7×10^4
K8	6/2	8/5	1/3	5×10^4

H: استان همدان، Z: استان زنجان، K: استان کردستان

در مطالعه‌ای دیگر بر روی 233 جدایه از نظر توان تولید این آنزیم مشخص گردید که 27 جدایه توانایی تولید این آنزیم را داشتند (دوان و همکاران، 2009). گزارش شده است که از چهار سویه *P. fluorescens* Pf1، *P. fluorescens* Pf2، *P. fluorescens* TDK1 و *P. fluorescens* RMD1 تنها سویه TDK1 دارای فعالیت ACCدآمیناز بود و فعالیت این آنزیم را برای این سویه 342 نانومول آلفاکتوبوتیرات بر میلی‌گرم پروتئین در ساعت اندازه‌گیری کردند (ساراونکپور و سمیاپان، 2007). همچنین میزان فعالیت ACCدآمیناز را برای باکتری‌های تحمل کننده نمک *Brevibacterium iodinum*، *Bacillus licheniformis* و *Zhihengliuela alba* به ترتیب برابر 4/13 ، 3/06 و 1/38 میکرومول آلفا کتوبوتیرات در میلی-گرم پروتئین در ساعت گزارش کردند (سیداک و همکاران، 2011). حداقل فعالیت ACCدآمیناز برای اینکه یک باکتری به عنوان باکتری محرک رشد تلقی شود 20 نانومول آلفاکتوبوتیرات در میلی‌گرم پروتئین در ساعت است (پنروز و گلیک، 2003). باکتری دارای آنزیم ACCدآمیناز می‌توانند اثرات ناشی از تنش‌های مختلف از جمله تنش غرقابی، خشکی،شوری، فلزات سنگین، پاتوژن ها و غیره را بر روی گیاهان کاهش دهند (بلیموو و همکاران، 2002).

جدول 2- فعالیت آنزیم ACCدآمیناز جدایه‌ها

ردیف	جدایه	فعالیت ACC دآمیناز ($nmol\ \alpha KB\ mg^{-1}\ h^{-1}$)	ردیف	جدایه	فعالیت ACC دآمیناز ($nmol\ \alpha KB\ mg^{-1}\ h^{-1}$)
1	H41	47	4	Z53	275
2	H63	77	5	K78	253
3	Z57	98	6	K15	48

توان رشد جدایه‌های دارای توان تولید ACCدآمیناز در غلظت‌های مختلف NaCl

میزان رشد جدایه‌های تولید کننده آنزیم ACCدآمیناز در محیط کشت مایع با غلظت‌های مختلف NaCl در جدول 3 آورده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده جدایه K78 نسبت به بقیه جدایه‌ها رشد بیشتری در درصدهای بالاتر نمک داشت و جدایه H63 دارای کمترین رشد در درصدهای بالاتر نمک نسبت به سایر جدایه‌ها بود. در گزارشی بیان شده است که باکتری *P. trivialis* که از ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده می‌کرد، باعث افزایش تحمل به شوری و تحریک رشد ساقه و ریشه گیاه *goat's rue* در خاک شور شد (اگامبردیا و همکاران، 2013).

جدول 3- رشد جدایه‌های مولد ACC دآمیناز در غلظت‌های مختلف NaCl

OD در طول موج 600 نانومتر				
	درصد نمک NaCl			
جدایه	0	2/5	5	10
H41	1/056	0/721	0/086	0/012
H63	1/118	0/508	0/154	0/009
Z53	1/039	0/534	0/110	0/051
Z57	0/968	0/810	0/267	0/095
K15	0/038	0/760	0/520	0/024
K78	0/869	0/659	0/670	0/228

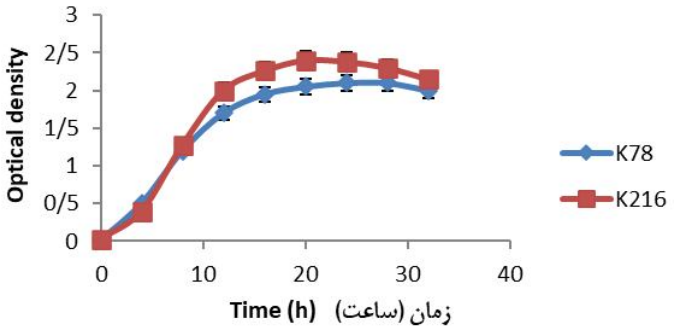
جدایه‌های مورد استفاده در آزمایش گلخانه‌ای

جدایه های مورد استفاده در آزمایش گلخانه ای

هدف از کشت گلخانه‌ای در این تحقیق بررسی تأثیر باکتری تولید کننده آنزیم ACCدآمیناز مقاوم به شوری در بهبود رشد گیاه گندم بود. برای این منظور لازم بود تأثیر جدایه با توانایی تولید آنزیم ACCدآمیناز با جدایه فاقد این صفت مقایسه شود؛ از این رو جدایه K78 به عنوان جدایه تولید کننده ACCدآمیناز (B1) جهت کشت گلخانه‌ای انتخاب شد. اگرچه این جدایه دارای فعالیت ACCدآمیناز کمتری نسبت به جدایه Z53 بود، ولی جدایه K78 دارای رشد بهتری در غلظت‌های بالاتر نمک، بود. همچنین جدایه K216 که فاقد توانایی تولید ACCدآمیناز بود (B2) به عنوان جدایه شاهد که از لحاظ دامنه رشد در غلظت‌های مختلف نمک و میزان تولید اکسین، به جدایه K78 شباهت بیشتری داشت جهت کشت گلخانه‌ای انتخاب گردید (تهیه شده از بانک ژن گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران) (جدول 4). در این تحقیق سعی شده است دو جدایه مورد مقایسه از لحاظ برخی صفات مانند دامنه رشد در نمک‌های مختلف و نیز میزان تولید اکسین تا حد ممکن به هم نزدیک باشند. هر دو جدایه K78 و k216 گرم مثبت و به شکل باسیل بودند و واکنش گرم جدایه‌ها (KOH) بررسی و گرم مثبت بودن جدایه‌ها تایید شد. نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16S rRNA نشان داد که جدایه K78 به میزان 100 درصد (KP067954) و جدایه K216 به میزان 98/06 درصد (MT614592) با سویه *Bacillus mojavensis* قرابت فیلوژنی داشتند. منحنی رشد دو جدایه منتخب در محیط نوترینت براث در شکل 2 آورده شده است.

جدول 4- مشخصات جدایه‌های منتخب جهت مطالعه گلخانه‌ای

جدایه	درصد نمک (OD جدایه‌ها در طول موج 600 نانومتر در 24 ساعت)				فعالیت ACCدآمیناز nmol α-ketobutyrate mg^{-1} h^{-1}	تولید اکسین ($\mu g\ m^{-l}$)
	0	2/5	5	10		
K78	0/869	0/659	0/670	0/168	253	0/96
K216	1/058	0/876	0/914	0/123	0	1/12



شکل 2- منحنی رشد دو جدایه منتخب در محیط نوترینت براث

نتایج آزمون گلخانه‌ای

نتایج بررسی‌های انجام‌شده بر روی نمونه خاک تهیه شده جهت انجام آزمون گلخانه‌ای در جدول 5 ارائه شده است. بر اساس نتایج ارائه شده بافت خاک شنی لومی و درصد ماده آلی خاک زیر یک درصد بود. همان‌طور که مشاهده می‌شود، خاک مورد مطالعه دارای هدایت الکتریکی 1/3 دسی‌زیمنس بر متر می‌باشد.

جدول 5- خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و زیستی خاک استفاده شده در آزمایش گلخانه‌ای

برخی خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی	مقادیر
قابلیت هدایت الکتریکی(dS/m)	1/3
pH	8/4
بافت خاک	شنی لومی
درصد حجمی رطوبت اشباع خاک (%SP)	46/5
رطوبت ظرفیت مزرعه (FC)	20
درصد ماده آلی	0/92
نیتروژن کل (%)	0/46
فسفر قابل جذب mg/kg	13/1
پتاسیم قابل استخراج با استات آمونیوم mg/kg	358
کلسیم meq/l	4/7
منیزیم meq/l	1/5
سدیم meq/l	1/4
آهن قابل استخراج با DTPA (mg/kg)	6/6
روی قابل استخراج با DTPA (mg/kg)	1/13
مس قابل استخراج با DTPA (mg/kg)	1/02
(cmol/kg) CEC	17/9
آهک(%)	7/3
تنفس (mg CO_2/g 24h)	0/83
تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلونی (cfu)	$3/6\times10^5$
تعداد واحدهای تشکیل دهنده کلونی در 5% NaCl (cfu)	8×10^3
MPN (محتمل‌ترین جمعیت باکتری)	$1/4\times10^6$
MPN در 5% NaCl	$1/33\times10^4$

براساس نتایج تجزیه واریانس اثر فاکتورهای شوری و باکتری در سطح یک درصد بر طول اندام هوایی و نسبت وزن ریشه به اندام هوایی معنی‌دار بود؛ اما اثرات متقابل آنها تأثیر معنی‌داری بر نسبت وزن ریشه به اندام

هوایی نداشت. همچنین شوری تأثیر معنی‌داری بر میزان عناصر غذایی گیاه داشت؛ به نحوی که درصد فسفر، پتاسیم، سدیم، کلسیم و منیزیم گیاه را در سطح یک درصد تحت تأثیر قرار داد. همچنین تلقیح گیاهان با زادمایه باکتری تاثیر معنی‌داری بر درصد پتاسیم و کلسیم گیاه به ترتیب در سطح یک درصد و پنج درصد داشت، اما تأثیر معنی‌داری بر درصد فسفر، سدیم و منیزیم نداشت. اثر متقابل باکتری و شوری برای میزان پتاسیم گیاه در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول 6).

جدول 6- تجزیه واریانس اثر فاکتورهای شوری و باکتری بر طول اندام هوایی و میزان کلروفیل

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		طول اندام هوایی	نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی	فسفر	پتاسیم	سدیم	کلسیم	منیزیم
شوری	4	1123/29**	0/00021**	0/039**	5/71**	2/08**	3/08**	0/31**
باکتری	2	154/57**	0/00023**	0/0002^{ns}	0/24**	0/003^{ns}	0/088*	0/002^{ns}
شوری و باکتری	8	36/49**	0/00004^{ns}	0/00001^{ns}	0/01*	0/001^{ns}	0/014^{ns}	0/0004^{ns}
خطا	30	1/42	0/00002	0/0004	0/05	0/006	0/017	0/001

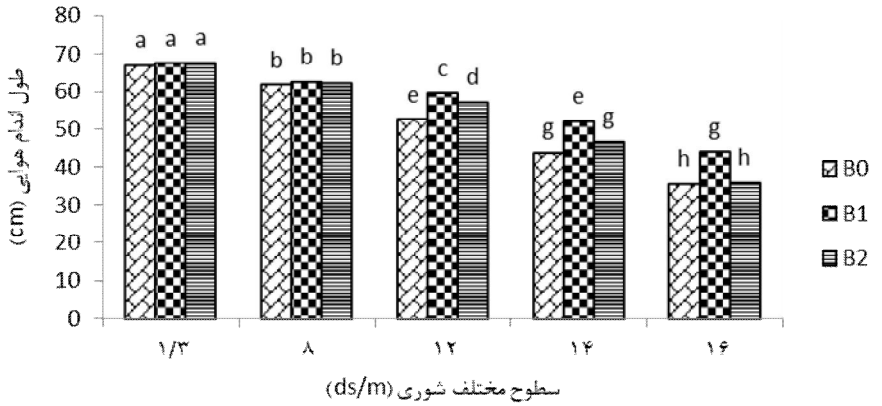
**: معنی‌دار در سطح یک درصد *: معنی‌دار در سطح پنج درصد و ns: فاقد اثر معنی‌دار

طول اندام هوایی و نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی

مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح مختلف شوری و باکتری‌های تیمار شده بر طول اندام هوایی در شکل 3 نشان داده شده است. شوری در تمامی سطوح تأثیر منفی و معنی‌داری بر طول اندام هوایی داشته است و موجب کاهش چشمگیر طول اندام هوایی بخصوص در سطوح بالای شوری شده است (شکل 2). کمترین کاهش طول اندام هوایی در شوری 8 دسی‌زیمنس بر متر (7/3 درصد) و بیشترین کاهش مربوط به شوری 16 دسی‌زیمنس بر متر (47/17 درصد) نسبت به تیمار بدون شوری بود. همچنین بر اساس مقایسه میانگین‌ها تلقیح جدایه K78 در سطوح شوری12 ،14 و 16 دسی‌زیمنس بر متر نسبت به تیمار شاهد (تیمار بدون تلقیح) معنی‌دار بوده و موجب افزایش طول اندام هوایی شد؛ بطوری که این جدایه بیشترین تاثیر را در شوری 16 دسی‌زیمنس بر متر داشت که باعث افزایش طول اندام هوایی به میزان 21/5 درصد نسبت به تیمار شاهد و تیمار تلقیح با جدایه K216 در این شوری شده است. همچنین تلقیح جدایه K216 در شوری 12 دسی‌زیمنس بر متر باعث افزایش معنی‌دار (8/7 درصد) در طول اندام هوایی نسبت به تیمار شاهد شده است. که احتمالاً مربوط به سایر خصوصیات محرک رشدی جدایه K216 است.

مطالعات گذشته نشان داده است که تحت تنش شوری و خشکی رشد گیاهان مخصوصاً ارتفاع آن‌ها با محدودیت شدید رو به رو می‌شود. تلقیح گیاهان به‌وسیله‌ی باکتری‌های محرک رشد گیاه تحت شرایط تنشی ارتفاع گیاه را افزایش می‌دهند (ساپره و همکاران، 2018). همچنین در یک پژوهش، لی و همکاران (2017) اظهار داشتند که تلقیح گیاه کلزا با باکتری *انتروباکتر کلوسا* سویه HSNJ4 که دارای توان تولید IAA و آنزیم ACCدآمیناز بود؛ موجب کاهش اثرات تنشی در هر سه سطح شوری صفر، 50 و 100 میلی مولار شد و در نهایت موجب افزایش وزن تر، طول ریشه و اندام هوایی گیاه گردید. در یک مطالعه‌ی گلدانی و تحت تنش شوری صفر و 100، 200 و 300 میلی مولار نمک سدیم کلرید، ویمال و همکاران (2019) نیز بیان نمودند که *کورتوباکتریوم آلبیدیوم* سویه SRV4 با مکانیسم‌های افزایش پرولین، اسمولیت‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، کارایی رنگیزه‌های فتوسنتزی و جذب پتاسیم اثرات تنش شوری را در برنج کاهش داده

و باعث بهبود شاخص پایداری غشا و شاخص‌های رشد گیاه از جمله ارتفاع گیاه شد.



شکل 3- تأثیر سطوح مختلف شوری و جدایه باکتری بر طول اندام هوایی گندم. B0: تیمار بدون باکتری، B1: تلقیح با جدایه K78، B2: تلقیح با جدایه K216. ستون‌های دارای یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد هستند

مقایسه میانگین اثر فاکتورهای شوری و باکتری بر نسبت وزن ریشه به اندام هوایی در جدول 7 نشان داده شده است. شوری باعث کاهش نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی شده است و این اثر کاهشی در شوری 12 دسی‌زیمنس بر متر معنی‌دار بود. کمترین میانگین نسبت وزن ریشه به اندام هوایی در شوری 12 دسی‌زیمنس بر متر (0/084) بود و با افزایش شوری از 12 دسی‌زیمنس بر متر این نسبت افزایش نشان داد. بر اساس مقایسه میانگین‌ها تلقیح گیاهان با جدایه K78 باعث افزایش معنی‌دار نسبت وزن ریشه به اندام هوایی نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین تلقیح جدایه K216 میانگین بیشتری نسبت به تیمار شاهد داشت. به نظر می‌رسد جدایه K78 و K216 که دارای توان تولید هورمون اکسین بوده و همچنین جدایه K78 که دارای فعالیت ACCدآمیناز بود موجب افزایش معنی‌دار نسبت وزن ریشه به اندام هوایی نسبت به تیمار بدون تلقیح باکتری شد.

جدول 7- بررسی اثرات ساده تیمار باکتری و شوری بر نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی و برخی عناصر در اندام هوایی گندم

تیمار باکتری	نسبت وزن خشک ریشه به اندام هوایی	فسفر	سدیم (%)	کلسیم	منیزیم
شاهد	0/088[b]	0/2[ns]	0/66[ns]	1/37[b]	0/41[ns]
K78	0/096[a]	0/21[ns]	0/67[ns]	1/47[a]	0/44[ns]
K216	0/092[a]	0/21[ns]	0/67[ns]	1/46[a]	0/43[ns]
تیمار شوری (ds/m)					
1/3	0/095[a]	0/277[a]	0/061[e]	0/55[d]	0/18[e]
8	0/095[a]	0/26[b]	0/27[d]	1/18[c]	0/33[d]
12	0/084[b]	0/22[c]	0/79[c]	1/62[b]	0/42[c]
14	0/093[a]	0/165[d]	1/04[b]	1/81[a]	0/52[b]
16	0/094[a]	0/125[e]	1/18[a]	1/98[a]	0/69[a]

* اعدادی که در هر ستون دارای یک حرف مشترک کوچک هستند، از لحاظ آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

در شرایط تنش شوری رشد ریشه‌ها در معرض آسیب بیشتری در مقایسه با اندام هوایی قرار می‌گیرد و در حضور غلظت‌های بالای نمک، ممکن است افزایش اتیلن ناشی از تنش، موجب اختلال در سوخت و ساز و فعالیت‌ها و فرآیندهای فیزیولوژیکی در ریشه‌ها نسبت به اندام هوایی شود (مایاک و همکاران، 2004). علاوه بر این

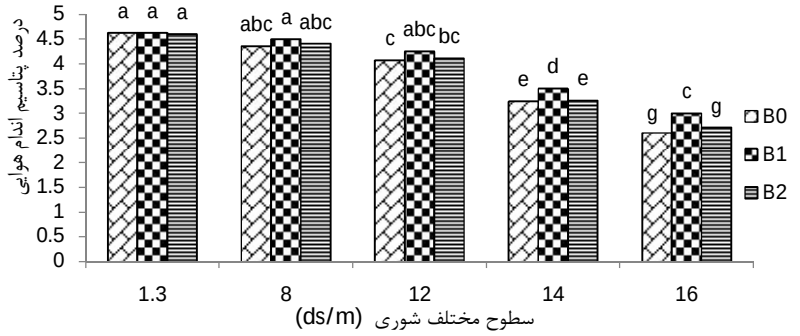
ممکن است به دلیل این‌که ریشه‌ها در تماس نزدیک با محلول نمک هستند نسبت به بخش هوایی که تماس کمتری با غلظت‌های بالای نمک دارد آسیب بیشتری ببیند. تلقیح گیاهان با باکتری‌های مولد ACCدآمیناز موجب افزایش توسعه ریشه در شرایط تنشی می‌شود که موجب توسعه بخش هوایی و افزایش وزن خشک گیاه می‌شود (سیداک و همکاران، 2011). کاربرد اتیلن و ACC در محیط ریشه سبب کاهش رشد ریشه می‌شود (مدهیان و همکاران، 2007). از طرف دیگر استفاده از مهار کننده‌های اتیلنی مانند AVG[1] رشد ریشه را بهبود می‌بخشد (مایاک و همکاران، 2004). علاوه بر این، باکتری‌های محرک رشد که در اثر جهش زایی فاقد توانایی تولید ACCدآمیناز شده‌اند، طول ریشه و وزن خشک را افزایش ندادند (مدهیان و همکاران، 2006). در حالی که تحمل به شوری در گیاهان کلزای تراریخته شده حاوی ژن ACCدآمیناز بهبود یافت (سرگوا و همکاران، 2006). غلظت ACC و اتیلن در ریشه‌ها به طور معمول نسبت به اندام هوایی بالاتر است که منجر به کاهش فعالیت‌های فیزیولوژیک و متابولیک و همچنین تخصیص بیشتر مواد فتوسنتزی به سمت ریشه‌ها می‌شود (سیداک و همکاران، 2011). بنابراین، بر اساس نتایج و گزارش‌های قبلی می‌توان نتیجه گرفت که باکتری‌های مولد ACCدآمیناز از طریق کاهش سطوح اتیلن تنشی باعث طویل شدن ریشه‌ها، بهبود رشد و افزایش ماده خشک گیاه تحت تنش شوری می‌شوند (دین و همکاران، 2019).

میزان عناصر غذایی در اندام هوایی گیاه

مقایسه میانگین‌ها بیانگر آن است که افزایش شوری باعث کاهش معنی‌دار درصد فسفر گیاه شده است و با افزایش شوری کاهش درصد فسفر اندام هوایی چشمگیر بود (جدول 7). تلقیح گندم با جدایه‌های باکتری تأثیر معنی‌داری بر افزایش درصد فسفر نداشت. مقایسه میانگین درصد پتاسیم در سطوح مختلف شوری نشان داد که شوری‌های بیشتر از 8 دسی‌زیمنس بر متر موجب کاهش معنی‌دار درصد پتاسیم گیاه شده است و این اثر کاهشی در سطوح بالاتر شوری چشمگیرتر بود. بطوریکه کمترین درصد پتاسیم گیاه در شوری 16 دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد. همچنین بر اساس نتایج، تیمار K78 بیشترین میانگین درصد پتاسیم گیاه را در سطوح شوری 8، 12، 14 و 16 دسی‌زیمنس بر متر نسبت به تیمارهای شاهد و K216 داشت و تأثیر آن در شوری‌های 14 و 16 دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب معادل 8 و 15/3 درصد بود (شکل 4). نتایج حاصل از مقایسه میانگین نشان داد که شوری تأثیر معنی‌داری در افزایش درصد سدیم در اندام هوایی گیاه داشت و افزایش شوری سبب افزایش درصد سدیم شده است. بطوریکه بیشترین مقدار سدیم گیاه مربوط به شوری 16 دسی‌زیمنس بر متر و کمترین میانگین مربوط به تیمار بدون شوری (1/3 دسی‌زیمنس بر متر) است. تلقیح هیچ کدام از جدایه‌ها اثر معنی‌داری بر درصد سدیم اندام هوایی نداشت (جدول 7). نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که در تمامی تیمارها با افزایش شوری درصد کلسیم اندام هوایی افزایش یافته است. بطوریکه بیشترین میانگین درصد کلسیم اندام هوایی مربوط به شوری 16 دسی‌زیمنس بر متر و کمترین میانگین آن مربوط به تیمار بدون شوری است. همچنین نتایج نشان داد که تلقیح جدایه‌های باکتری موجب افزایش معنی‌دار درصد کلسیم اندام هوایی شده است و بین دو جدایه باکتری در افزایش درصد کلسیم گیاه تفاوت معنی‌داری وجود ندارد. یکی از مکانیسم‌های اصلی جذب کلسیم، تماس ریشه‌ای است. می‌توان این افزایش جذب را به توسعه بیشتر ریشه‌ها در اثر تلقیح جدایه‌های باکتری در مقایسه با تیمار بدون تلقیح نسبت داد (جدول7). همچنین افزایش شوری باعث افزایش معنی‌دار درصد منیزیم اندام هوایی شد و با افزایش سطوح شوری تأثیر آن چشمگیرتر بود. همچنین تلقیح هر دو جدایه موجب افزایش درصد منیزیم گیاه نسبت به تیمار بدون تلقیح شد اگر چه این افزایش میانگین از نظر آماری معنی‌دار نبود. (جدول 7).

گزارش‌های متفاوتی در مطالعات مشابه انجام شده در بررسی تأثیر باکتری‌های مولد ACCدآمیناز وجود دارد. سیداک و همکاران (2011) بیان کردند اگرچه شوری اثرات سوءی بر جذب مواد غذایی از خاک دارد از طرف دیگر ممکن است با افزایش تولید اتیلن مهار کننده رشد ریشه‌ها، سبب ناکارآمدی ریشه‌ها در جذب مواد غذایی از خاک شود. با این وجود تلقیح باکتریای‌های تحمل کننده نمک *Bacillus licheniformis* و *Brevibacterium iodinum*، *Zhihengliuela alba*، مولد ACCدآمیناز تاثیر مثبتی در افزلیش جذب عناصر غذایی داشتند.

[1] Aminoethoxy Vinyl Glycine



شکل 4- تأثیر سطوح مختلف شوری و جدایه باکتری بر درصد پتاسیم اندام هوایی: B0: تیمار بدون تلقیح باکتری، B1: تیمار تلقیح با جدایه باکتری K78 (+ACC)، B2: تیمار تلقیح با جدایه باکتری K216 (ACC). ستون‌های دارای حاقل یک حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد هستند.

آنها گزارش کردند که این باکتری‌ها با توسعه ریشه و افزایش سطح جذب، منجر به افزایش جذب مواد غذایی از خاک شدند. مایاک و همکاران (2004) نیز نتایج مشابهی را گزارش کردند. در محیط‌های شور غلظت سدیم زیاد و به طور قابل توجهی بیشتر از پتاسیم است. بنابراین رقابت زیادی برای جذب این دو عنصر به وجود می‌آید و در غلظت‌های بالای سدیم جذب پتاسیم کم و تجمع زیاد سدیم در گیاه موجب بروز اثرات سمی می‌شود (سگیب و همکاران، 2000). همچنین سیداک و همکاران (2011) گزارش کردند، که تلقیح جدایه‌های مذکور موجب افزایش مقدار سدیم و پتاسیم در گوجه فرنگی شد و نیز مقدار سدیم در شوری‌های بالا نسبت به تیمار بدون تلقیح کاهش یافت. از طرفی مایاک و همکاران (2004) گزارش کردند که تلقیح باکتری‌های مولد ACCدآمیناز تاثیری در کاهش مقدار سدیم در شوری‌های بالا نداشته است.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، با استفاده از چندین مرحله آزمون و مقایسه جدایه‌ها، یک باکتری متعلق به گونه *باسیلوس موجاونسیس* از ریزوسفر گندم جداسازی شد که ویژگی‌های مناسبی برای حضور در شرایط شور داشت. این جدایه توانست اثرات منفی تنش شوری را بر گیاه گندم در شرایط گلخانه‌ای کاهش دهد و این امر با مکانیسم‌هایی مانند افزایش طول گیاه، وزن ریشه و اندام هوایی و بهبود جذب عناصر غذایی در اندام هوایی محقق شد. به علاوه، پاسخ‌های گیاه به تلقیح با جدایه K78 نشان داد که این جدایه پتانسیل استفاده به عنوان PGPR برای افزایش رشد و شرایط تغذیه‌ای گندم را تحت تنش شوری دارد. با این حال، پژوهش‌های بیشتری لازم است تا کارایی این جدایه تحت تنش‌های مختلف و شرایط مزرعه‌ای نیز مشخص شود.

فهرست منابع:

1. اخگر ع.، خاوازی ک.، خاکی‌پور ن. (1390). جداسازی، شناسایی و بررسی کارآیی باکتری های ریزوسفری دارای توان تولید آنزیم ACC دآمیناز در کاهش اثرات تنش شوری بر رشد کلزا. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)، جلد 25، شماره 1: 29-41.
2. ثقفی ک.، احمدی ج.، اصغرزاده ا.، رکنی‌زاده ح.، حسینی‌مزینانی س م. (1398). جداسازی، شناسایی و بررسی ویژگی‌های محرک رشدی *سودوموناس‌های فلورسنت* از ریزوسفر درختان زیتون در خاک‌های شور. زیست شناسی خاک، 7جلد 7، شماره 1: 13-27.

3. Avalbaev, A.M., Bezhorkov, M.V., Kildibekova, A.R. and Fatkutdinova, R.A. 2009. Wheat germagglutinin restores cell division and growth of wheat seedlings under salinity. Journal of Plant Physiology,1:257-263.
4. Belimov, A.A., Safronova, V.I. and Tetsuro, M. 2002. Response of spring rape (*Brassica napus* var. *oleifera* L.) to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant. Canadian journal of microbiology, 48(3):189-199.
5. Din, B.U., Sarfraz, S., Xia, Y., Kamran, M.A., Javed, M.T., Sultan, T., Munis, M.F.H. and Chaudhary, H.J. 2019. Mechanistic elucidation of germination potential and growth of wheat inoculated with exopolysaccharide and ACC- deaminase producing *Bacillus* strains under induced salinity stress. Ecotoxicology and Environmental Safety, 183:1-10.
6. Duan, J., Müller, K.M., Charles, T.C., Vesely, S. and Glick, B.R. 2009. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in Rhizobia from southern Saskatchewan. Microbial Ecology, 57:423-436.
7. Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M. and Böttger, E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research, 17(19):7843-7853.
8. Egamberdieva, D., Berg, G., Lindström, K. and Räsänen, L. A. 2013. Alleviation of salt stress of symbiotic *Galega officinalis* L. (*goat's rue*) by co-inoculation of Rhizobium with root-colonizing *Pseudomonas*. Plant and soil, 369:453-465.
9. Glick, B.R. 2004. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. Advances in Applied Microbiology, 56:291-312.
10. Glick, B.R. 2005. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiology Letters, 25:1-7.
11. 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.
12. Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J. and McConkey, B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Critical Reviews in Plant Sciences, 26:227-242.
13. Grover, G., Ali, S.K.Z., Sandhya, V., Rasul, A. and Venkateswarlu, B. 2011. Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(5):1231-1240.
14. Johnson, L.F. and Curl, E.A. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess Publishing Company, Minneapolis, MN.
15. Klassen, S. and Bugbi, B. 2000. Differential sensitivity of crops to ethylene and interaction with elevated CO_2. Life support and biosphere science, 7:23-83.
16. Li, H., Lei, P., Pang, X., Li, S., Xu, H., Xu, Z. and Feng, X. 2017. Enhanced tolerance to salt stress in canola (*Brassica napus* L.) seedlings inoculated with the halotolerant *Enterobacter cloacae* HSNJ4. Applied Soil Ecology, 119:26-34
17. 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.
18. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S. and Sa, T. 2007. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Methylobacterium oryzae* and interactions with auxins and ACC regulation of ethylene in canola (*Brassica campestris*). Planta, 226(4):867-876.
19. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Ryu, J. and Sa, T. 2006. Regulation of ethylene levels in canola (*Brassica campestris*) by 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-containing *Methylobacterium fujisawaense*. Planta, 224(2):268-278.

20. Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 42:565-572.
21. Penrose, D.M. and Glick, B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum, 118(1):10-15.
22. Sapre, S., Gontia-Mishra, I. and Tiwari, S. 2018. Klebsiella sp. confers enhanced tolerance to salinity and plant growth promotion in oat seedlings (*Avena sativa*). Microbiological Research, 206:25-3.
23. Saqib, M., Akhtar, J., Qureshi, R.H. Aslam, M. and Nawaz, S. 2000. Effect of salinity and sodicity on growth and ionic relations of different wheat genotypes. Pakistan Journal of Soil Science, 18:99-104.
24. Saravanakumar, D. and Samiyappan, R. 2007. ACC deaminase from Pseudomonas fluorescens mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. Journal of Applied Microbiology, 102:1283-1292.
25. Sergeeva, E., Saleh, Sh. and Glick, B.R. 2006. Growth of transgenic canola (*Brassica napus* cv. *Westar*) expressing a bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene on high concentrations of salt. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22(3):277-282.
26. Shrivastava, P., and Kumar, R. 2015. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi journal of biological sciences, 22(2):123-131.
27. Siddikee, M.A., Glick, B.R., Chauhan, P.S., Yim, W.J. and Sa, T. 2011. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. Plant Physiology and Biochemistry, 49(4):427-434.
28. Sparks, D.L. 1996. Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods, Soil Science Society of American, Inc. American Society of Agronomy, Inc, Madison Wisconsin, USA.
29. Vimal, S.R., Patel, V.K. and Singh, J.S. 2019. Plant growth promoting *Curtobacterium albidum* strain SRV4: An agriculturally important microbe to alleviate salinity stress in paddy plants. Ecological Indicators, 105:553-562.

Effect of ACC deaminase-producing bacteria and soil salinity on growth and nutritional indices of wheat

A. A. Pourbabaee[1], E. Bahmani, H. A. Alikhani, and S. Emami
Associate professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran;
E-mail: pourbabaei@ut.ac.ir
MSC student, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran;
E-mail: bahmani.ebrahim@yahoo.com
Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran;
E-mail: halikhan@ut.ac.ir
PhD graduated, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tehran;
E-mail: emamisomaye@ut.ac.ir
Received: February, 2020 & Accepted: Ocober, 2020

Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria with ACC deaminase activity can be applied for stimulating plant growth under tension situations. In the present study, bacterial isolates were isolated from wheat rhizosphere in three provinces of Zanjan, Kurdistan and Hamedan and then screened for ACC deaminase production and salinity tolerance. Six isolates out of 167 isolates were able to degrade ACC to alpha-keto-butyrate and ammonia and the K78 isolate was selected as superior isolate. A completely randomized design with factorial arrangement was carried out on wheat plant in a greenhouse experiment. Experimental factors include: five salinity levels (1.3, 8, 12, 14, and 16 $dS.m^{-1}$), three bacterial inoculation levels (no inoculation (B0), inoculation with salinity-resistant isolate and ACC deaminase production capacity (B1), inoculation with salinity-resistant isolate without ACC deaminase production capacity (B2). The results showed that salinity had a significant and negative effects on growth and nutrient uptake and decreased shoot length. The K78 isolate increased shoot length (21.5 %) and potassium uptake (15 %) significantly compare to B0 treatment but had no significant effect on sodium uptake. Overall, it can be concluded that inoculation of K78 isolate can reduce the negative effects of salinity on growth indices and the nutritional conditions of wheat.

Keywords: *Bacillus*, Sodium, Environmental stress, PGPR

[1] Corresponding author: Karaj, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Soil Science Department.