

## بررسی تأثیر تلقیح سویه‌های سودوموناس فلورسنت دارای توان تولید ACC و IAA دآمیناز بر رشد نهال‌های پسته

گلنار حسنی<sup>۱\*</sup>، عبدالرضا اخگر و احمد تاج‌آبادی‌پور

دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ golnar\_hasani@yahoo.com

استادیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ arakhgar@yahoo.com

دانشیار گروه علوم خاک دانشگاه ولی عصر رفسنجان؛ ahtajabadi@yahoo.com.au

### چکیده

این تحقیق با هدف بررسی توان سویه‌های دارای توانایی تولید اکسین و ACC دآمیناز، در افزایش رشد نهال‌های پسته انجام گرفت. بدین منظور از ریزوسفر نهال‌های پسته، تعداد ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت جداسازی و خالص‌سازی گردید. شناسایی گونه این جدایه‌ها بر اساس نتایج آزمون‌های میکروسکوپی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی انجام شد و نتایج نشان داد که ۴۹ جدایه متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* بودند و سه تا از جدایه‌ها به صورت *Pseudomonas sp.* گزارش گردیدند. سپس جدایه‌ها از نظر توان تولید IAA و ACC دآمیناز مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس توانایی جدایه‌ها در تولید مقادیر مختلف IAA و ACC دآمیناز، تعداد ۶ جدایه از میان ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت انتخاب و در یک آزمون گلخانه‌ای تأثیر سویه‌ها بر مورفولوژی ریشه و شاخص‌های رشد نهال‌های پسته مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که کاربرد اکثر سویه‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد برگ، سطح برگ، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی نهال‌های پسته گردید.

واژه‌های کلیدی: اکسین، مورفولوژی ریشه، شاخص‌های رشد نهال‌های پسته

### مقدمه

یا ممانعت از اثرات مضر عوامل بیمارگر گیاهی) موجب افزایش رشد گیاه شوند (گللیک، ۱۹۹۵). ترشح هورمون‌های گیاهی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های تحریک‌کننده رشد گیاه است (زهیر و همکاران، ۲۰۰۴). هورمون‌های گیاهی به شدت بر رشد و توسعه گیاهان مؤثرند و از میان آنها اکسین‌ها از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد می‌باشند (استپانوا و همکاران، ۲۰۰۹). اکسین‌ها گروهی از هورمون‌های گیاهی هستند که معمول‌ترین و شناخته شده‌ترین آنها

در دهه‌های اخیر، استفاده از باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)<sup>۲</sup> به‌منظور بهبود و افزایش رشد گیاهان در سطح وسیعی افزایش یافته است. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه گروهی از باکتری‌های ریزوسفری مفید می‌باشند که می‌توانند به‌طور مستقیم (تثبیت نیتروژن، حل‌کردن فسفات‌های نامحلول، تأمین آهن از طریق تولید سیدروفورها، تولید هورمون‌های گیاهی چون اکسین‌ها و ... و کاهش اتیلن تنشی) و یا غیرمستقیم (کاهش

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، میدان ۲۲ بهمن، بلوار ولایت، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، گروه علوم خاک،

صندوق پستی: ۵۱۸

\* دریافت: آذر ۱۳۹۰ و پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۱

<sup>۲</sup> Plant Growth Promoting Rhizobacteria

این‌دول-۳-استیک‌اسید (IAA) است.

اتیلن در رشد و توسعه‌ی گیاه و رسیدگی میوه اهمیت زیادی دارد با این حال افزایش غلظت اتیلن باعث کاهش رشد ریشه و متعاقباً کاهش جذب آب و عناصر غذایی و در نهایت منجر به کاهش رشد گیاه می‌گردد (ابلس و همکاران، ۱۹۹۲). باکتری‌های دارای آنزیم ACC دامیناز از طریق کاهش سطح اتیلن موجب افزایش طول ریشه و رشد گیاه می‌شوند (احمد و همکاران، ۲۰۰۸). در خصوص توانایی سودوموناس‌های فلورسنت در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و به عبارت دیگر تولید آنزیم ACC دامیناز گزارشات متعددی ارائه شده است (ونگ و همکاران، ۲۰۰۰؛ پنروز و گلیک، ۲۰۰۳).

جلیلی و همکاران (۱۳۸۸) سودوموناس‌های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC دامیناز و تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی ارقام کلزا در سطوح مختلف شوری را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سویه‌ها متفاوت بود. همچنین نتایج بررسی ارقام کلزای تلقیح شده با سویه‌های منتخب نشان داد که میزان جوانه‌زنی در جدایه‌هایی که دارای فعالیت ACC دامیناز بودند نسبت به شاهد و نیز نسبت به جدایه‌های فاقد این ویژگی در شرایط شور به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. شاهو همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که سویه‌های *Entrobacter cloacae* و *Pseudomonas putida* به دلیل داشتن آنزیم ACC دامیناز و کاهش سطح اتیلن گیاهی، طول ریشه گیاه کلزا را افزایش دادند. تلقیح باکتری‌های ریزوسفری جداسازی شده از ریزوسفر گیاه نخود که قادر به مصرف ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن بودند باعث افزایش طول ریشه، تعداد و طول ریشه‌های فرعی و بیوماس ریشه گیاه نخود در مقایسه با شاهد شد (شاهزاد و همکاران، ۲۰۱۰). پال و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که از ۲۳۰ سویه دارای آنزیم ACC دامیناز ۹ سویه توانستند طول ریشه بادم زمینی را در حد معنی‌داری افزایش دهند که در بین این ۹ سویه ۶ سویه متعلق به گروه سودوموناس‌های فلورسنت بود. با توجه به تحقیقات انجام شده که تماماً نقش مثبت باکتری‌های دارای توان تولید IAA و آنزیم ACC دامیناز را در افزایش رشد گیاه نشان می‌دهند و همچنین لزوم استفاده از راهکارهای بیولوژیک به‌منظور جلوگیری از کاربرد بی‌رویه کودهای شیمیایی، برنامه این تحقیق طراحی شد.

### مواد و روش‌ها

#### جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت

به‌منظور جداسازی باکتری‌های ریزوسفری نهال-های پسته، تعداد ۱۰ نمونه خاک به‌صورت تصادفی از مناطق پسته‌خیز شهرستان رفسنجان از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری در محدوده‌ی سایه‌انداز درخت انتخاب گردید.

IAA از طریق متابولیسم ال-تریپتوفان به‌عنوان پیش ماده توسط گیاهان و خیلی از میکروارگانیسم‌های خاک از قبیل باکتری‌ها، قارچ‌ها و جلبک‌ها تولید می‌شود (سارور و کرمر، ۱۹۹۵). از میان میکروارگانیسم‌های محرک رشد گیاه که توانایی تولید IAA را دارند می‌توان به ازتوباکتر، سودوموناس، آزوسپریلوم، ریزوبیوم، باسیلوس، انتروباکتر و قارچ‌های مایکوریزی اشاره کرد (پتن و گلیک، ۱۹۹۶). غلظت‌های بالای اکسین توسط سودوموناس‌های فلورسنت یک خصوصیت بارز برای اکثر این باکتری‌ها است (احمد و همکاران، ۲۰۰۵). پتن و گلیک (۲۰۰۲) با انجام یک آزمایش، مقایسه‌ای بین بذره‌های کلزا تلقیح شده با باکتری سودوموناس پوتیدا GR12-2 قادر به تولید اکسین و بذره‌های تلقیح شده با موتانتی که فاقد توانایی تولید اکسین بود مشاهده کردند که ریشه‌های اولیه حاصل از بذره‌های تیمارشده با سویه‌ی وحشی GR12-2 به‌طور متوسط ۵۰-۳۵ درصد بلندتر از بذره‌های تیمارشده با باکتری موتانت و تیمار تلقیح نشده (شاهد) بودند و طول ریشه‌های حاصل از بذره‌های تلقیح شده با موتانت با طول‌ریشه‌های حاصل از بذره‌های شاهد تفاوتی نداشت. پیوندی و همکاران (۲۰۱۰) تشکیل ریشه و ساختار ریشه‌ی نهال‌های زیتون تلقیح شده یا نشده با دو سویه‌ی سودوموناس فلورسنت (P21, P19) را با اندازه‌گیری طول و تعداد ریشه‌های فرعی مورد ارزیابی قرار دادند. در این آزمایش جمعیت‌های متفاوتی از باکتری (۰ و ۱۰۵ و ۱۰۸ باکتری در میلی‌لیتر) به‌عنوان تیمار استفاده گردید و در تراکم جمعیت ۱۰۸ باکتری در میلی‌لیتر تقریباً دو برابر افزایش در تعداد و طول ریشه‌ها نسبت به تراکم جمعیت ۱۰۵ باکتری در میلی‌لیتر مشاهده شد. عرب و همکاران (۱۳۸۷) مشاهده کردند کاربرد باکتری آزوسپریلوم دارای توان تولید اکسین به گیاه ذرت شیرین اثر معنی‌داری بر وزن تر و خشک ریشه، وزن اندام هوایی و نیز میزان جذب نیتروژن و فسفر داشت. در این تحقیق افزایش سطح و وزن خشک ریشه در مقایسه با شاهد و در نتیجه افزایش جذب مواد غذایی، یکی از دلایل افزایش عملکرد گیاهان تلقیح شده در نظر گرفته شد. کارنوال (۲۰۰۹) ۳۰ جدایه‌ی سودوموناس فلورسنت (۱۵ جدایه P. aeruginosa و ۱۵ جدایه P. fluorescens) را از ریزوسفر گیاهان مختلف جداسازی کرد. در بین جدایه‌های مورد آزمایش، دو جدایه *Pseudomonas fluorescens* AK1 و *Pseudomonas aeruginosa* Ak2 بیشترین افزایش رشد گیاه را نشان دادند.

<sup>1</sup> L-Tryptophan

تریپتوفان منتقل و برای ۷۲ ساعت تکان داده شد. پس از گذشت این مدت سوسپانسیون‌های مذکور سانتریفیوژ گردیدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴ میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر  $6H_2O$ ,  $FeCl_3 \cdot 0.5M$ ) مخلوط گردید. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید اکسین توسط هر جدایه از مقایسه‌ی جذب نور آن با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در لیتر از ایندول استیک اسید محاسبه گردید.

#### تعیین توانایی جدایه‌ها در استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن

برای انتخاب جدایه‌های قادر به استفاده از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن از روش دل‌آمیگو و همکاران (۲۰۰۵) با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور ابتدا هر جدایه در محیط TSB کشت داده شد. پس از کشت مجدد هر جدایه در TSB مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تازه‌ی هر جدایه به ۲۰ میلی‌لیتر از محیط حداقل DF، محیط DF حاوی ۳ میلی‌مولار ACC و محیط DF حاوی ۲ گرم در لیتر سولفات آمونیوم منتقل و به مدت ۴۸ ساعت رویشیکر تکان داده شد. در آخر دانسیته نوری (OD) این محیط‌ها به عنوان معیاری از رشد باکتری در آن محیط، در طول موج ۴۰۵ نانومتر به وسیله‌ی دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

#### آزمون گلخانه‌ای

بر اساس توانایی جدایه‌ها در تولید مقادیر مختلف IAA و توان مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن، تعداد ۶ جدایه از میان ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت انتخاب و در یک آزمون گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی (با ۷ سطح باکتری شامل ۶ تیمار باکتری و یک تیمار بدون باکتری به عنوان شاهد) در بستر شن شسته شده با اسید و استریل شده، درون تیوب‌هایی به قطر ۳ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر، در ۴ تکرار مورد استفاده قرار گرفتند. در این آزمون از بذریه پسته رقم بادامی زرنندی استفاده شد. بذریه‌های پسته پس از جداسازی پوست سخت، جهت ضدعفونی سطحی ۱۰ دقیقه در محلول ۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم قرار داده شدند. به منظور حذف هیپوکلریت سدیم، بذرها ۸ تا ۱۰ بار با آب مقطر استریل شسته و به مدت ۲۴ ساعت در یک ظرف سر بسته استریل خیس‌انده شدند. آنگاه بذرها جهت جوانه‌دار شدن بر روی واتر-آگار قرار داده و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس به

نمونه‌های خاک پس از هواخشک کردن، کوبیدن و الک کردن به ۱۰ گلدان ۳ کیلوگرمی منتقل گردیدند. بذریه‌های پسته (رقم بادامی زرنندی) پس از جداسازی پوست سخت و ضدعفونی سطحی به مدت ۲۴ ساعت در یک لیتر آب مقطر استریل نگهداری شدند. برای جوانه‌دار کردن، بذرها بر روی واتر-آگار در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و درون انکوباتور نگهداری شدند. در هر گلدان تعداد ۶ بذر جوانه‌دار شده کشت و گلدان‌ها برای مدت دو ماه در شرایط گلخانه نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت ریشه نهال‌های پسته از خاک خارج و ۱۰ گرم از خاک ریزوسفری به همراه ریشه به منظور جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت به آزمایشگاه منتقل گردید. برای تشخیص و جداسازی باکتری‌های سودوموناس فلورسنت پس از تهیه سری رقت، از هر یک از رقت‌ها درون پلیت‌های حاوی King B پخش گردید. پلیت‌های حاوی کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت King B در معرض نور UV قرار داده شدند و از کلنی‌های دارای خاصیت فلورسنت در رقت‌های بالا و به‌طور تصادفی تعداد ۵۲ جدایه انتخاب و پس از اطمینان کامل از خلوص جدایه‌ها تا زمان استفاده، بر روی محیط کشت شیب‌دار و درون یخچال نگهداری شدند.

#### شناسایی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

در انتخاب باکتری‌های مورد نظر از کلنی‌های دارای خاصیت فلورسنت تعداد ۵۲ کلنی باکتری از پلیت‌های حاصل از رقت‌های بالای خاک ریزوسفری نهال‌های پسته به صورت تصادفی برداشته و خالص‌سازی شدند. به منظور تعیین گونه این جدایه‌ها از آزمون‌های پیشنهاد شده توسط بوسیسی و همکاران (۲۰۰۰) استفاده شد. به این منظور بر روی تمامی جدایه‌ها، آزمون‌های گرم، تحرک جدایه‌ها، آرژنین دی‌هیدرولاز، اکسیداز، کاتالاز، رشد در دمای ۴ و ۴۱ درجه سلسیوس، ذوب ژلاتین، توان استفاده از قندهای ترهالوز و آرابینوز، تولید لوآن و احیای نیترات انجام گرفت.

#### اندازه‌گیری میزان تولید IAA جدایه‌ها

بدین منظور از روش بنت و همکاران (۲۰۰۱) با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط TSB<sup>۱</sup> (هر لیتر شامل ۱۷ گرم پپتون کازئین، ۳ گرم پپتون سویا، ۵ گرم NaCl، ۲/۵ گرم  $K_2HPO_4$  و ۲/۵ گرم دکستروز) کشت داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر یک از جدایه‌ها مجدداً به ۲۰ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی  $50 \mu\text{g/ml}$  ال-

1. Water Agar

2. Trypton Soya Bean

مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور نگهداری شدند. در هر تیوب یک بذر پسته جوانه‌دار شده کشت شد. هنگام کاشت بذرها، هر بذر با یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری مورد نظر تلفیح گردید و سپس رطوبت خاک تیوب‌ها به حد ظرفیت زراعی رسانده شدند. در طول دوره رشد از محلول غذایی هوگلند (هوگلند و آرنون، ۱۹۵۰). به منظور تأمین عناصر غذایی مورد نیاز نهال‌های پسته استفاده گردید. پس از گذشت ۲۰ روز از کشت، ابتدا بخش هوایی نهال‌ها از محل طوقه قطع، سپس طول اندام هوایی و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. آنگاه برگ‌ها از ساقه جدا و وزن تر، تعداد و سطح برگ‌های نهال‌های پسته در هر تیوب اندازه‌گیری شد. پس از آن خاک هر تیوب به همراه ریشه‌ی داخل آن در ظرفی پر از آب به آرامی برگردانده و شن اطراف ریشه با دقت جدا گردید. سپس ضمن بررسی مورفولوژی ریشه‌ها و عکس‌برداری، وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. در آخر هر یک از نمونه‌ها در آون در دمای ۷۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و برگ، ساقه و ریشه‌های خشک شده نهال‌ها به‌طور جداگانه توزین گردید.

#### تجزیه‌های آماری

تجزیه واریانس کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار - SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

#### نتایج

##### شناسایی جدایه‌های سودوموناس فلورسنت

وجه تمایز سودوموناس‌های فلورسنت از سایر سودوموناس‌ها، تولید پیگمان‌هایی است که در برابر نور فرابنفش خاصیت فلورسنت دارند. با توجه به نتایج آزمون‌های تعیین گونه، همه‌ی جدایه‌ها به جزء جدایه‌های ۲۶، ۴۱ و ۴۶ در گونه *Pseudomonas fluorescens* قرار گرفتند. جدایه‌های مذکور به دلیل عدم تطابق نتایج با مندرجات کتاب Bergey، به صورت *Pseudomonas sp.* گزارش شدند.

##### اندازه‌گیری توانایی جدایه‌ها در تولید IAA و مصرف ACC

نتایج حاصل از آزمون تولید IAA جدایه‌های مورد مطالعه در محیط TSB حاوی ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر ال-تریپتوفان نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید IAA بودند و در دامنه‌ای از ۰/۶۸ تا ۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر تغییر می‌کرد. بیشترین مقدار تولید IAA مربوط به جدایه‌های ۳۹ و ۴۰ با مقادیر به ترتیب ۷/۵ و ۷/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و کمترین آن مربوط به جدایه ۱۵ با مقدار ۰/۶۸ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. خاکی‌پور و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیقی ۵۰ سویه‌ی سودوموناس

فلورسنت را از نظر ترشح ترکیبات اکسین مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند. آنها مشاهده کردند که ۷۸٪ سویه‌ها قادر به تولید IAA بودند. مقدار IAA تولید شده توسط سویه‌های سودوموناس فلورسنتس از ۰ تا ۳۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر و مقدار تولید شده توسط سودوموناس پوتیلیا از ۰ تا ۲۴/۰۸ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بود. نتایج بررسی جدایه‌ها از نظر توان مصرف ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن نشان داد که از میان ۵۲ جدایه سودوموناس فلورسنت، تعداد ۳۲ جدایه (۶۸٪) قادر به استفاده از ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن بودند. بیشترین مقدار دانسیته نوری در سوسپانسیون‌های باکتریایی رشد کرده در محیط DF+ACC مربوط به جدایه‌های ۳۳، ۴۸، ۳۶، ۳۸، ۳۷، ۳۴، ۳۱، ۳۹، ۴۰ و ۴۲ بود و کمترین آن متعلق به سوسپانسیون جدایه‌های ۲۲، ۱۱، ۲۶، ۴۶ و ۲۴ بود. هم‌چنین هیچ‌کدام از جدایه‌های مورد آزمایش قادر به رشد در محیط DF فاقد منبع نیتروژنی نبودند. جدایه‌های ۲۶ و ۴۶ نیز در محیط DF+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> با وجود منبع نیتروژن رشد نکردند. اخگر و همکاران (۱۳۸۷) گزارش کردند از میان ۱۰۵ جدایه جدا شده از خاک ریزوسفری کلزا، ۱۵ جدایه دارای توان تولید ACC دامیناز بودند. شناسایی این جدایه‌ها نشان داد که تمامی جدایه‌ها در گروه سودوموناس‌های فلورسنت قرار می‌گرفتند و آزمون‌های مربوط به تعیین گونه نیز نشان داد که ۱۴ جدایه متعلق به گونه *P. fluorescens* بودند. هم‌چنین اندازه‌گیری فعالیت آنزیم ACC دامیناز جدایه‌ها نشان داد که فعالیت این آنزیم در جدایه‌های مورد آزمایش متفاوت بوده و از ۱/۴۳ تا ۸/۱۷ میکرومول آلفاکتو بوتیرات بر میلی‌گرم در ساعت متغیر بود. عباس‌زاده و همکاران (۲۰۱۰) ۴۰ سویه سودوموناس فلورسنتس و سودوموناس پوتیلیا جداسازی شده از ریزوسفر گندم و کلزا را مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی نشان داده شد که چهار سویه *Pseudomonas* (WP159، WP150، WP1) و *fluorescens* (CFU10) قادر به رشد در محیط DF حاوی ACC هستند.

مقادیر IAA و دانسیته نوری سوسپانسیون‌های حاصل از رشد جدایه‌های منتخب در سه محیط DF، DF+ACC و DF+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> در جدول ۱ ارائه شده‌است.

##### بررسی تأثیر سویه‌های دارای توان تولید IAA و مصرف

##### ACC بر رشد نهال‌های پسته در شرایط استریل

نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد که کاربرد اکثر سویه‌های مورد آزمایش به‌طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد برگ، سطح برگ، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی نهال‌های پسته گردید. همان‌طور که در شکل ۱ ملاحظه

سویه‌های مورد آزمایش توانستند طول ریشه‌ی اصلی و تراکم ریشه‌های جانبی نهال‌های پسته را افزایش دهند (شکل ۵).

افزایش رشد ریشه یکی از مهم‌ترین معیارها برای سنجش اثرات مفید باکتری‌های محرک رشد گیاه است. توسعه سریع ریشه‌ها چه از طریق افزایش طول ریشه‌های ابتدایی و چه با تکثیر ریشه‌های جانبی و نابجا، یک راه مناسب برای گیاهچه‌های جوان است که توانایی خود را برای استقرار در خاک و جذب مواد غذایی افزایش دهند (پتن و گلیک، ۲۰۰۲). آکان (۱۹۸۵) برای اولین بار اکسین را به‌عنوان عامل مؤثر افزایش تراکم تارهای کشنده و ریشه‌های جانبی گیاهان گزارش نمود. هم‌چنین نشان داده شده است که باکتری‌های PGPR دارای توانایی تولید IAA، باعث طویل شدن و تکثیر سلول‌های گیاهی می‌شوند (کلوپر، ۲۰۰۳).

پال و سارما (۲۰۰۶) اثر تلقیح ۵ سویه سودوموناس فلورسنس دارای توانایی تولیدهورمون‌های محرک رشد از قبیل IAA و GA را بر فلفل سیاه مورد بررسی قرار دادند. در این بررسی نشان داده شد که کاربرد باکتری به‌طور معنی‌داری وزن خشک ریشه (۱۳۵-۳۰ درصد)، طول ریشه (۱۲۷-۱۲ درصد)، سطح ریشه (۲۰۰-۴۳ درصد) و تعداد ریشه (۱۳۷-۸۲ درصد) را افزایش داد. گراول و همکاران (۲۰۰۷) افزایش طول ریشه، وزن تر ریشه و اندام هوایی نهال‌های گوجه‌فرنگی را در اثر تلقیح با باکتری‌های *Pseudomonas putida* و *Trichoderma atroviride* دارای توانایی تولید IAA بودند را گزارش کردند. باکتری‌های دارای آنزیم ACC دآمیناز از طریق کاهش سطح اتیلن موجب افزایش طول ریشه و رشد گیاه می‌شوند (احمد و همکاران، ۲۰۰۸). اخگر و خاوازی (۱۳۸۸) به‌منظور بررسی نقش آنزیم ACC دآمیناز باکتریایی در کاهش اثرات منفی شوری بر رشد کلزا، یک سویه *Pseudomonas fluorescens* P12 دارای توان تولید ACC دآمیناز را با سویه موتانت آن Pm12 مقایسه کردند. نتایج نشان داد که سویه تیپ وحشی توانست هم در شرایط شور و هم در شرایط غیرشور کلیه شاخص‌های رشد کلزا شامل وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، طول اندام هوایی و مقدار سبزی‌نگی برگ را نسبت به سویه موتانت به‌طور معنی‌داری افزایش دهد. در این آزمون با توجه به اینکه تمام سویه‌های مورد آزمایش توانایی مصرف ACC و تولید IAA را داشتند و از طرف دیگر تمامی سویه‌ها متعلق به گروه سودوموناس‌های فلورسنت و فاقد توانایی تثبیت نیتروژن بودند و هم‌چنین بستر نهال‌های پسته، شن شسته شده با اسید و فاقد هر گونه منبع نامحلول

می‌شود تعداد برگ گیاهان تیمار شده با سویه‌های مورد آزمون نسبت به شاهد (B) افزایش نشان داده است و به جزء تیمار با سویه P21 بقیه تیمارها از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را با شاهد نشان می‌دهند. گیاهان تیمار شده با سویه‌های P50، P31 و P29 بیشترین افزایش را در تعداد برگ نسبت به شاهد نشان دادند و تعداد برگ نهال‌های پسته را به ترتیب به مقدار ۲۴٪، ۲۱٪ و ۲۱٪ نسبت به شاهد افزایش دادند. هم‌چنین نتایج نشان داد به جزء سویه P40، تمامی سویه‌ها به‌طور معنی‌داری سطح برگ نهال‌های پسته را تا ۷۱٪ نسبت به شاهد افزایش دادند (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، وزن تر اندام هوایی نهال‌های پسته در تیمار با تمامی سویه‌ها به جزء سویه P40 نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان می‌دهد. سویه‌های باکتری وزن تر اندام هوایی نهال‌های پسته را تا ۴۲٪ نسبت به شاهد افزایش دادند. هم‌چنین سویه‌های مورد آزمایش وزن خشک اندام هوایی گیاهان تیمار شده را نسبت به شاهد افزایش دادند لیکن این افزایش برای اکثر تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار نبود و در بین سویه‌های مورد آزمایش تنها دو سویه P21 و P29 توانستند وزن خشک اندام هوایی را به‌طور معنی‌داری و به ترتیب به مقدار ۵۳٪ و ۵۰٪ نسبت به شاهد افزایش دهند (شکل ۴).

همان‌طور که ملاحظه می‌شود سویه P40 در تمام شاخص‌های رشد به جزء تعداد برگ اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان نداد و کمترین تأثیر را بر شاخص‌های رشد نهال‌های پسته داشت. با توجه به اینکه سویه P40 دارای توانایی تولید مقدار زیاد IAA است به نظر می‌رسد که غلظت زیاد IAA باعث ایجاد اثرات متقابل بین اکسین و ACC شده و کاهش رشد گیاه را به‌دنبال داشته است. بین آنزیم ACC دآمیناز و هورمون گیاهی اکسین اثرات متقابلی وجود دارد، به این صورت که IAA سنتز شده توسط باکتری‌ها، در صورتی که باعث افزایش مقدار IAA درون بافت‌های ریشه به مقدار بهینه شود، قادر خواهد بود با افزایش تقسیم و تمایز سلولی رشد گیاه را افزایش دهد. اما چنانچه IAA باکتریایی مقدار IAA درون بافت‌های ریشه را به بیش از حد مورد نیاز خود افزایش دهد ممکن است با تحریک فعالیت آنزیم ACC سنتتاز و افزایش میزان ACC پس از جوانه‌زنی بذر، رشد و توسعه‌ی سیستم ریشه‌ای گیاه میزبان را متوقف کند (گلیک و همکاران، ۱۹۹۸). هم‌چنین اگرچه بین وزن تر و خشک ریشه نهال‌های پسته تیمار شده با سویه‌های مورد آزمایش با شاهد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد لیکن بررسی مورفولوژی ریشه نهال‌های پسته نشان داد که اکثر

ریزوسفر نهال‌های پسته، *Pseudomonas fluorescens* گونه غالب بود. هم‌چنین نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد که سویه‌های منتخب که از ویژگی توان تولید IAA و مصرف ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن برخوردار بودند، توانستند شاخص‌های رشد (اندام هوایی و ریشه) نهال‌های پسته را افزایش دهند. از آنجائیکه این سویه‌ها متعلق به گروه سودوموناس‌های فلورسنت هستند و به صورت غیراختصاصی عمل می‌کنند لذا امید است که با به‌کارگیری این سویه‌ها به شکل کود زیستی در گیاه پسته و سایر گیاهان به ویژه گیاهان زراعی بتوان شاهد افزایش رشد و محصول این‌گونه گیاهان نیز باشیم.

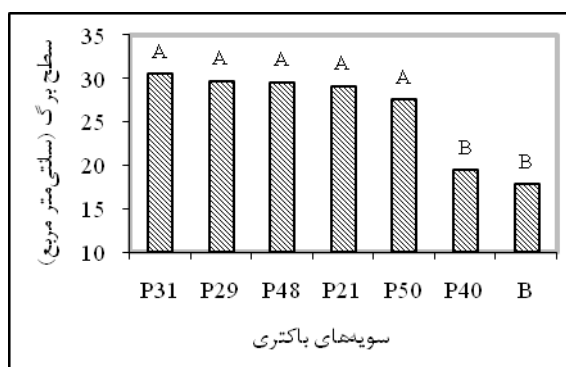
عناصر غذایی پرمصرف و کم مصرف بود. لذا افزایش رشد نهال‌های پسته را نمی‌توان به خصوصیتی چون توانایی تولید سیدروفور و یا انحلال فسفات‌های معدنی که باعث افزایش حلالیت و قابلیت دسترسی عناصر غذایی به‌ویژه فسفر و آهن می‌شود نسبت داد. از این رو به نظر می‌رسد سویه‌های مورد آزمایش از طریق افزایش رشد ریشه به‌ویژه افزایش ریشه‌های جانبی و تارهای کشنده و در نتیجه افزایش سطح جذب باعث افزایش رشد نهال‌های پسته شده باشند.

### نتیجه‌گیری کلی

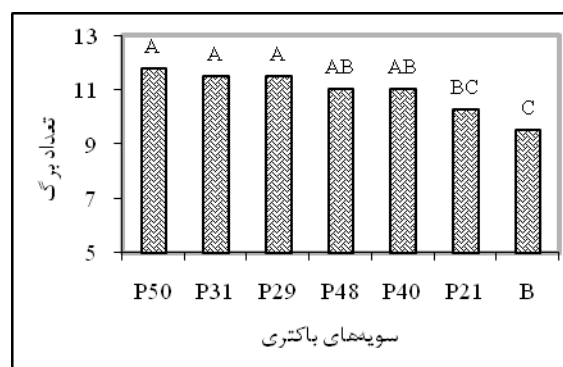
نتایج حاصل از شناسایی نشان داد که در بین باکتری‌های سودوموناس فلورسنت جداسازی شده از

جدول ۱- مقادیر IAA و دانسیته نوری سوسپانسیون‌های حاصل از رشد جدایه‌های منتخب در سه محیط DF+(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> و DF+ACC، DF

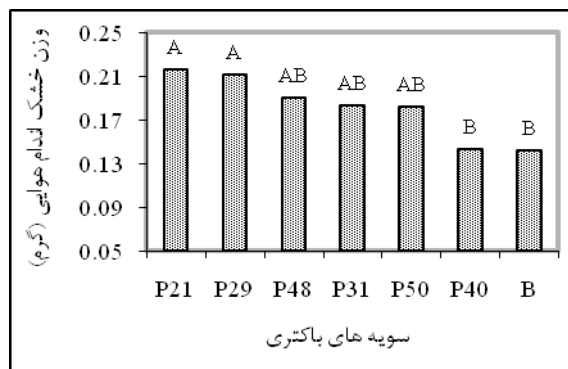
جدایه	DF	DF+ACC	DF+(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	IAA (µg ml <sup>-1</sup> )
P21	۰/۱۱۵	۱/۵۳۳	۲/۳۷۳	۲/۱۲
P29	۰/۱۵۹	۱/۶۱۱	۲/۰۱۵	۵/۰۶
P31	۰/۱۳۴	۱/۸۱۸	۲/۳۳۰	۲/۷۰
P48	۰/۳۲۸	۱/۹۰۶	۱/۹۴۳	۳/۶۸
P50	۰/۳۳۱	۱/۶۹۰	۲/۳۳۴	۱/۴۲



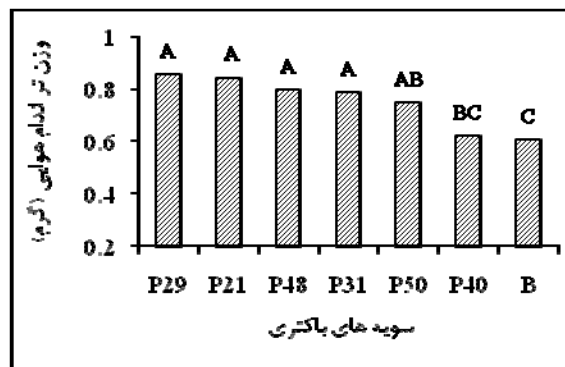
شکل ۲- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر سطح برگ



شکل ۱- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر تعداد برگ



شکل ۴- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بروزن خشک اندام هوایی



شکل ۳- تأثیر کاربرد تیمارهای باکتری بر وزن تر اندام هوایی



Blank

P21

شکل ۵- مورفولوژی ریشه پسته تیمار شده با باکتری P21 و شاهد بدون تلقیح

### فهرست منابع:

۱. اخگر، ع. ر. و ک. خاوازی. ۱۳۸۸. نقش آنزیم ACC دامیناز باکتریایی در کاهش اثرات منفی شوری بر رشد کلزا. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). ۱۵۶-۱۵۴: (۱)۲۴.
۲. اخگر، ع. ر.، ن. صالح راستین، ک. خاوازی و ع. ر. شعرای نجاتی. ۱۳۸۷. جداسازی، شناسایی و تعیین فعالیت آنزیم ACC Deaminase باکتری‌های غالب ریزوسفر کلزا در خاک‌های شور. مجله علوم خاک و آب. ۸۱-۶۹: (۱)۲۲.
۳. جلیلی، ف.، ک. خاوازی، ا. پذیرا، ع. ر. نجاتی و ه. اسدی رحمانی. ۱۳۸۸. تأثیر سودوموناس‌های فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase در تعدیل اثرات مضر شوری بر کلزا در مرحله جوانه زنی. مجله پژوهش‌های خاک (علوم خاک و آب). ۹۱-۱۰۶: (۱)۲۳.
۴. عرب، س. م.، غ. اکبری، ح. علیخانی، م. ح. ارزانش و ا. ا. دادی. ۱۳۸۷. بررسی توانایی تولید اکسین توسط باکتری جداسازی شده بومی جنس آزوسپیریوم و ارزیابی اثرات محرک رشدی جدایه برتر بر گیاه ذرت شیرین. مجله پژوهش‌های زراعی ایران. ۲۱۷-۲۲۲: (۶)۲.

5. Abbas- Zadeh, P., N. Saleh- Rastin, H. Asadi- Rahmani, K. Khavazi, A. Soltani, A. R. Shoary- Nejati, and M. Niransari. 2010. Plant growth, promoting activities of fluorescent *Pseudomonads* isolated from the Iranian soils. *Actaphysoil.plant.* 32: 281-288.
6. Abeles, F. B., D. W. Morgan, and M. E. Saltvit Jr. 1992. *Ethylene in plant Biology.* 2nded, Acadmeic Press. New York.
7. Ahmad, F., I. Ahmad, and M. Sahir Khan. 2005. Indole acetic acid production by indigenous isolates of azotobacter and fluorescent *Pseudomonas* in the presence and absence of tryptophan. *Turk. J. Boil.* 29:29-34.
8. Ahmad, F., I. Ahmad, and M. S. Khan. 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activities. *Microbiol. Res.* 163:173-181.
9. Benet, E., S. Tuzan, C. P. Chanway, and S. Enebak. 2001. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 47:793-800.
10. 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. J.* 20:51-63.
11. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-Living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.
12. Glick, B. R., D. M. Penrose and J. Li. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* 190:63-68.
13. Gravel, V., A. Hani, and R. J. Tewddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39:1968-1977.
14. Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. College of Agriculture, Univ of Cal Berkeley, Cal. Circular 347.
15. Karnwal, A. 2009. Production of Indoleacetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice-root exudates. *J. Plant Pathol.* 91:61-63.
16. Khakipour, N., K. Khavazi, H. Majallali, E. Pazira, and H. Asadirahmani. 2008. Production of Auxin Hormone by fluorescent *Pseudomonas*. *American-Eurasion J. Agric. Environ. Sci.* 4(6):678-692.
17. Kloeppe, J. W. 2003. A review of mechanisms for plant growth promoting by PGPR. Auburn University, Auburn, Alabama 36849. USA.
18. Okon, Y. 1985. *Azospirillum* as potential inoculant for agriculture. *Trends Biotech.* 3:223-228.
19. Pal, K. K., R. Dey, D. M. Bhatt, and S. M. Chauhan. 2001. National research center for groundnut, ivnagair road, PB. No 5, Junagadh-36, Gujarat, India.
20. Patten, C. L., and B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of IAA. *Can. J. Microbiol.* 42:207-220.
21. Patten, C. L., and B. R. Glick. 2002. Role of *Pseudomonas putida* Indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:3795-3801.
22. Paul, D., and Y. R. Sarma. 2006. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-mediated root proliferation in black pepper (*Piper nigrum* L.) as evidenced through GS Root Software. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 39:1-4.
23. 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.



24. Peyvandi, M., F. Farahani, M. HosseiniMazinani, Z. Noormohamadi, S. Ataii, and A. Asgharzade. 2010. *Pseudomonas* fluorescent and its ability to promote root formation of olive microshoots. *J. Plant Prod.* 4:63-66.
25. Sarwer, M., and R. J. Kremer. 1995. Determination of bacterially derived auxins using a microplate method. *Lett. Appl. Microbiol.* 147:282-285.
26. Shah, S., J. Li, B. A. Moffat, 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.
27. Shahzad, S. M., A. Khalid, M. Archad, J. Tahir, and T. Mahmood. 2010. Improving nodulation, growth and yield of *Cicerarietinum* L. through bacterial ACC- deaminase induced changes in root architecture. *Europ. J. Soil Biol.* 46:342-347.
28. Stepanova, A. N., J. Robertson-Hoyt, J. Yun, L. M. Benavente, D. Y. Xie, K. Dolezal, S. G. Jurgens, and J. M. Alonso. 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133:177-191.
29. Wang, C., E. Knill, B. R. Glick, and G. Defago. 2000. Effect of transferring 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase genes into *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO and its *gacA* derivative CHA96 on their growth promoting and disease-suppressive capacities. *Can. J. Microbiol.* 46:898-907.
30. Zahir, Z. A., M. Arshad, and W. T. Frankenberger. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: Application and perspectives in agriculture. *Adv. Agron.* 81:97-167.