بررسی توان تولید آنزیم ACC – دآمیناز در سویه های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران

عاطفه رمضانیان، حسینعلی علیخانی، ناهید صالح راستین و امیر لکزیان

به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی خاک، استادیار و دانشیار دانشکده کشاورزی تهران و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی

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 (چگالی نسبی آن ۰/۹۷۸) و قابل حل در آب می باشد. در اواخر قرن نوزدهم، محقق روسی به نام دیمیت نلجوبوف در یافت 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 نقش دارد. از اولین اثرات شناخته شده اتیلن در گیاه ، نقش این هورمون در رسیدگی میوه ها است. مشخص شده است که اتیلن از طویل شدن سلولهای ریشه و ساقه گیاه جلوگیری می کند (۳) و نیز اتیلن از آلودگی به وسیله باکتری و گره زایی در بسیاری از لگوم ها ممانعت می کند (۱۴). 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 به وسیله سلولها) گره زایی در یونجه و نخود بهبود یافته است(۸). آنزیمUACC-deaminase ، میکروارگانیزمهای دارنده آن را قادر می سازد تا با تجزیه ACC به آمونیوم و ترکیبی دیگر به نام آلفا- کتوبوتیرات از این ماده به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کنند. پژوهشهای پیشین نشان می دهند که باکتریهای ریزوبیومی که به سطح ریشه 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 (۴). در ادامه 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 (۱۱). 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 سوءاتیلن استرسی روی رشد گیاه که بر اثر آلودگی با فلزات سنگین , بیمارگرهای گیاهی و یا حالت غرقاب ایجاد می شود , مقاومت کنند (۱۵ ، ۶ و۱۵).

در این پژوهش , ۱۰۰ جدایه از گونه های مختلف ریزوبیومی بومی خاکهای ایران برای بررسی توان تولید آنزیم ACC – دآمیناز آزمون شدند. امید است که در پژوهش های بعدی از سویه های برتر آن برای تولید مایه تلقیح محرک رشد گیاه استفاده کرد.

مواد و روش‌ها

نحوه آماده کردن باکتریها

ابتدا سویه های ریزوبیومی خالص شده، در لوله های آزمایش محتوی ۸ میلی لیتر محیط غذایی TY (Tryptone Yeast) کشت داده شدند. این لوله‌ها در دمای ۲۸°C بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ rpm رشد داده شدند. سپس جمعیت باکتریها در تمام لوله ها به تعداد تقریباً ۳×۱۰^۹ سلول در هر میلی لیتر (بر اساس روش مک فارلند) یکسان شود(۲). یک میلی لیتر از این محیط کشت به وسیله پی پت استریل برداشته شده , داخل لوله های اپندورف ریخته و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت g ×۱۱۰۰۰ سانتریفوژ گردید تا باکتری ها کاملاً ته نشین شدند. سپس برای اطمینان از خروج کامل محیط کشت از اطراف باکتری ها، با محلول کلرید سدیم ۰/۸۵٪ ، دو بار شستشو شده و در مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول کلرید سدیم ۰/۸۵٪ سوسپانسیون شدند. از این سوسپانسیون برای کشت روی پلیتهای آزمون ACC استفاده شد.

آزمون نیمه کمی توان تولید آنزیم ACC – دآمیناز :

این آزمون بر اساس روش پیشنهادی پنروز و گلیک (۲۰۰۳) انجام شده است(۱۲). محیط کشت مخصوص این آزمون محیط RMM (Rhizobial Minimal Medium) می باشد. در این آزمون از سه سری ظروف پتری ۱۲ سانتی متری استفاده می شود:

۱- ظروف ACC : ظروف پتری حاوی محیط کشت RMM که به سطح هرکدام از آنها ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ACC (۰/۳ مولار) به عنوان تنها منبع نیتروژن اضافه شده است. ۲- ظروف پتری حاوی محیط کشت RMM که به سطح آنها ۱۵۰ میکرولیتر از محلول NH_4Cl (۰/۳ مولار) به عنوان تنها منبع نیتروژنی اضافه شده است. این سری از ظروف به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شده اند(P.C.). ۳- ظروف پتری که تنها حاوی محیط کشت RMM هستند و هیچ گونه منبع نیتروژن به آنها اضافه نشده است، این سری از پلیت ها شاهد منفی به حساب می آیند(N.C.) .

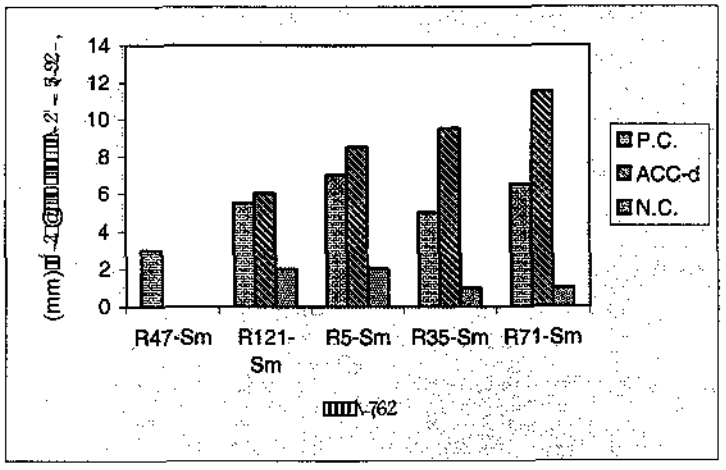
پشت هر ظرف یک شبکه به صورت جدول با ۱۶ خانه رسم و شماره گذاری شده و هر دو خانه جدول به یک جدایه ریزوبیومی اختصاص داده شد و تلقیح گردید. در هر سری کار , تلقیح هر سه ظرف پتری به وسیله هشت جدایه ریزوبیومی در یک زمان واحد انجام شد و در هر خانه مقدار مشخص ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری قرار گرفت تا قطر اولیه همه کلونی ها یکسان باشد. ظروف تلقیح شده به مدت ۱۰ روز در انکوباتور با دمای ۲۸° C خوابانیده شده و در روزهای چهارم، هفتم و دهم پس از تلقیح , قطر کلونیهای رشد یافته در مقایسه با شاهد مثبت و شاهد منفی اندازه گیری گردید.

نتایج و بحث

توانایی تولید آنزیم ACC – دآمیناز یکی از جنبه های مهم تحریک رشد گیاه توسط باکتریهای PGPR به حساب می آید که در سالهای اخیر مورد شناسایی و توجه قرار گرفته است. این آنزیم موجب کاهش غلظت اتیلن در گیاه شده و اثرات سوء ناشی از زیاد بودن اتیلن در گیاه را تقلیل می دهد. آنزیم ACC – دآمیناز در بسیاری از باکتریهای محرک رشد گیاه , همچنین بعضی قارچها و مخمرها یافت شده است(۷ و ۱۳). توانایی تولید آنزیم ACC – دآمیناز توسط باکتریهای ریزوبیومی توسط ما و همکاران گزارش شده است(۹). نتایج حاصل از اندازه گیری توان تولید آنزیم ACC– دآمیناز بر روی سویه های ریزوبیومی بومی خاکهای ایران نشان می دهد که این باکتری ها نیز توانایی تولید آنزیم مذکور را دارند. از ۱۰۰ جدایه آزمون شده، تعداد ۸۱ جدایه قادر به تولید آنزیم ACC – دآمیناز بوده و ۵ جدایه به عنوان سویه برترشناسایی و معرفی می شوند. نتایج در جدول (۱) و شکل (۱) آمده است.

جدول (۱) فراوانی سویه های ریزوبیومی تولیدکننده آنزیم ACC – دآمیناز

گروههای مختلف ریزوبیومی			فراوانی سویه های ACC+	
نام گروه (جنس–گونه–بیووار)		تعداد سویه	تعداد	درصد
R. leguminosarum	bv.phaseoli (Rlp)	۱۵	۷	۴۶/۶
	bv.viciae (Rlv)	۱۵	۸	۵۳/۳
	جمع	۳۰	۱۵	۵۰
Sinorhizobium meliloti (Sm)		۶۱	۴۵	۷۳/۷
Mesorhizobium ciceri (Mc)		۶	۳	۵۰
Bradyrhizobium spp.(Bsp)		۳	۳	۱۰۰
جمع کل		۱۰۰	۸۱	۸۱



شکل (۱) توان رشد سویه های ریزوبیومی بر روی محیط حاوی ACC در مقایسه با تیمارهای شاهد منفی (N.C.) وشاهد مثبت (P.C.)

منابع مورد استفاده

1- Burd, G.I. 2000. Plant growth-promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol, 46: 237-245.

2- Cappuccino James G. and N. Sherman. 1987. Microbiology, a laboratory manual, second ed. Benjamin/Cummings Publishing Company.

3-Davies, P.J. 1990. Plant hormones and their role in plant growth and development.Kluwer Academic Publishers.

4- Glick B.R. 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 B.R. Glick. 2001. Amelioration flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. Plant Physiol. Biochem. 39: 11-17.

6- Hall. 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. 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. 2003. Prevalence of ACC deaminase in Rhizobium spp. Antonie van Leeuwenhoek, 83:285-291.
10- Nukui N. 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 - Penrose D.M. and B.R. Glick. 2001. Levels of ACC in exudates and extracts of Canola seeds treated with plant growth-promoting bacteria. Can. J. Microbiol,.47: 368-372.
12- 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.
13- Shah S. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 44: 833-843.
14- Spaink H.P. 1997. Ethylene as a regulator of Rhizobium infection. Trends Plant Sci. 2:203-204.
15- Wang C. et al. 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.