بررسی توان تولید ACC دآمیناز و HCN توسط جدایه های *Azospirillum*

محمد حسین ارزانش[۱]، حسینعلی علیخانی[۲] ، کاظم خاوازی[۳] ، حشمت الله رحیمیان[۴]

[۱]استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، [۲]استادیار گروه مهندسی علوم خاک- دانشکده مهندسی آب و خاک - پردیس کشاورزی و منابع طبیعی ، [۳]استادیار پژوهشی موسسه خاک و آب، [۴]استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات خاک و آب و استادگروه گیاهپزشکی – مجتمع آموزشی دانشگاه مازندران

مقدمه

Azospirillum باکتری محرک رشدریزوسفری است که می تواند باعث افزایش رشد در گونه های مختلفی از گیاهان همچون غلات ، چمن ، علف های هرز ، گیاهان یک ساله ، چند ساله شود. جدایه هایی که قادر به تولید **ACC** دآمیناز نباشند ، نمی توانند سطح اتیلن را در گیاهانی که در معرض تنش های اتیلنی قرار دارند ، کاهش دهد. حضور و وجود ژن تولید کننده **ACC**- دآمیناز در جنس ***Azospirillum*** مورد تردید است. اما ، در صورتی که جدایه ای واجد این ژن باشد یا به طریقی این ژن وارد ***Azospirillum*** گردد می تواند بسیار مفید باشد . به طور مثال در آزمایشی که توسط **Holguin** و **Glick** (۲۰۰۱) انجام شد ژن ساختمانی تولید کننده **ACC** - دآمیناز (***acdS***) از باکتری ***Entrobacter cloacae* UW4** با استفاده از پلازمید **pRK415** به به دوسویه از گونه ***Azospirillum brasilense* Cd** و ***A. brasilense* Sp245** کلون شد. هردوی این سویه ها فعالیت **ACC** - دآمینازی را همانند ***Entrobacter cloacae* UW4** نشان دادند. بیان این ژن باعث بهبود ویژگی **PGPR** آن گردید، به طوری که ریشه های گوجه فرنگی وکلزای تلقیح شده با این سویه به طور معنی داری ریشه های بلندتری از گیاهان تلقیح شده با سویه های فاقد این ژن داشتند. در زمینه توانایی تولید **HCN** توسط باکتری ***Azospirillum*** گزارشات بسیار محدودی وجود دارد. در ایران نیز عرب و همکاران (۱۳۸۴) نشان دادند که این باکتری توانایی کمی در سنتز **HCN** دارد . لذا در این تحقیق این دو ویژگی در جدایه های ***Azospirillum*** مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش ها

برای تعین توان کیفی تولید **HCN** از روش پیشنهادی لورک (۱۹۴۸)، اصلاح شده توسط آلستروم (۱۹۸۷) و از محیط کشت **RC** در شرایط با و بدون گلایسین استفاده شد. برای هر جدایه سه تشتک پتری (سه تکرار) حاوی محیط کشت **RC** و سه تشتک پتری محیط کشت **RC** گلایسین‌دار (۴/۴ گرم در لیتر) با جدایه های خالص شدهٔ آزوسپیریلوم ، به صورت گسترده تلقیح شدند . توان تولید **HCN** با توجه به میزان تغییر رنگ کاغذ معرف درون هر پلیت، در دو زمان ۷ و ۱۴ روز پس از کشت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

برای آزمون کمی توان تولید **ACC- deaminase** از روش **Amico** و همکاران(۲۰۰۵) با انجام یک سری تغییرات استفاده شد. محیط کشت **NFB** حاوی ۱۰ میکرولیتر محلول ۰/۳ مولار **ACC** ، محیط کشت **NFB** به علاوه ۱۰۰ میکرولیتر از محلول۰/۳ مولار **NH_4Cl** به عنوان منبع نیتروژنی (شاهد مثبت) و محیط کشت **NFB** بدون منبع نیتروژنی (شاهد منفی) استفاده گردید. ارلن ها با ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه های مختلف تلقیح شدند. میزان کدورت بعد از ۴۸ ساعت در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید. جدایه (های) با **O.D** بالاتر به عنوان جدایه (ها) دارای فعالیت آنزیم **ACC**- دآمیناز بیشتر در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

بررسی توان تولید **ACC** – دآمیناز نشان داد که در کل از ۲۹ جدایه انتخابی در این مرحله تنها ۶/۹ در صد از جدایه ها واجد ژن **ACC**- دآمیناز *بودند*. در بررسی **Holguin**و **Glick** (۲۰۰۱) نیز نشان داده شده است که آنزیم **-**

ACC دآمیناز فقط در مقدار بسیار کم و در زمانی که مواد غذایی بسیار ناچیزبوده و منبع انرژی نیز اندک باشد می تواند توسط ***A.brasilense Cd*** سنتز می شود. سلطانی و همکاران (۱۳۸۴)نیز گزارش کردند که از ۲۵ جدایه سودوموناس فلورسنت تنها ۹ جدایه قادر به استفاده از **ACC** به عنوان منبع کربنی ونیتروژنی بودند. تمام این شواهد نشان دهنده این است که باکتری ***Azospirillum*** از لحاظ تولید **ACC** – دآمیناز ضعیف است اما ، در صورت داشتن یا وجود جدایه با توانایی بالا در امر تولید **ACC** – دآمیناز این باکتری می تواند در شرایط دشوار محیطی وتنش های اتیلنی بسیار مفید باشد. از لحاظ توانایی تولید هیدروژن سیانید از ۲۵ جدایه ***Azospirillum*** تنها ۵ جدایه بومی **HCN** *قادر به سنتز* ***بودند،*** *که* در کلاس ۲ از لحاظ تولید **HCN** قرار داشتند. این یافته با مشاهدات عرب و همکاران (۱۳۸۴) مطابقت دارد. تمام جدایه های ***Azospirillum*** بومی منسوب به گونه ***A.lipoferum*** سیانوژن بودند. هیچ جدایه ای از جدایه های بومی در گروه گونه های ***A.irakense*** و ***A.brasilense*** توانایی تولید **HCN** نداشتند.

فهرست منابع

۱- سلطانی طولارود، ع.ا.، صالح راستین ، ن.، خاوازی، ک. ، اسدی رحمانی ، ه، عباس زاده دهجی، پ.(۱۳۸۶).جداسازی وبررسی صفات محرک رشدگیاهی (PGP)برخی از سودوموناس های فلورسنت بومی خاک های ایران. مجله علوم خاک وآب ، جلد ۲۱(۲) .ص **۲۷۸**

۲- عرب، س. م.، غ. ع. اکبری، ح. ع. علیخانی، م. ح. ارزانش، ا. الهدادی و ر. عباسی.(۱۳۸۴). توانایی انحلال فسفاتهای نامحلول معدنی توسط باکتریهای بومی جنس *آزوسپیریلوم* و تأثیر آن بر ذرت. اولین همایش ملی گیاهان علوفهای کشور، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، تهران. ش. ۲، ص. ۷۳

3- Amico, E.D., Cavalca, L., and V. Andreoni.**(**2005**)**. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-risistant, potentially plant growth-promoting bacteria. FEMS Microbiology Ecology. 52: 153-162

4- Alstrom,S.,Burns,R.G.(1989).Cyasnide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition . Biol. Fertil.Soils.7:232-238

5- Holguin , G.,. Glick , Z B.R. (2001).Expression of the ACC Deaminase Gene from *Enterobactercloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense.* Microb. Ecol . 41:281-288