

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

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

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

مقدمه

Azospirillum باکتری محرک رشد ریزوسفری 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 دامیناز 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- دامیناز 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 - دامیناز (*acdS*) از باکتری *Entrobacter cloacae* UW4 با استفاده از پلازمید *prK415* به دو سویه از گونه *Azospirillum brasilense* Cd و *A. brasilense* Sp245 کلون شد. هر دو سویه این سویه ها فعالیت ACC - دامینازی را همانند *Entrobacter cloacae* UW4 نشان دادند. بیان این ژن باعث بهبود ویژگی PGPR آن گردید، به طوری که ریشه های گوجه فرنگی و کلزای 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 تعیین 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 گلایسین دار (۴/۴ گرم در لیتر) با جدایه های خالص شده آروسپیریلوم، 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 محلول ۰/۳ مولار NH₄Cl 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- دامیناز بیشتر در نظر گرفته شدند.

نتایج و بحث

بررسی توان تولید ACC - دامیناز نشان داد که در کل از ۲۹ جدایه انتخابی در این مرحله تنها ۶/۹ در صد از جدایه ها واجد ژن ACC- دامیناز 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 ناچیز بوده 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 و نیتروژنی 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 و تنش های اتیلنی بسیار مفید باشد. از لحاظ توانایی تولید هیدروژن سیانید از ۲۵ جدایه *Azospirillum* تنها ۵ جدایه بومی قادر به سنتز *HCN* 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* سیانوزن 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 و بررسی صفات محرک رشد گیاهی (PGP) برخی از سودوموناس های فلورسنت بومی خاک های ایران. مجله علوم خاک و آب ، 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 فسفات های نامحلول معدنی توسط باکتری های بومی جنس *آزوسپیریلوم* و تأثیر آن بر ذرت. اولین همایش ملی گیاهان علوفه ای 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-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 52: 153-162
- 4- Alstrom, S., Burns, R.G. (1989). Cyanide 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 *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*. *Microb. Ecol.* 41: 281-288