

تأثیر سودوموناسهای فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase در تعدیل اثرات مضر شوری بر کلزا در مرحله جوانه زنی

فرزاد جلیلی،^{۱*} کاظم خاوازی، ابراهیم پذیرا، علیرضا نجاتی و هادی اسدی رحمانی

دانشجوی دکتری خاکشناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران؛ farjalili@yahoo.com

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ kkhavazi@yahoo.com

استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران؛ ebrahim pazira@yahoo.com

کارشناس میکروبیولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب؛ enajati@yahoo.com

استادیار پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب؛ asadi_1999@yahoo.com

چکیده

شوری، یکی از مهمترین تنش های غیر زنده ای است که باعث کاهش قابلیت تولید محصول در خاکهای مناطق خشک و نیمه خشک می شود. به منظور جداسازی و تعیین خصوصیات محرک رشد سودوموناسهای فلورسنت دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase و بررسی تأثیر آنها بر جوانه زنی ارقام کلزا در سطوح مختلف شوری، پژوهشی در ۷ مرحله اجرا شد. در مرحله اول، جدایه های دارای فعالیت آنزیم مذکور به روش نیمه کمی غربال گری شدند. در مراحل بعدی آزمایش، فعالیت آنزیم در شرایط شور، سنتز مواد شبه اکسین، تولید سیانید هیدروژن و اندازه گیری کمی فعالیت آنزیم بر اساس میزان الفاکتوبوتیرات آزاد شده، بررسی گردید. به منظور مطالعه تأثیر شوری بر جوانه زنی، ابتدا برای هر رقم کلزا، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از فاکتور شوری با سه سطح ۰/۰۴، ۱۱ و ۲۲ dS/m از منابع NaCl و CaCl_۲ با نسبت اکی والانی یکسان و فاکتور باکتری که شامل ۹ سویه با شماره های P196، P169، P108، P11، P153، P74، P79، P159، P4 و یک تیمار بدون باکتری به عنوان شاهد بود. با استفاده از نتایج این قسمت، سویه های برتر که بیشترین تأثیر را در جوانه زنی و رشد داشتند انتخاب و آزمایش دیگری به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از فاکتور رقم شامل رقم های Hayola308 و RGS003، فاکتور شوری با سه سطح ۸، ۱۱ و ۱۴ dS/m از منابع NaCl و CaCl_۲ با نسبت اکی والانی یکسان و فاکتور سویه که شامل چهار باکتری با شماره های P196، P169، P108، P11 و یک تیمار بدون باکتری به عنوان شاهد بود. نتایج نشان داد که ۱۴ درصد سویه ها دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase بودند. بررسی ویژگی فوق الذکر در شرایط شور نشان داد که سویه ها در شرایط تنش شوری نیز قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن هستند. بررسی سنتز مواد شبه اکسین و سیانید هیدروژن بیانگر وجود تفاوتها از نظر این دو مشخصه در بین سویه ها بود. اندازه گیری فعالیت آنزیم ACC Deaminase نیز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم سویه ها متفاوت می باشد، نتایج بررسی رشد ارقام کلزای تلقیح شده با سویه های منتخب نشان داد که میزان جوانه زنی در جدایه هایی که دارای فعالیت آنزیم مذکور هستند نسبت به شاهد و نیز نسبت به جدایه های فاقد این ویژگی بیشتر بوده است به طوری که این تفاوتها در شرایط شور بسیار محرز بود. بنابراین به نظر می رسد که با تلقیح بذرها با انواع برتر این سویه ها مانند P108 و P169، تحمل به شوری افزایش یافته و به تبع آن میزان جوانه زنی و رشد گیاهچه نیز بیشتر خواهد شد.

واژه های کلیدی: اتیلن، تنش شوری، سودوموناس های فلورسنت، کلزا، ACC Deaminase

۱- نویسنده مسئول، آدرس: خوی، کیلومتر ۵ جاده خوی سلماس، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوی

* دریافت: ۸۶/۳/۲۳ و پذیرش: ۸۶/۱۲/۲۲

مقدمه

فرایندهای طبیعی تشکیل خاک در نواحی گرم و خشک غالباً منجر به تشکیل خاکهای شور شده که از لحاظ کشاورزی از پتانسیل پایینی برخوردار می باشند. در این نواحی بیشتر محصولات زراعی تحت شرایط آبیاری رشد می کنند و مدیریت نامناسب آبیاری منجر به ایجاد شوری ثانویه می گردد. شور شدن ۲۰ الی ۲۷ درصد از خاکهای مناطق تحت آبیاری دنیا به این عامل نسبت داده شده است (Yeo, 1999; Ghassemi et al., 1995). بر اساس برآورد سازمان ملل متحد، تقریباً ۵۰ درصد از زمین های زراعی قابل کشت دنیا تحت تنش شوری قرار دارند (Flowers & Yeo, 1995). طبق آمار موجود، سطح کلی خاکهای شور ایران نیز ۷/۳۳ میلیون هکتار برآورد شده است (Dewan & Famuri, 1964) و پیش بینی می شود این رقم به علت استفاده نادرست از منابع آب و خاک افزایش یابد.

شناسایی مکانیسم های تحمل به شوری در گیاهان، غربال گری و اصلاح واریته های جدید، از مهمترین راهکارها برای کاهش اثرات مضر شوری در کشاورزی محسوب می شوند (shraf & McNielly, 2004; Poustini & Siosemardeh, 2004). با شناخت هر چه بیشتر مکانیسم های تحمل به شوری در گیاهان و همچنین نحوه تأثیر شوری بر عملکرد و اجزاء آن، امکان دستیابی به روشهای جدید تر برای مقابله با این تنش غیر زنده بیشتر فراهم می گردد. یکی از دلایل کاهش یا عدم رشد گیاه در شرایط تنش های غیرزنده ای چون شوری، تجمع اتیلن در گیاه می باشد (Mayak et al., 2004a). در این شرایط مقدار ACC¹ (ماده پیش ساخت اتیلن) در داخل گیاه افزایش می یابد که پیامد آن، افزایش سنتز اتیلن در بافتهای گیاهی می باشد (Lynch & Brown, 1997; Glick et al., 1997, 1998; Mayak et al., 2004a, b). اگر چه اتیلن در رشد و توسعه گیاه و رسیدگی میوه اهمیت زیادی دارد با این حال افزایش غلظت اتیلن درون زاد در گونه های گیاهی، بویژه در بیشتر دولپه ایها، می تواند باعث کاهش جوانه زنی و رشد ریشه گردد (Belimov et al., 2001). در مدل ارائه شده توسط Glick و همکاران (۱۹۹۸) پیشنهاد شده است که باکتریهای ریزوسفری با توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase می توانند میزان اتیلن گیاه را کاهش دهند و در نتیجه اثرات سوء شوری را تعدیل نمایند. در این مدل باکتریهای با ویژگی فوق به سطح بذر چسبیده و در پاسخ به

تریپتوفان و یا دیگر اسید های آمینه ترشح شده از بذر، ایندول استیک اسید (IAA) سنتز می کنند (Whipps, 1990). ایندول استیک اسید ممکن است توسط بذر جذب و با اضافه شدن به منبع درون زاد آن، باعث تحریک رشد سلولهای گیاه، طولی شدن آنها یا تحریک سنتز آنزیم ACC Synthase گردد که این آنزیم S-adenosyl-L-Metionine را فوراً به ACC تبدیل می کند (Yang & Hoffman, 1984; Li et al., 2000; Kende, 1993). مقدار زیادی از ACC تولید شده توسط این واکنش از بذر جوانه زده به خارج ترشح شده و توسط آنزیم ACC Deaminase باکتری به α -ketobutyrate و آمونیاک هیدرولیز می شود. هیدرولیز ACC توسط باکتری مستقر در خارج گیاه موجب کاهش میزان ACC موجود در ریزوسفر و اندوریزوسفر می گردد. بنابراین به منظور حفظ تعادل بین مقدار ACC داخل و خارج ریشه، گیاه بایستی میزان ترشح ACC به بیرون را افزایش دهد. در نتیجه، کاهش میزان ACC در داخل گیاه منجر به کاهش مقدار اتیلن در داخل آن و متعاقباً طولی شدن ریشه گیاهچه می گردد (Glick et al., 1998). محققان زیادی اثرات مثبت باکتریهای ریزوسفری دارای آنزیم ACC Deaminase و در نتیجه افزایش رشد گیاه در شرایط تنش زا مثل غرقاب (Grichko & Glick, 2001)، آلودگی به فلزات سنگین (Grichko et al., 2000; Burd et al., 1998)، حضور بیمارگرهای گیاهی (Wang et al., 2000) و شوری و خشکی (Mayak et al., 2004 a, b) را گزارش کرده اند. در نتیجه، گیاهانی که با باکتری های ریزوسفری محرک رشد دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase تلقیح شده اند بایستی ریشه های بلندتر و نیز بخش هوایی بیشتری داشته باشند (Glick et al., 1997). تلقیح گیاهان کلزا، کاهو، گوجه فرنگی و گندم با *Pseudomonas putida* GR12-2 که دارای آنزیم ACC-Deaminase بود، موجب طولی شدن ریشه ها و افزایش رشد آنها شده است (Belimov et al., 2001; Hall et al., 1996) همچنین تلقیح کلزا با این باکتری در شرایط تنش دما (سردی هوا) و شوری موجب شد تا وزن خشک ریشه و بخش هوایی گیاهچه ها مشابه تیمارهای بدون تنش باشد (Belimov et al., 2001; Glick et al., 1997). تلقیح گوجه فرنگی با باکتری *Achromobacter piechaudii* نیز وزن تازه و خشک گوجه فرنگی را در غلظت نمک ۱۷۲ میلی مولار NaCl افزایش و تولید اتیلن را کاهش داد اما بر میزان سدیم گیاه تأثیری نداشت. همچنین تلقیح کارایی مصرف آب و طول گیاهچه های کوچک را در شرایط شور افزایش داد (Mayak et al., 2004a). ایشان نتیجه گیری کردند که

۱۰ میکروگرم FeSO_4 ، ۱۰ میکروگرم H_3BO_3 ، ۱۰ میکروگرم MnSO_4 ، ۷۰ میکروگرم ZnSO_4 ، ۵۰ میکروگرم CuSO_4 و ۱۰ میکروگرم MoO_3 با ۲ گرم گلوکز، ۲ گرم گلوکونیک اسید و ۲ گرم سیتریک اسید) و بدون منبع نیتروژن به عنوان شاهد منفی، ۲- محیط حداقل نمکهای DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم به عنوان شاهد مثبت و ۳- محیط حداقل نمکهای DF حاوی ۳ میلی مولار ACC تهیه گردید. برای تکثیر باکتری های مورد نظر یک لوپ پر از هرجدایه به ارلن ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت مایع^۱ TSB (در هر لیتر شامل ۲/۵ گرم دکستروز، ۲/۵ گرم K_2HPO_4 ، ۵ گرم NaCl، ۳ گرم پپتون سویا و ۱۷ گرم تربپتون) به صورت استریل منتقل و برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکرانکوباتور دار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از سه محیط حداقل نمکهای DF مشروح تلقیح گردید و مجدداً در همان شرایط ذکر شده قبلی نگهداری شد. پس از ۴۸ ساعت، میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید (Dell'Amico et al., 2005). پس از بررسی نتایج، این آزمایش مجدداً در سه تکرار برای جدایه های دارای توانایی استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن تکرار شد.

آزمایش دوم- بررسی تأثیر شوری بر رشد و توانایی باکتریهای منتخب در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

بدین منظور ابتدا شش نوع محیط کشت مایع زیر تهیه گردید:

- ۱- محیط حداقل نمک های DF بدون منبع نیتروژن به عنوان شاهد منفی،
- ۲- محیط حداقل نمکهای DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم به عنوان شاهد مثبت،
- ۳- محیط حداقل نمک های DF حاوی ۳ میلی مولار ACC،
- ۴- محیط حداقل نمک های DF حاوی ۳ میلی مولار ACC و پنج گرم در لیتر NaCl،
- ۵- محیط LB (Luria & Burrous, 1955) (شامل پپتون ۱۰ گرم در لیتر و عصاره مخمر ۵ گرم در لیتر با اضافه کردن کلرید سدیم به مقدار ۵ گرم در لیتر (LB+S1)).
- ۶- محیط LB با ۱۰ گرم در لیتر NaCl (LB+S2).

باکتری از طریق آنزیم ACC-Deaminase و کاهش تولید اتیلن توسط گیاهچه ها، مقاومت گیاه را به تنش شوری افزایش داده است. کوتاه شدن و طویل شدن ریشه می تواند متأثر از سایر ویژگی های باکتری مانند تولید اکسین و یا سیانید هیدروژن نیز باشد. هورمونهای گیاهی و بالاخص اکسین نقش مهمی در کنترل رشد و توسعه گیاه دارند. تولید این هورمون توسط باکتریهای ریزوسفری یکی از عوامل افزایش رشد گیاهان است (Frankenberger & Arshad, 1995). اثر تنظیم کنندگی اکسین در گیاه به غلظت آن بستگی دارد، به طوری که غلظت پائین آن ممکن است رشد را تحریک کند در حالیکه غلظت بالای آن اثر بازدارندگی بر رشد دارد (Frankenberger & Arshad, 1995). تلقیح بذره های کلزا با باکتری *Pseudomonas putida* GR12-2 با قدرت تولید سطوح پائین اکسین، منجر به افزایش ۲ الی ۳ برابر طول گیاهچه شد (Patten & Glick, 1996).

با توجه به گستردگی قابل تأمل خاکهای شور در ایران و نیاز فراوان کشور به اراضی جدید برای کشت کلزا، ضرورت داشت در زمینه استفاده از روشهای بیولوژیک برای توسعه کشت کلزا در این اراضی تحقیقاتی صورت بگیرد. در این تحقیق سعی شده تا ابتدا باکتری های سودوموناس فلورسنت بومی بعضی از خاکهای ایران از نظر پتانسیل تولید آنزیم ACC Deaminase بررسی شوند و سپس تأثیر آنها بر کاهش اثرات شوری بر جوانه زنی کلزا مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین به منظور تفسیر بهتر نتایج و امکان تداخل بعضی از صفات باکتری در تعدیل اثرات شوری، توان تولید هورمون اکسین و سیانید هیدروژن آنها نیز اندازه گیری شد.

مواد و روشها

در این تحقیق ۲۵ جدایه *Pseudomonas fluoresces* و ۲۵ جدایه *Pseudomonas putida* از کلکسیون میکروبی موسسه تحقیقات خاک و آب به طور تصادفی انتخاب و برای آزمایش های بعدی بر روی محیط شیب دار حاوی محیط کشت KingB (King et al., 1954) و همچنین آب مقطر استریل نگهداری شدند.

آزمایش اول - غربالگری باکتری ها از نظر استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

برای انتخاب جدایه های قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن از روش Dell'Amico و همکاران (۲۰۰۵) و با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور سه نوع محیط کشت مایع شامل ۱- محیط حداقل نمکهای DF (Dworkin & Foster, 1958)، (در هر لیتر شامل ۴ گرم KH_2PO_4 ، ۶ گرم Na_2HPO_4 ، ۰/۲ گرم MgSO_4 ، ۱ میلی گرم

آزمایش پنجم- اندازه گیری فعالیت آنزیم ACC Deaminase

در این آزمایش، فعالیت آنزیم ACC Deaminase جدایه هایی که قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند، اندازه گیری شد (Honma & Shimomura 1978; Penrose and Glick, 2003). مراحل اندازه گیری به شرح زیر بود.

- یک لوپ پر از هر جدایه مورد نظر به دو ارلن پنجاه میلی لیتری حاوی ۱۵ میلی لیتر محیط TSB منتقل شد.

- ارلن های تلقیح شده، به مدت یک شب بر روی شیکر انکوباتوردار با ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تکان داده شدند.

- محتویات ارلن ها به لوله های سانتریفوژ منتقل و برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شدند.

- محلول روئی خارج و سلولهای باقی مانده در ته لوله ها با ۵ میلی لیتر از محیط حداقل نمک های DF شستشو داده شد.

- محتویات لوله ها مجدداً برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد.

- محلول روئی لوله ها خارج شد و متعاقباً سلول های باقی مانده در ته لوله های سانتریفوژ با ۷/۵ میلی لیتر از محیط حداقل نمک های DF مخلوط و سپس کل محتویات به یک ارلن استریل جدید اضافه شد.

- محلول ۰/۵ مولار ACC در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری می شد از فریزر خارج و در دمای محیط آزمایشگاه ذوب گردید. آنگاه مقدار ۴۵ میکرولیتر از آن به سوسپانسیون باکتری اضافه شد.

- سوسپانسیون باکتری برای مدت ۲۴ ساعت بر روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تکان داده شد.

- سپس محتویات ارلن به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۸۰۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و پس از آن محلول روئی خارج گردید.

- سلول های باقی مانده در ته ارلن ها با ۵ میلی لیتر از Tris-HCl (یک دهم مولار، pH ۷/۶) مخلوط شدند.

- مجدداً محتویات لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و محلول روئی دور ریخته شد. این دو مرحله مجدداً دو بار تکرار گردید.

- سلولهای فوق در یک میلی لیتر از Tris-HCl (یک دهم مولار، pH ۷/۶) مخلوط کرده و سپس کل محتویات به لوله های ۱/۵ میلی لیتری میکروسانتریفوژ منتقل شد.

سپس یک لوپ پراز باکتریهای منتخب از مرحله قبل به ارلن های حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط TSB منتقل و برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. آنگاه ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری به ارلن های ۵۰ میلی لیتری محتوی ۲۰ میلی لیتر از محیط های با مشخصات ذکر شده در بالا تلقیح و مطابق شرایط قبلی نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت، میزان جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد.

آزمایش سوم- بررسی توانایی جدایه ها از نظر تولید مواد شبه اکسین

اندازه گیری توانایی تولید اکسین با روش اسپکتروفتومتری و با استفاده از معرف سالکوسکی (Salkowski) انجام شد. بدین منظور یک لوپ پر از باکتری های منتخب به محیط مایع TSB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر تریپتوفان (ماده پیش ساز اکسین) منتقل و برای مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و چرخش ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. محتویات ظروف به لوله های سانتریفوژ منتقل و برای مدت ۵ دقیقه با چرخش ۷۱۶۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول روئی با معرف سالکوسکی (مخلوط ۲ میلی لیتر از محلول ۰/۵ مولار $FeCl_3$ و ۹۸ میلی لیتر از محلول ۳۵ درصد $HClO_4$) به نسبت ۲ به ۱ مخلوط و بعد از گذشت ۲۵ دقیقه و سانتریفوژ مجدد در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای چهار درجه سانتیگراد، میزان جذب نور در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد (Benizri et al., 1998). در نهایت با استفاده از منحنی استاندارد غلظت اکسین تولید شده توسط هر جدایه تعیین گردید.

آزمایش چهارم- تولید سیانید هیدروژن

برای اندازه گیری سیانید هیدروژن ابتدا جدایه ها در پلیت های حاوی محیط TSA (۱۵ گرم کازئین هیدرولیز شده به طریقه آنزیمی، ۵ گرم آرد سویای هضم شده به وسیله آنزیم پپسین، ۵ گرم کلرید سدیم، ۱۵ گرم آگار و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر، پ هاش ۷/۲) غنی شده با گلایسین (۴/۴ gr/L) کشت داده شدند. سپس کاغذهای صافی خیسانده شده در پیکرات سدیم (مخلوط پیکریک اسید ۰/۵٪ و کربنات سدیم ۰/۲٪) در قسمت داخلی درب هر پلیت گذاشته شد. پلیت ها به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی تغییر رنگ کاغذ صافی ارزیابی گردید (Donate-correa et al., 2004).

آزمایش ششم- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله اول)

بدین منظور آزمایشی با دو رقم کلزا به نام های Hayola308 و RGS003 به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. سطوح شوری شامل ۰/۰۰۴ (آب مقطر)، ۱ و ۲۲ دسی زیمنس بر متر بود که از منابع NaCl و CaCl₂ با نسبت اکی والانی یکسان تهیه شد. تیمار باکتری نیز شامل ۹ سویه P4, P11, P79, P108, P159, P169, P74, P153, P74 و یک تیمار بدون باکتری بود که باکتری های P74 و P153 به عنوان شاهد منفی بدون فعالیت آنزیم ACC Deaminase در نظر گرفته شدند. به منظور تهیه مایه تلقیح یک لوپ پر از هر یک از جدایه ها به ارلن ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت DF حاوی دو گرم در لیتر سولفات آمونیوم منتقل و برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس ۵۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری به ارلن های ۵۰ میلی لیتری حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط DF حاوی سه میلی مولار ACC منتقل و مجدداً برای مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر انکوباتوردار بادمای ۲۸ درجه سانتی گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سوسپانسیون باکتری با دور ۹۰۰۰ سانتریفوژ و پس از دور ریختن محلول بالایی، سلول های باکتری دو بار با ۰/۰۳MgSO₄ مولار شستشو داده شد (Penrose & Glick, 2003). پس از آن بذره های استریل سطحی شده کلزا برای مدت یک ساعت در داخل سوسپانسیون باکتری نگهداری گردید. سپس محلول اضافی خارج شد و بذور به پتری دیش های حاوی کاغذ صافی استریل انتقال داده شدند تا رطوبت اضافه خود را از دست بدهند. برای تهیه بذور تیمار شاهد همانند مرحله قبل عمل شد با این تفاوت که بذره های استریل شده به جای سوسپانسیون باکتری در ۰/۰۳MgSO₄ مولار قرار داده شدند. سپس به هر پتری دیش ۶ میلی لیتر آب مقطر و یا محلول نمکی مورد نظر اضافه شد و به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد انتقال داده شد. به منظور پایش تبخیر نیز در داخل یک سری پتری دیش های اضافی آب مقطر گذاشته شد. بعد از ۷۲ ساعت، درصد جوانه زنی و بعد از ۱۴۴ ساعت درصد جوانه زنی، طول ریشه و طول اندام هوایی اندازه گیری گردید.

آزمایش هفتم- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله دوم)

بر اساس نتایج آزمایش قبل و به منظور بررسی دقیق تر تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا

- محتویات برای مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰g و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد و سپس محلول روئی خارج گردید.

- سلول های باقی مانده در ته لوله در ۶۰۰ میکرولیتر-Tris-HCl (یک دهم مولار، pH ۸/۵) مخلوط گردید، و به محلول فوق ۳۰ میکرولیتر تولوئن اضافه شد. محلول نهایی به مدت ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس شد.

به منظور اندازه گیری پروتئین ۱۰۰ میکرولیتر از محلول برداشت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شد. از این به بعد برای هر باکتری یا هر نمونه دو تکرار در نظر گرفته شد.

- دویست میکرو لیتر از سلول های تولوئنی شده (مرحله ۱۷) به یک لوله ۱/۵ میلی لیتری جدید اضافه شد. سپس بیست میکرو لیتر از محلول ACC نیم مولار به آن اضافه شد.

- محلول فوق به اختصار ورتکس شده و برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگه داری گردید و به محلول فوق یک میلی لیتر HCl (۰/۵۶ مولار) اضافه شد.

- محلول نهایی با استفاده از ورتکس مخلوط و سپس به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۶۰۰۰ g و در دمای اتاق سانتریفوژ شد.

- یک میلی لیتر از محلول روئی برداشته شد و با ۸۰۰ میکرولیتر از HCl (۰/۵۶ مولار) ورتکس گردید.

- سیصد میکرولیتر از 2,4-dinitrophenylhydrazine (0.2%) در ۲ HCl مولار) به لوله قبلی اضافه شد.

- محتویات لوله ورتکس گردید و آنگاه برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگه داری شد.

- پس از آن به محلول فوق، ۲ میلی لیتر NaOH ۲ مولار اضافه شد و سپس مخلوط گردید تا یکنواخت شود. سپس جذب نوری (absorbance) در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید.

منحنی استاندارد با استفاده از آلفاکتوبوتیریک اسید و غلظت پروتئین سوسپانسیون سلولی در سلولهای تولوئنی شده با استفاده از روش Bradford (1976) تعیین گردید. برای تهیه منحنی استاندارد پروتئین از بویین سرم آلبومین^۱ BSA استفاده شد (Penrose & Glick, 2003; Belimov et al., 2005). بعد از بدست آوردن میزان پروتئین و آلفاکتوبوتیرات، فعالیت آنزیم براساس میکرومول آلفاکتوبوتیرات آزاد شده در میلی گرم پروتئین در ساعت گزارش شد.

در شرایط تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجرا گردید. فاکتورهای آزمایش عبارت بودند از فاکتور رقم شامل رقم های Hayola308 و RGS003، فاکتور شوری با سه سطح ۸، ۱۱ و ۱۴ دسی زیمنس بر متر از منابع NaCl و CaCl₂ با نسبت اکی والانی یکسان و فاکتور باکتری که شامل چهار باکتری با شماره های P11، P108، P169، P196 و P11 و یک تیمار بدون باکتری به (عنوان شاهد) بود. کلیه شرایط آزمایش همانند آزمایش شماره شش بود و بعد از سپری شدن ۱۴۴ ساعت درصد جوانه زنی، طول ریشه، طول اندام هوایی، وزن تازه و وزن خشک گیاهچه تعیین گردید.

تجزیه های آماری

تجزیه واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت و مقایسه میانگین ها بر مبنای آزمون حداقل اختلاف معنی دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

۱- غربال گری باکتری ها از نظر توان استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

توان جدایه ها در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن متفاوت بود. از میان ۲۵ جدایه *P. fluorescens* فقط سه جدایه به شماره های P169، P79 و P196 قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند.

به طوری که میزان رشد این باکتری ها در محیط با منبع نیتروژن ACC به ترتیب ۷۳، ۷۹ و ۷۱ درصد محیط با منبع نیتروژن قابل استفاده برای تمام باکتری ها یعنی سولفات آمونیوم بود (جدول ۱). از میان ۲۵ جدایه *P. putida* نیز فقط چهار جدایه به شماره های P4، P11، P108 و P159 قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند. میزان رشد این باکتری ها در محیط با منبع نیتروژن ACC به ترتیب ۶۱ و ۵۸ و ۶۷ و ۶۶ درصد محیط با منبع نیتروژن قابل استفاده سولفات آمونیوم بود. بنابراین از ۵۰ جدایه مورد مطالعه ۷ جدایه قادر به استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن بودند که احتمالاً توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase را داشته (شکل ۱) و برای آزمایشات بعدی انتخاب شدند.

۲- بررسی تأثیر شوری بر رشد و توانایی باکتریهای منتخب در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

با افزایش شوری محیط LB از ۵ درصد به ۱۰ درصد، رشد باکتری ها کاهش نیافت. اضافه کردن پنج گرم در لیتر NaCl به محیط DF حاوی ACC نیز تأثیر قابل ملاحظه ای بر رشد باکتری نداشت. به عبارت دیگر این

باکتری ها قادر بودند تا در شرایط شوری پنج گرم در لیتر NaCl نیز از ACC به عنوان منبع نیتروژن استفاده نمایند. البته واکنش جدایه های مختلف نسبت به اضافه کردن نمک به محیط DF حاوی ACC متفاوت بود بطوری که اضافه کردن نمک در مورد جدایه های شماره P11، P159، P169 و P4 موجب افزایش و در مورد جدایه های شماره P108، P196 و P79 موجب کاهش رشد شد (جدول ۲). معهذا تغییرات در سطح پنج در صد معنی دار نبود.

۳- بررسی توانایی جدایه ها از نظر تولید مواد شبه اکسین توانایی تولید مواد شبه اکسین باکتری های مورد مطالعه از ۶/۱ تا ۶۷/۹ میلی گرم در لیتر متغیر بود (جدول ۳).

۴- بررسی توانایی جدایه ها از نظر تولید سیانید هیدروژن نتایج نشان داد که فقط جدایه P159 دارای توانایی تولید سیانید هیدروژن بود (جدول ۳).

۵- اندازه گیری فعالیت آنزیم ACC Deaminase

میزان فعالیت آنزیم ACC Deaminase باکتری های مورد مطالعه از ۲/۳۰۵ تا ۵/۰۳۰ میکرومول الفاکتوتوبرات در هر میلی گرم پروتئین در ساعت متغیر بود (جدول ۳).

۶- بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله اول)

نتایج این مرحله در جداول ۴ و ۵ ارائه شده و نشان می دهد که در شرایط غیر شور، تلقیح بذر رقم RGS003 با باکتریهای P.p.4 و P.f.153 پس از سه روز و تلقیح بذر با باکتریهای P.p.108 و P.f.153 پس از شش روز درصد جوانه زنی را نسبت به شاهد تلقیح نشده بطور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش داد. در این شرایط در اثر تلقیح بذر با باکتری P.p.159 و P.p.153 طول ریشه نیز بطور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش یافت ولی تلقیح بذر با باکتری P.f.79 بطور معنی داری ($P < 0.05$) موجب افزایش طول اندام هوایی گردید. در شرایط شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر، باکتریهای P.p.74، P.p.159، P.p.4 پس از ۳ و ۶ روز و باکتری P.f.79 فقط پس از ۶ روز درصد جوانه زنی رقم RGS003 را بطور معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به شاهد تلقیح نشده کاهش دادند. در حالیکه تلقیح با باکتری P.f.169 پس از ۳ و ۶ روز و باکتری P.f.153 پس از ۶ روز درصد جوانه زنی را بطور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش داد. تلقیح با باکتریهای P.p.4 و P.p.159 موجب کاهش معنی دار ($P < 0.05$) طول ریشه و تلقیح با باکتریهای P.f.169، P.f.196 موجب افزایش معنی دار ($P < 0.05$) طول ریشه شد. در این شرایط تأثیر باکتریهای P.p.4 و P.p.159 بر کاهش طول اندام هوایی نیز معنی دار ($P < 0.05$) بود، ولی باکتری P.p.108 موجب افزایش معنی دار ($P < 0.05$)

اندام هوایی رقم RGS003 را به طور معنی داری افزایش داد. طول ریشه رقم Hayola308 در اثر تلقیح باکتری P.f.108 و طول ریشه رقم RGS003 در اثر تلقیح با تمام سویه های منتخب بطور معنی داری افزایش یافت. تلقیح رقم Hayola308 توسط باکتریهای P.p.108 و P.f.196 و همچنین تلقیح رقم RGS003 با باکتریهای P.p.108 و P.f.169 موجب افزایش معنی دار وزن تازه گیاهچه آنها شد. وزن خشک گیاهچه فقط در مورد رقم RGS003 و در اثر تلقیح با باکتری P.f.196 به طور معنی داری افزایش یافت. در شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر تلقیح رقم Hayola308 با سویه های P.p.108، P.p.11 و P.f.196 و تلقیح رقم RGS003 با باکتری های P11 و P196 طول اندام هوایی را به طور معنی داری افزایش داد. طول ریشه (رقم Hayola308) در اثر تلقیح با باکتری های P.p.108 و P.p.159 و طول ریشه رقم RGS003 نیز در اثر تلقیح باکتری های P.p.108 و P.f.196 به طور معنی داری افزایش یافت. وزن تر گیاهچه های رقم Hayola308 نیز در اثر تلقیح با باکتری P108 و وزن تر گیاهچه رقم RGS003 در اثر تلقیح با باکتری های P.p.108 و P.f.196 افزایش یافت.

بحث

آنزیم ACC Deaminase در طیف وسیعی از باکتری های آزادزی خاک بخصوص سودوموناس ها، قارچها (Honma & Shimomura, 1978; Glick *et al.*, 1995) و همچنین باکتریهای اندوفیت (Sessitsch *et al.*, 2005) گزارش شده است. با این وجود غربالگری تعداد زیادی از سویه ها بر اساس فعالیت آنزیم ACC Deaminase به دلیل وقت گیر بودن و مراحل طولانی اندازه گیری فعالیت این آنزیم مشکل می باشد و معمولاً بدین منظور از مقایسه رشد سویه ها در سه محیط کشت با منابع نیتروژن معدنی معمول و ACC و بدون منبع نیتروژن استفاده می شود (Dell Amico *et al.*, 2005). در این تحقیق نیز با استفاده از این روش از تعداد ۵۰ سویه مورد مطالعه، ۷ سویه (۱۴ درصد سویه ها) قادر به رشد در محیط با منبع نیتروژن ACC بودند که احتمالاً به دلیل توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase بوده است. در خصوص توانایی سودوموناس های فلورسنت در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن و به عبارت دیگر تولید آنزیم ACC Deaminase، گزارشات متعددی ارائه شده است (Hall *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2000; Penrose *et al.*, 2001). در جدایه هایی که توسط Ma و همکاران (۲۰۰۳) از خاکهایی با موقعیت های جغرافیایی مختلف خاکها جداسازی شده بود مشخص شد که ۵ سویه از ۱۷ سویه ریزوبیومی (۲۹ درصد سویه ها) دارای فعالیت آنزیم

طول اندام هوایی شد. در شرایط شوری ۲۲ دسی زیمنس بر متر فقط تلقیح با باکتری P.f.169 موجب افزایش معنی دار ($P < 0.05$) جوانه زنی پس از ۳ روز در رقم RGS003 شد. در این سطح از شوری، تلقیح بذر تأثیر معنی داری بر افزایش طول ریشه و اندام هوایی نشان نداد. در خصوص رقم Hayola308، در شرایط غیر شور تلقیح بذر با باکتری P.f.196 پس از ۳ روز و تلقیح بذر با باکتریهای P.f.196، P.p.4، P.p.159 پس از ۶ روز درصد جوانه زنی را به طور معنی داری ($P < 0.05$) کاهش داد. باکتریهای P.f.196، P.f.79 طول اندام هوایی را به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش دادند و این در حالی بود که باکتری P.f.153 موجب کاهش معنی دار ($P < 0.05$) طول اندام هوایی شد. در شرایط شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر، تلقیح با باکتریهای P.f.169، P.p.108، P.p.159، P.p.11، P.f.79، P.p.4 پس از ۳ و ۶ روز درصد جوانه زنی را به طور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش داد. طول ریشه در اثر تلقیح با باکتریهای P.f.169، P.p.108، P.p.74 و بطور معنی داری ($P < 0.05$) افزایش یافت. تلقیح با باکتریهای P.p.4 و P.p.159 موجب کاهش معنی دار طول اندام هوایی و تلقیح با باکتریهای P.f.169، P.p.108 و P.f.196 موجب افزایش معنی دار طول اندام هوایی گردید. در شرایط شوری ۲۲ دسی زیمنس بر متر، تلقیح بذرها فقط با سویه P.f.169 موجب افزایش معنی دار ($P < 0.05$) جوانه زنی پس از ۳ و ۶ روز شد. طول ریشه و اندام هوایی را هم افزایش داد گرچه این افزایش به سطح معنی داری نرسید.

۷- بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری (مرحله دوم)

نتایج این مرحله در جدول ۶ ارائه شده است نشان می دهد که در شرایط شوری ۸ دسی زیمنس بر متر، تلقیح بذرهای رقم Hayola308 با باکتریهای P.p.108، P.p.11 و P.f.196 جوانه زنی را بطور معنی داری افزایش داد. تلقیح با باکتریهای P.p.11 و P.p.108 طول اندام هوایی هر دو رقم کلزای مورد مطالعه را بطور معنی داری افزایش داد. باکتریهای P.p.108 و P.p.11 طول ریشه رقم های Hayola308 و RGS003 را بطور معنی داری افزایش دادند. تلقیح رقم Hayola308 با باکتری P.p.108 و تلقیح رقم RGS003 با سویه های P.p.11 و P.f.169 موجب افزایش معنی دار وزن تازه گیاهچه شد. در شرایط شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر، تلقیح رقم Hayola308 با هر چهار سویه منتخب و تلقیح رقم RGS003 با باکتریهای P.p.108 و P.f.169 جوانه زنی را بطور معنی داری افزایش داد. تلقیح با سویه P.p.108 طول اندام هوایی رقم Hayola308 و تلقیح با باکتریهای P.f.169 و P.f.196 طول

ACC Deaminase بوده و گره زایی گیاهان لگوم مختلف را تحریک کردند.

با توجه به آنکه هدف اصلی این تحقیق استفاده از باکتری های با ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase برای تعدیل اثرات شوری بر کلزا بود و اطلاعاتی از حفظ این ویژگی در باکتریهای بومی در شرایط شور نبود، آزمایشی در این خصوص طراحی گردید. براساس نتایج بدست آمده، ۷ سویه منتخب دارای توانایی رشد در محیط کشت با منبع نیتروژن ACC و در ضمن قادر به حفظ این توانایی تا یک درصد NaCl بودند. مایاک و همکاران (۲۰۰۴a) نیز نشان دادند که سویه *Achromobacter piechaudii* ARV8 جداسازی شده از خاکهای شور، تا شوری ۲۰۷ میلی مولار NaCl ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase را دارا بودند.

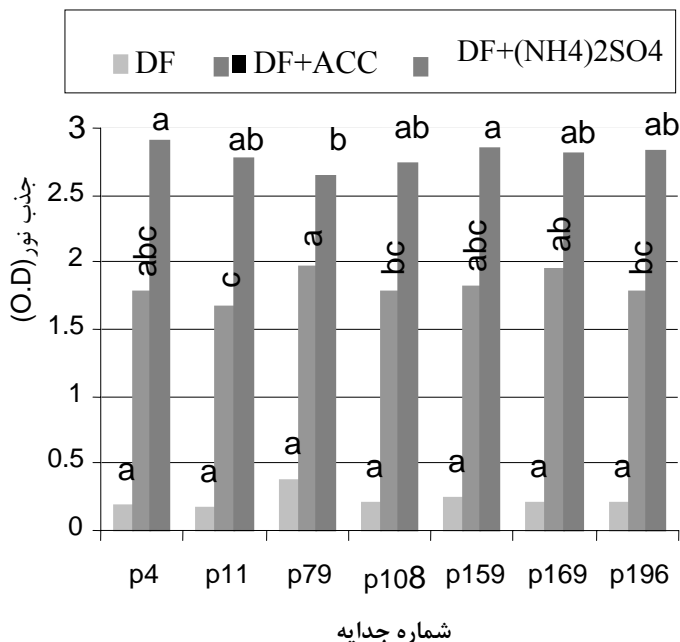
به منظور تأیید توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase توسط ۷ سویه منتخب، فعالیت این آنزیم اندازه گیری شد که نتایج موید انتخاب درست سویه ها بود به طوری که هر ۷ سویه منتخب از این ویژگی برخوردار بودند. فعالیت این آنزیم در جدایه های مورد مطالعه از ۲/۳۰۵ تا ۵/۰۳۰ میکرومول الفاکتوتیرات در هر میلی گرم پروتئین در ساعت متغیر بود. Penrose و Glick (۲۰۰۳) پیشنهاد کرده اند که هر باکتری با فعالیت آنزیم ACC Deaminase بیش از ۲۰ نانومول الفاکتوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت می تواند به عنوان PGPR محسوب شده و شاخص های رشد گیاه را افزایش دهد. بالا بودن میزان فعالیت این آنزیم، ضرورتاً به معنی تأثیر بیشتر آن سویه در افزایش رشد گیاه نمی باشد. این فعالیت در جدایه های مورد مطالعه Belimove و همکاران (۲۰۰۵) نیز از ۰/۷ تا ۱۰/۵ میکرومول الفاکتوتیرات بر میلی گرم پروتئین در ساعت متغیر بود. در جدایه های مورد مطالعه Ma و همکاران (۲۰۰۳) میزان فعالیت آنزیم مذکور ۱/۵۶ تا ۲۰/۴۸ میکرومول الفاکتوتیرات در هر میلی گرم پروتئین در ساعت متغیر بود.

یک باکتری محرک رشد گیاه عموماً دارای مجموعه ای از فعالیت های محرک رشد گیاهی (PGP) است که برآیند تعامل این صفات می تواند در یک یا چند مرحله خاص از رشد گیاه و بسته به شرایط محیطی حاکم بر رشد، منجر به افزایش یا کاهش صفات مورد نظر اعم از جوانه زنی، طول ریشه، اجزاء عملکرد و عملکرد محصول گردد. اثبات یا رد تغییر یک ویژگی در گیاه تلقیح شده با یک سویه PGPR تنها به دلیل وجود صفت معینی در این سویه فقط از طریق ایجاد موتانت سویه مذکور امکان پذیر می باشد. در این تحقیق هدف آن بود که با غربال گری

باکتریهای PGPR از نظر ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase بتوان سویه های با این توانایی را برای تعدیل اثرات شوری بر رشد کلزا معرفی نمود. برای مقایسه از سویه های بدون ویژگی تولید آنزیم ACC Deaminase همان باکتری ها به عنوان شاهد استفاده شد. نتایج آزمایش در مرحله اول بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا نشان داد که ممکن است باکتری موجب افزایش یا کاهش صفت مورد نظر گردد. در این خصوص در کلزا رقم RGS003 سویه های P.p.4 و P.f.153 پس از سه روز و سویه های P.p.108 و P.f.153 پس از ۶ روز جوانه زنی را به طور معنی داری کاهش دادند. در این شرایط باکتریهای P.p.159 و P.f.153 طول ریشه را به طور معنی داری کاهش دادند. هر چند به غیر از باکتری های P.f.153 و P.p.74، سایر باکتریهای مذکور دارای توانایی تولید آنزیم ACC Deaminase بودند، ولی ممکن است این سویه ها دارای ویژگیهای دیگری نیز باشند که پارامتر های فوق را تحت تأثیر قرار دهد. به عنوان مثال ممکن است تأثیر منفی باکتری P.p.159 به دلیل تولید سیانید هیدروژن باشد. علاوه بر سیانید هیدروژن تولید بعضی از متابولیت های ثانویه (Stougaard, 2000)، منجمله اتسین (Frankenberger & Arshad, 1995) و اکسین زیاد (Patten & Glick, 2002) می تواند دلیل کاهش پارامتر های فوق الذکر باشد. در مجموع نتایج این بخش نشان داد که در رقم RGS003 سویه P.f.169 می تواند میزان جوانه زنی پس از ۳ و ۶ روز و همچنین طول اندام هوایی و ریشه را در شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر و حتی جوانه زنی پس از ۳ روز را در شرایط ۲۲ دسی زیمنس بر متر بطور معنی داری افزایش دهد. افزایش طول ریشه کلزا رقم RGS003 در شوری ۱۱ دسی زیمنس بر متر در تیمار با باکتری P.f.196 نیز معنی دار بود. تأثیر باکتریها بر افزایش قدرت جوانه زنی و همچنین افزایش سایر پارامترهای مورد مطالعه در شرایط شور با میزان فعالیت آنزیم ACC Deaminase باکتری همخوانی نداشت. بطوریکه در رقم RGS003 هر چند که سویه P.p.108 بیشترین فعالیت آنزیم ACC Deaminase را داشت ولی نسبت به سویه P.f.169 که دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase کمتری بود، تأثیرات چندان قابل ملاحظه ای نداشت. با در نظر گرفتن اثر باکتریهای مورد مطالعه بر روی ارقام Hayola308 و RGS003 در نهایت باکتریهای P.f.169، P.p.108 و P.p.11 برای بررسی بیشتر در دامنه شوری ۸ تا ۱۴ دسی زیمنس بر متر انتخاب شدند. بررسی تأثیر جدایه های منتخب بر جوانه زنی و رشد دو رقم کلزا در مرحله دوم آزمایش نشان داد که جدایه P.p.108 تمامی

مطالعه، باعث افزایش درصد جوانه زنی و شاخص های رشد از قبیل وزن تازه و خشک، طول ریشه و طول اندام هوایی بادام زمینی در شرایط تنش نمک شدند. در تحقیق آنها بیشترین افزایش مربوط به سویه *P. fluorescens* YDK1 دارای فعالیت آنزیم ACC Deaminase بوده که اثر این سویه در افزایش ماده خشک بادام زمینی در شرایط تنش نمک بیش از شرایط بدون تنش بوده است. مقایسه جوانه زنی رقم ها نشان داد که رقم Hayola308 حساس تر از رقم RGS003 نسبت به شوری بوده است و اثر سویه ها در تخفیف اثرات شوری، موقعی که به رقم حساس تلقیح شده اند بیشتر بوده است. با توجه به نتایج این آزمایشات، سویه های منتخب در تخفیف اثرات شوری بر کلزا در شرایط کنترل شده موثر بوده است لذا پیشنهاد می شود که اثر سویه های منتخب بر کلزا، در آزمایشات گلدانی، مزرعه ای و در محیط شور بررسی شوند.

فاکتورهای مورد مطالعه در کلزای رقم Hayola308 و برخی از فاکتورهای کلزای رقم RGS003 را نسبت به شاهد افزایش معنی دار داد. در مورد بقیه جدایه ها هر کدام از آنها فقط بعضی از فاکتورهای مورد مطالعه را در هر دو رقم به طور معنی داری افزایش دادند که این اثرات در کلزای رقم RGS003 تیمار شده با باکتری P.f.196 بیشتر بوده است مقایسه جوانه زنی و رشد کلزا در سطوح مختلف شوری در مرحله اول با مرحله دوم آزمایش، حاکی از آنست که در یک سطح مشخص شوری، داده های بدست آمده از مرحله اول آزمایش در سطح پائین تری نسبت به مرحله دوم آزمایش قرار گرفته اند، با توجه به اینکه آزمایشات در شرایط کنترل انجام می گرفت علت وجود تفاوتها شاید به خاطر تنش غیر منتظره ای (تنش خشکی که بدنبال آن تنش اسمزی را موجب می شد) باشد که در مرحله اول به کلیه تیمارهای آزمایش اعمال شد. تحقیقات Saravanakumar و Samiyappan (۲۰۰۷) نیز نشان داد که هر چهار سویه سودوموناس فلورسنت مورد



شکل ۱- میزان رشد جدایه ها در سه محیط کشت

جدول ۱- غربال گری باکتری ها از نظر استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانو متر			نام باکتری	میزان جذب در طول موج ۴۰۵ نانو متر			نام باکتری
(NH ₄) ₂ SO ₄ + DF	DF+ACC	DF		(NH ₄) ₂ SO ₄ + DF	DF+ACC	DF	
۲/۵۳	۰/۲۵	۰/۲۸	<i>P.p.</i> strain 168	۲/۸۷	۰/۱۹	۰/۲۲	<i>P.f.</i> strain 3
۳/۰۲	۱/۸۴	۰/۱۴	<i>P.p.</i> strain 4	۲/۷۲	۰/۲۵	۰/۲۸	<i>P.f.</i> strain 174
۲/۹	۰/۲۴	۰/۲۶	<i>P.p.</i> strain 9	۲/۸۵	۰/۱۷	۰/۱۷	<i>P.f.</i> strain 6
۲/۹۲	۰/۲۴	۰/۲۵	<i>P.p.</i> strain 10	۲/۵۷	۰/۱۳	۰/۳۲	<i>P.f.</i> strain 161
۲/۹۸	۱/۷۳	۰/۱۴۳	<i>P.p.</i> strain 11	۲/۸۳	۲/۰۶	۰/۱۹	<i>P.f.</i> strain 169
۲/۷۳	۰/۱	۰/۱	<i>P.p.</i> strain 34	۲/۸۲	۰/۱۴	۰/۱۷	<i>P.f.</i> strain 120
۲/۷۶	۰/۲۵	۰/۲۸	<i>P.p.</i> strain 50	۲/۸	۰/۲۷	۰/۲۹	<i>P.f.</i> strain 31
۲/۹	۰/۱	۰/۱۹	<i>P.p.</i> strain 41	۲/۷	۰/۱۴	۰/۲۳	<i>P.f.</i> strain 153
۲/۷۵	۰/۱	۰/۱	<i>P.p.</i> strain 56	۲/۷۵	۰/۳۰	۰/۳۵	<i>P.f.</i> strain 157
۱/۸۵	۰/۱۸	۰/۲۵	<i>P.p.</i> strain 74	۲/۷۴	۰/۱۲	۰/۱۰	<i>P.f.</i> strain 111
۲/۷۳	۰/۲۴	۰/۲۹	<i>P.p.</i> strain 68	۲/۸۷	۰/۲۱	۰/۲۴	<i>P.f.</i> strain 87
۲/۶۸	۰/۰۴	۰/۰۵	<i>P.p.</i> strain 147	۲/۷۸	۰/۲۶	۰/۳	<i>P.f.</i> strain 71
۲/۸۳	۰/۲۶	۰/۲۹	<i>P.p.</i> strain 130	۲/۷۴	۲/۱۶	۰/۶۹	<i>P.f.</i> strain 79
۲/۷۸	۱/۸۵	۰/۱۹	<i>P.p.</i> strain 108	۲/۶۱	۰/۱۷	۰/۱۹	<i>P.f.</i> strain 88
۲/۵۶	۰/۱۳	۰/۲۱	<i>P.p.</i> strain 101	۲/۸	۰/۰۹	۰/۱	<i>P.f.</i> strain 82
۲/۵۱	۰/۱۳	۰/۱۶	<i>P.p.</i> strain 112	۲/۸۴	۰/۲۲	۰/۲۰	<i>P.f.</i> strain 145
۲/۹۹	۰/۲	۰/۲۶	<i>P.p.</i> strain 123	۱/۷۹	۰/۱۹	۰/۱۸	<i>P.f.</i> strain 65
۲/۶۲	۰/۱۳	۰/۱۹	<i>P.p.</i> strain 98	۲/۷۱	۰/۲۳	۰/۲۱	<i>P.f.</i> strain 183
۲/۷۲	۰/۲۶	۰/۳	<i>P.p.</i> strain 103	۲/۶۸	۱/۹۱	۰/۱۴	<i>P.f.</i> strain 196
۲/۷۳	۰/۲۵	۰/۲۶	<i>P.p.</i> strain 100	۲/۷۸	۰/۲۴	۰/۲۶	<i>P.f.</i> strain 99
۲/۸۹	۱/۷۸	۰/۱۸	<i>P.p.</i> strain 159	۲/۶۶	۰/۲۶	۰/۳۲	<i>P.f.</i> strain 162
۲/۷۲	۰/۰۸	۰/۰۹	<i>P.p.</i> strain 53	۲/۷۲	۰/۲۷	۰/۳۲	<i>P.f.</i> strain 173
۲/۸۰	۰/۳۴	۰/۳۷	<i>P.p.</i> strain 143	۲/۶۶	۰/۲۴	۰/۲۷	<i>P.f.</i> strain 193
۲/۹۰	۰/۱۹	۰/۱۳	<i>P.p.</i> strain 139	۲/۵۵	۰/۱۷	۰/۱۸	<i>P.f.</i> strain 194
۲/۶۱	۰/۱۵	۰/۱۷	<i>P.p.</i> strain 179	۲/۶۰	۰/۱۸	۰/۲۱	<i>P.f.</i> strain 189

جدول ۲- بررسی تأثیر شوری بر رشد و توانایی سویه های منتخب در استفاده از ACC به عنوان منبع نیتروژن

LB+S2	LB+S1	DF+ACC+S1	DF+ACC DF+(NH ₄) ₂ SO ₄	DF+(NH ₄) ₂ SO ₄	DF+ACC	DF	سویه ها
۲/۹۵۳	۲/۹۵۳	۱/۹۳۵	۰/۶۱۶	۲/۹۰۴	۱/۷۸۸	۰/۱۷۹	P.p.4
۲/۸۵	۲/۷۷۳	۱/۶۸۷	۰/۶۰۰	۲/۷۷۹	۱/۶۶۶	۰/۱۶۶	P.p.11
۲/۱۰۳	۲/۰۹۷	۱/۷۴۷	۰/۷۴۱	۲/۶۵۳	۱/۹۶۶	۰/۳۸۱	P.f.79
۲/۶۰	۲/۵۹۳	۱/۵۱۷	۰/۶۴۸	۲/۷۴۳	۱/۷۷۷	۰/۲۰۲	P.p.108
۲/۹۰	۲/۷۹۷	۲/۲۱۰	۰/۶۳۸	۲/۸۵۷	۱/۸۲۱	۰/۲۴۲	P.p.159
۲/۹۷۷	۲/۸۳۷	۲/۰۷۳	۰/۶۹۳	۲/۸۰۷	۱/۹۴۷	۰/۱۹۷	P.f.169
۲/۳۷۷	۲/۲۸۰	۱/۵۵۹	۰/۶۲۹	۲/۸۲۹	۱/۷۷۳	۰/۲۰۲	P.f.196
۰/۰۵۵۴	۰/۰۵۵۴	۰/۱۶۶۱	۰/۰۷۸	۰/۱۸۴	۰/۱۸۴	۰/۲۲۲	LSD(0.05)

جدول ۳- میزان تولید مواد شبه اکسین، سیانید هیدروژن و فعالیت آنزیم ACC Deaminase سویه های مورد مطالعه

سویه							صفت مورد نظر
P.f.196	P.f.169	P.p.159	P.p.108	P.f.79	P.p.11	P.p.۴	
۶/۸	۵/۸	۶۷/۹	۸/۹	۶/۱	۷/۷	۹/۶	مواد شبه اکسین (mg/l)
-	-	+	-	-	-	-	سیانید هیدروژن
۲/۰۹۲	۳/۵۰۸	۲/۹۸۱	۵/۰۳۰	۲/۷۲۶	۲/۴۰۹	۲/۳۰۵	فعالیت آنزیم ACC Deaminase ^۱

۱- میکرومول آلفاکتوبوتیرات در میلی گرم پروتئین در ساعت

جدول ۴- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا رقم RGS003 در سطوح مختلف شوری

شوری (dS/m)												سویه ها
۲۲				۱۱				۰/۰۰۴				
طول اندام هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	جوانه زنی (% (روز ۳))	جوانه زنی (% (روز ۳))	طول اندام هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	جوانه زنی (% (روز ۳))	جوانه زنی (% (روز ۳))	طول اندام هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	جوانه زنی (% (روز ۳))	جوانه زنی (% (روز ۳))	
۳	۴	۴۰	۳۲	۴	۵	۴۶	۴۰	۲۶	۲۰	۹۰	۸۱	P.p.4
۴	۰	۲۵	۲۰	۸	۱۲	۶۳	۶۱	۲۸	۲۹	۹۳	۹۳	P.p.11
۰	۰	۰	۱	۸	۱۳	۵۰	۵۰	۳۲	۳۰	۹۱	۸۳	P.f.79
۳	۲	۱۵	۱۰	۱۹	۲۱	۶۹	۶۵	۲۵	۲۳	۸۴	۸۲	P.p.108
۰	۰	۲۵	۲۴	۴	۶	۴۱	۴۱	۲۲	۱۹	۹۲	۹۲	P.p.159
۴	۴	۴۲	۴۵	۱۴	۲۶	۷۴	۷۴	۲۴	۲۰	۹۴	۹۴	P.f.169
۰	۰	۲	۲	۱۴	۲۶	۶۸	۵۷	۳۰	۲۸	۸۹	۸۹	P.f.196
۰	۰	۲	۰	۱۴	۲۱	۴۹	۳۷	۲۶	۲۱	۹۲	۹۲	شاهد P.p.74
۵	۶	۲۷	۱۷	۱۴	۱۸	۷۷	۶۵	۲۱	۱۹	۸۱	۸۱	شاهد P.f.153
۳	۳	۴۰	۳۱	۱۲	۱۷	۶۱	۶۰	۲۶	۲۶	۹۵	۹۲	شاهد (بدون تلقیح)
۵/۹	۶/۴	۱۰/۶	۱۰/۹	۵/۹	۶/۴	۱۰/۶	۱۰/۹	۵/۹	۶/۴	۱۰/۶	۱۰/۹	LSD(0.05)

جدول ۵- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد کلزا رقم Hayola308 در سطوح مختلف

سویه ها	شوری (dS/m)											
	۰/۰۰۴				۱۱				۲۲			
	جوانه زنی (%)	طول ریشه (mm)	طول اندام هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	جوانه زنی (%)	طول ریشه (mm)	طول اندام هوایی (mm)	جوانه زنی (%)	طول ریشه (mm)	طول اندام هوایی (mm)	جوانه زنی (%)	طول ریشه (mm)
P.p.4	۷۵	۲۰	۲۵	۲۰	۵۰	۴	۲	۱۶	۱۸	۲	۲	۲
P.p.11	۸۶	۲۶	۲۷	۲۶	۸۳	۱۲	۸	۲۱	۲۵	۳	۳	۳
P.f.79	۷۵	۲۸	۳۱	۲۸	۵۴	۱۴	۱۰	۰	۰	۳	۲	۲
P.p.108	۸۴	۲۳	۲۲	۲۳	۵۴	۲۱	۱۶	۶	۸	۳	۲	۲
P.p.159	۸۳	۲۱	۲۳	۲۱	۵۶	۵	۴	۱۹	۲۱	۲	۲	۱
P.f.169	۷۶	۲۲	۲۴	۲۲	۶۳	۲۶	۱۷	۳۱	۳۳	۴	۴	۴
P.f.196	۶۶	۲۹	۳۰	۲۹	۳۵	۱۹	۲۰	۰	۰	۰	۰	۰
P.p.74 شاهد	۸۳	۲۲	۲۵	۲۲	۳۱	۲۴	۱۳	۶	۱۰	۲	۲	۰
P.f.153 شاهد	۸۳	۱۸	۱۶	۱۸	۴۳	۱۹	۱۵	۹	۱۰	۰	۰	۲
شاهد (بدون تلقیح)	۸۱	۲۳	۲۲	۲۳	۴۱	۱۴	۱۰	۱۸	۲۰	۲	۲	۲
LSD(0.05)	۸/۳	۷/۶	۵/۸	۶/۱	۸/۳	۷/۶	۵/۸	۸/۳	۷/۶	۶/۱	۵/۸	۵/۸

جدول ۶- بررسی تأثیر سویه های منتخب بر جوانه زنی و رشد دو رقم کلزا (Hayola308, RGS003) در سطوح مختلف شوری

رقم	شماره سویه	شوری (dS/m)											
		۸				۱۱				۱۴			
		جوانه زنی (%)	طول ریشه (mm)	طول اندام هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	جوانه زنی (%)	طول ریشه (mm)	طول اندام هوایی (mm)	طول ریشه (mm)	جوانه زنی (%)	طول ریشه (mm)	طول اندام هوایی (mm)	طول ریشه (mm)
	شاهد	۵۱	۳۱	۲۸	۲۸	۲۶	۲۸	۲۸	۲۸	۲۸	۲۸	۲۸	
Hayola308	P.p.11	۶۹	۴۳	۳۴	۲۱	۲۸	۲۸	۷۹	۳/۳	۶۷	۲۲	۲۴	
	P.p.108	۸۲	۵۲	۴۴	۶۵	۵۶	۵۶	۸۵	۴/۳	۷۷	۳۱	۳۸	
	P.p.169	۵۸	۳۳	۳۱	۲۷	۳۰	۲۷	۷۵	۲/۵	۶۷	۱۸	۱۹	
	P.p.196	۸۷	۳۹	۳۴	۳۲	۲۴	۲۴	۸۶	۲/۸	۷۶	۲۱	۲۴	
	شاهد	۹۱	۴۷	۵۷	۳۵	۳۸	۳۸	۱۰۳	۲/۸	۱۰۳	۲۳	۳۰	
RGS003	P.p.11	۹۵	۶۱	۶۸	۴۶	۴۱	۴۱	۱۰۸	۳	۸۸	۳۶	۳۴	
	P.p.108	۸۸	۵۸	۶۶	۶۳	۴۰	۴۰	۱۲۳	۳	۹۰	۳۱	۴۷	
	P.p.169	۹۵	۵۱	۶۱	۵۵	۴۸	۴۸	۱۲۲	۲/۵	۸۸	۴۰	۳۳	
	P.p.196	۹۳	۵۵	۶۱	۶۴	۵۱	۵۱	۱۱۳	۳/۳	۸۲	۳۷	۴۸	
	LSD(0.05)	۸/۹	۸/۳	۹/۷	۹/۷	۸/۳	۸/۹	۳/۷	۱/۱	۸/۹	۸/۳	۹/۷	

فهرست منابع:

1. Ashraf, M., and McNielly, T. 2004. Salinity tolerance in *Brassica* oilseeds. Crit. Rev. Plant Sci. 23 : 157–174.
2. Belimov, A. A., Safronova, V. I., Sergeyeva, T. A., Egorova, T. N., Matveyeva, V. A., Tsyganov, V. E., Borisov, A. Y., Tikhonov, I. A., Kluge, C., Preisfeld, A., Deitz, K. J., and Stepanok, V. V. 2001. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. Can. J. Microbiol. 47:642-652.
3. Belimov, A. A., Hontzeas, N., Safronova, V. I., Demechinskaya, S. V., Piluzza, G., Bullita, S., and Glick, B. R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth promoting bacteria associated with roots of Indian mustard (*Brassica juncea* Czern). Soil Biol. Biochem. 37:241-250.
4. Benizri, E., Courtade, A., Picard, C., and Guckert, A. 1998. Role of maize root exudates in the production of auxines by *Pseudomonas fluorescens* M.3.1. Soil Biol. Biochem. 30:1481-1484.
5. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-255.
6. Burd, G. I., Dixon, D. G., and Glick, B. R. 1998. A plant growth promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3663–3668.
7. Burd, G. I., Dixon, D. G., and Glick, B. R. 2000. Plant growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Can. J. Microbiol. 46:237–245.
8. Dell'Amico, E., Cavalca, L., and Andreoni, V. 2005. Analysis of rhizobacterial communities in perennial *Graminaceae* from polluted water meadow soil, and screening of metal-resistant, potentially plant growth-promoting bacteria. FEMS Microbiol. 52:153-162.
9. Dewan, M. L. and Famuri, J. 1964. The Soils of Iran, FAO. Rome.
10. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M., and Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to Canary Island. Plant Soil 266:261-272.
11. Dworkin, M., and Foster, J. 1958. Experiments with some microorganisms which utilize ethane and hydrogen. J. Bacteriol., 75:592-601.
12. Flowers, T. J., and Yeo, A. R. 1995. Breeding for salt tolerance in crop plant: Where next? Aust. J. Plant Physiol. 22:875-884.
13. Frankenberger, W. T., and Arshad, M. 1995. Phytohormones in Soils: Production and Function. Marcel Dekker, Inc., New York.
14. Ghassemi, F., Jakeman, A. J., and Nik, H. A. 1995. Salinisation of Land Water Resources. Human Causes, Extent, Management and Case Studies. University of New South Wales Press, Sydney, Australia.
15. Glick, B. R., Jacobson, C. B., Schwarze, M. M. K., and Pasternak, J. J. 1994. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Can. J. Microbiol. 40: 911–915.
16. Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth promotion by free living bacteria. Can. J. Microbiol. 41:109-117.
17. Glick, B. R., Karaturovic, D., and Newell, P. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth-promoting rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 41: 533–536.
18. Glick, B. R., Liu, C., Ghosh, S., and Dumbroff, E. B. 1997. Early development of canola seedlings rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. Soil Biol. Biochem. 29:1233-1239.
19. Glick, B. R., Penrose, D. M., and Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth promoting bacteria. J. Theor. Biol., 190:63-68.

20. Grichko, V.P., Filby, B., and Glick, B.R. 2000. Increased of transgenic plants expressing the bacterial enzyme ACC Deaminase to accumulate Cd, Co, Cu, Ni, Pb, and Zn. *J. Biotech.* 81:45-53.
21. Grichko, V.P., and Glick, B.R. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC Deaminase-containing plant growth promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* 39:11-17.
22. Hall, J.A., Penrose, D., Ghosh, S., and Glick, B.R. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Israel J. Plant Sci.*, 44:37-42.
23. Honma, M., and Shimomura, T. 1978. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric. Biol. Chem.* 42: 1825–1831.
24. Kende, H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:283-307.
25. King, E. O., Ward, M. K., and Raney, D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301-307.
26. Li, J., Ovakim, D.H., Charles, T.C., and Glick, B.R. 2000. An ACC Deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Curr. Microbiol.* 41:101-105.
27. Luria, S.E., and Burrous, J.W. 1955. Hybridization between *Escherichia coli* and *Shigella*. *J. Bacteriol.* 74: 461-476.
28. Lynch, J., and Brown, K.M. 1997. Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Physiol. Plant* 100: 613–619.
29. Ma, W., Sebestianova, S., Sebestian, J., Burd, G.I., Guinel, F., and Glick, B.R. 2003. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate in deaminase in Rhizobia spp. *Anton. Van Leeuwenhoek* 83: 285–291.
30. Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. 2004a. Plant Growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* 42:565-572.
31. Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. 2004b. Plant growth promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* 166:524-530.
32. Patten, C. L., and Glick, B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42:207–220.
33. Patten, C.L., and Glick, B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system, *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 3795–3801.
34. Penrose, D.M. 2000. The role of ACC Deaminase in plant growth promotion Ph.D. Thesis, University of Waterloo, Canada.
35. Penrose, D. M., Moffat, B. A., and Glick, B. R. 2001. Determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) to assess the effects of ACC Deaminase-containing bacteria on roots of canola seedlings. *Can. J. Microbiol.* 47:77–80.
36. Penrose, D.M., and Glick, B.R. 2003. Method for isolating and characterizing ACC Deaminase containing plant growth promoting rhizobacteria, *Physiologia Plantarum* 118:10-15.
37. Poustini, K. and Siosemardeh, A. 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. *Field Crops Res.* 85:125-133.
38. Saravanakumar, D. and Samiyappan, R. 2007. ACC Deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arechis hypogea*) plant. *J. Appl. Microbiol.*, 102:1283-1292.
39. Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Barka, E., Wang-Pruski, G., Faure, D., Reiter, B., Glick, B.R., and Nowak, J. 2005. *Burkholderia phyto. rmins* sp. Nov., a novel plant associated bacterium with plant beneficial properties. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1187–1192.
40. Stougaard, J. 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol* 124, 531–540.

41. Wang, C., Knill, E., Glick, B. R., and Defago, G. 2000. Effects 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.
42. Whipps, J. M. 1990. Carbon-utilization. In: Lynch, J. M. (ed.). *The Rhizosphere*. Chichester. Wiley Interscience, pp. 59-97.
43. Yang, S. F., and Hoffman, N. E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plant. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35:155-189.
44. Yeo, A. R. 1999. Predicting the interaction between the effects of salinity and climate change on crop plants. *Sci. Hortic. (Amsterdam)* 78: 159-174.