علوم گیاهان زراعی ایران
دورۀ ۴۵، شمارۀ ۳، پاییز ۱۳۹۳ (ص ۳۷۶-۳۶۷)

کارایی برخی جدایه‌های ریزوبیومی بومی مولد ACC-دآمیناز در تعدیل تأثیرات سوء اتیلن تنشی بر شاخص‌های رشد کلزا (*Brassica napus* L.)

داود سقفی[1]، حسینعلی علیخانی[2*] و بابک متشرع‌زاده[3]
۱، ۲ و ۳. کارشناس ارشد، استاد و استادیار گروه علوم و مهندسی خاک،
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱/۱۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۷/۲۰)

چکیده

در این پژوهش، توانایی ۳۲ جدایۀ ریزوبیومی بومی (۲۶ جدایه متعلق به گونۀ سینوریزوبیوم ملیلوتی (Sm)، ۴ جدایه متعلق به گونۀ ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار فازئولی (Rlp) و ۲ جدایه متعلق به گونۀ ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار ویسیه (Rlv) متحمل به شوری، برای استفاده از ACC به‌عنوان تنها منبع تأمین‌کنندۀ نیتروژن در محیط کشت RMM ارزیابی شد. براساس نتایج، ۲۵ جدایه برای ACC-دآمیناز مثبت ارزیابی شدند و جدایه‌ها براساس رشد در محیط RMM حاوی ACC در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند. در مرحلۀ بعد، آزمون گلخانه‌ای در گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تهران در سال ۱۳۹۰، با هدف بررسی کارایی ۲ جدایۀ قوی (R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm*)، ۱ جدایۀ ضعیف (R۲۹*Sm*) و به‌همراه تیمار شاهد، برای بهبود شاخص‌های رشد کلزا تحت تنش شوری ۰، ۳، ۶ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. نتایج نشان داد مایه‌زنی با جدایۀ R۲۸۱*Rlp* حتی در شوری ۹ دسی‌زیمنس بر متر، به‌طور معنی‌داری وزن تر و خشک ریشه (به‌ترتیب ۳۲ و ۶۲/۶ درصد)، وزن تر و خشک اندام هوایی (۲۲ و ۲۳/۵ درصد)، ارتفاع بوته (۴۹ درصد) و جذب نیتروژن (۵۰ درصد) را نسبت به شاهد افزایش داد. همچنین در این سطح شوری، مایه‌زنی با R۱۰۳*Sm* جذب فسفر را ۳۴/۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داد. همبستگی مثبتی بین فعالیت ACC-دآمیناز جدایه‌ها و شاخص‌های رشد گیاه به‌ویژه زیست‌تودۀ ریشه مشاهده شد (ضریب همبستگی پیرسون >۰/۸۲). این نتایج نشان می‌دهد مایه‌زنی با جدایه‌های دارای فعالیت بالای ACC-دآمیناز در افزایش شاخص‌های رشد کلزا موفق‌تر عمل می‌کند و تأکیدی بر این است که استفاده از این جدایه‌ها می‌تواند به‌عنوان راهکار بیولوژیک در کاهش تأثیرات تنش شوری مطرح باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های ریزوبیومی، تنش شوری، شاخص‌های رشدی، ACC-دآمیناز.

مقدمه

اتیلن مادۀ تنظیم‌کنندۀ رشد مهمی است که تقریباً در تمام گیاهان و دامنۀ گسترده‌ای از پاسخ‌های گیاهی مختلف و فرایندهای توسعه تولید می‌شود و فرایندهایی مانند افزایش رشد ریشه و تشکیل تار کشنده، تحریک جوانه‌زنی و شکستن خواب بذر، رسیدگی میوه، پیری گل‌ها و ریزش برگ‌ها را تنظیم می‌کند (Ma *et al.*, 2003)، اتیلنی که تحت تنش‌های محیطی مثل شوری

* تلفن: ۰۹۱۲۱۰۵۷۵۶۲
E-mail: halikhan@ut.ac.ir

تولید می‌شود، در اصطلاح اتیلن تنشی نامیده می‌شود و افزایش غلظت آن موجب می‌شود که گیاهان قادر به رشد در شرایط نا مساعد محیطی نباشند (Van Loon & Glick, 2004). همچنین اتیلن تنشی از طریق کاهش رشد ساقه و ریشه، به کاهش محصول منجر می‌شود (Li *et al.*, 2005). تحت تنش‌های محیطی مختلف، گیاهان با تولید ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC) که پیش‌مادهٔ تولید اتیلن است، به تنش‌ها پاسخ می‌دهند (Glick *et al.*, 2007). گاهی ACC به فراریشه ترشح شده و دوباره به‌وسیلهٔ ریشه‌ها جذب می‌شود و در نهایت به اتیلن تبدیل می‌شود. تجمع اتیلن مانع رشد ریشه شده، به محدودیت استفاده از آب و کاهش جذب عناصر غذایی منجر می‌شود (Li *et al.*, 2005). بنابراین هر عاملی که بتواند غلظت اتیلن گیاهان را تعدیل کند، سبب افزایش رشد و توسعهٔ گیاهان می‌شود.

انواعی از باکتری‌های ریشه‌ای محرک رشد (PGPR[1]) با توانایی تجزیهٔ ACC در فراریشه، مانع تجمع اتیلن شده و موجب برقراری سیستم ریشه‌ای سالم و قوی برای مقابله با تنش‌های محیطی می‌شوند (Mayak *et al.*, 2004b). اولین گام در کاهش غلظت اتیلن به‌وسیلهٔ PGPR، تخریب اتیلن به‌وسیلهٔ آنزیم ACC-دآمیناز است، این آنزیم مانع از اثرهای مضر اتیلن تنشی می‌شود. باکتری‌های فراریشه‌ای مولدACC-دآمیناز متعلق به جنس‌های آکروموباکتر، آزوسپیریلوم، باسیلوس، انتروباکتر و سودوموناس از خاک‌های مختلف جداسازی شده‌اند (Viveros *et al.*, 2010). طی تحقیقی مشاهده شد تحت تنش شوری گیاهک‌های نخودفرنگی مایه‌زنی‌شده با باکتری‌های مولد ACC-دآمیناز اثرهای منفی ACC را بر رشد گیاه کاهش دادند و سبب افزایش ارتفاع گیاه و طول ریشه شدند (Shaharoona *et al.*, 2007). در تحقیق دیگری، گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی‌شده با باکتری *Achromobacter piechaudii* مولدACC –دآمیناز تحت شرایط تنش شوری و خشکی بررسی شد. نتایج نشان داد وزن تر و خشک گیاهان مایه‌زنی‌شده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (Mayak *et al.*, 2004a,b). همچنین گزارش شده است که تحت شرایط تنش شوری، گیاهچه‌های نخودفرنگی پاسخ سه‌گانه (کاهش در ارتفاع نهال، افزایش قطر و تغییر جهت) نشان دادند و مایه‌زنی با باکتری‌های مولد ACC-دآمیناز اثرهای منفی شوری (ناشی از اتیلن تنشی) را کاهش داد (Nadeem *et al.*, 2010). تحقیقات ثابت کرده است که ریزوبیوم‌ها نیز فعالیت‌های محرک رشدی (از جمله تولید آنزیم ACC-دآمیناز) را با گیاهان غیرلگوم نشان می‌دهند (Mehboob *et al.*, 2008). اولین گزارش در مورد توان تولید ACC-دآمیناز در ریزوبیوم‌ها مربوط به (Ma *et al.*, 2003) است. این پژوهشگران ۱۳ جدایهٔ ریزوبیومی را برای بررسی فعالیت ACC-دآمیناز آزمون کردند و از آن میان ۵ جدایه دارای این آنزیم تشخیص داده شد.

در بیشتر مناطق ایران به‌دلیل کمبود بارندگی و استفادهٔ بی‌رویه از منابع آب‌های در دسترس (مانند آب‌های زیرزمینی)، اغلب خاک‌ها شورند، که در چنین شرایطی تجمع نمک و سمیت سدیم از یک طرف و اتیلن تنشی تولیدشده از طرف دیگر، به کاهش رشد و عملکرد گیاهان منجر می‌شود. بنابراین به‌کارگیری روش‌های مناسب کشت، برای نیل به کشاورزی پایدار با وجود آب‌های شور ضروری به‌نظر می‌رسد (Al-Karaki, 2006). بی‌شک، بهترین راه حل مناسب در چنین شرایطی استفاده از زادمایهٔ باکتری‌های بومی مقاوم به شوری است (Bacilio *et al.*, 2004) که می‌توانند رشد و کارایی بیشتری را در خاک همان منطقه نشان دهند. ازاین‌رو این پژوهش به‌منظور بررسی کارایی برخی جدایه‌های ریزوبیومی بومی مولد ACC-دآمیناز در تعدیل اثرهای سوء اتیلن تنشی بر شاخص‌های رشد کلزا در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای اجرا شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۹۰-۱۳۸۹ در گلخانهٔ گروه مهندسی علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا شد. تیمارها شامل: ۱) شوری در چهار سطح S_0، S_1، S_2 و S_3 (به‌ترتیب ۰، ۳، ۶ و ۹ دسی‌زیمنس‌برمتر) و ۲) نوع باکتری در چهار سطح (R۲۸۱*Rlp*، R۱۰۳*Sm*، R۲۹*Sm* و control)، بود.

1. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

آزمون آزمایشگاهی

باکتری‌های مورد استفاده و آماده‌سازی زادمایه

در این تحقیق ۱۰۰ جدایهٔ ریزوبیومی (۳۰ جدایهٔ ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار فازئولی (Rlp)، ۳۰ جدایهٔ ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار ویسیه (Rlv) و ۴۰ جدایهٔ سینوریزوبیوم ملیلوتی (Sm)) جداشده از خاک‌های زیرکشت لگوم‌ها در منطقهٔ اطراف کرج، که در بانک ژن گروه مهندسی علوم خاک دانشگاه تهران نگهداری می‌شوند، انتخاب شد. برای اجرای هر آزمون ابتدا زادمایهٔ هر جدایهٔ باکتری در محیط کشت YMB[1] تهیه شد. سپس جمعیت باکتری در تمامی سوسپانسیون‌ها در ۴×۱۰^{۹} $cfu.ml^{-1}$ تنظیم شد، تا تعداد یکسان سلول ریزوبیومی زنده برای اجرای هر یک از آزمون‌های مورد نظر فراهم شود.

آزمون تحمل به شوری جدایه‌ها

به‌منظور بررسی میزان تحمل جدایه‌ها به شوری از محیط کشت YMA با ترکیبی از غلظت متفاوت املاح NaCl و $MgCl_۲$ (با نسبت مولی ۱به۱) استفاده شد. با استفاده از فرمول ۱ مقدار مورد نیاز از املاح مذکور برای تأمین شوری‌های با EC (۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ دسی‌زیمنس بر متر) محاسبه شد. ابتدا محیط‌های کشت حاوی نمک در شرایط استریل در ظرف‌های پتری توزیع شد و جدایه‌ها با سه تکرار تلقیح شدند و ظرف‌های پتری پس از درزگیری، داخل انکوباتور و دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس گذاشته شدند. در مرحلهٔ بعد قطر کلونی جدایه‌های رشدیافته در سطوح مختلف شوری، پس از ۱۲ روز اندازه‌گیری شد و جدایه‌ها در چهار گروه حساس (عدم رشد در ۱۰ دسی‌زیمنس به بالا)، نیمه‌حساس (عدم رشد در ۲۰ دسی‌زیمنس به بالا)، نیمه‌متحمل (عدم رشد در ۳۰ دسی‌زیمنس به بالا) و متحمل (توان رشد در ۴۰ دسی‌زیمنس بر متر) تقسیم‌بندی شدند.

$$TDS\ (mg/L) = ۶۴۰\times EC\ (dS/m) \qquad (۱$$

آزمون نیمه‌کمی توان تولید آنزیم ACC- دآمیناز

برای این آزمون فقط جدایه‌های متحمل به شوری انتخاب شدند. در این آزمایش از سه سری ظرف‌های پتری حاوی محیط کشت پایه RMM[2] استفاده شد: ۱) ظروف پتری حاوی محیط کشت پایه که ۱۰۰µl از محلول ACC (۰/۳ M) به‌عنوان منبع نیتروژنی اختصاصی به سطح هر کدام اضافه شد؛ ۲) ظروف پتری حاوی محیط کشت به‌علاوه ۱۰۰ µl از محلول NH_4Cl (۰/۳ M) به‌عنوان منبع نیتروژنی قابل جذب، این سری از ظرف‌های پتری به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد؛ ۳) ظرف‌های پتری حاوی محیط کشتRMM که هیچ‌گونه منبع نیتروژنی (NH_4Cl یا ACC) به سطح آنها اضافه نشد، این سری از محیط‌ها در واقع شاهد منفی به‌شمار می‌آیند. در قسمت پشت هر ظرف پتری، ۹ نقطه با فواصل یکسان از هم، نشانه‌گذاری شدند و هر نقطه توسط یک جدایهٔ ریزوبیومی، در سه تکرار مایه‌زنی شد. محیط‌های مایه‌زنی‌شده به‌مدت ۱۲ روز در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس درون انکوباتور قرار داده شدند. مقدار رشد جدایه‌ها پس از ۱۲ روز ارزیابی شد. برای این منظور اندازهٔ کلونی باکتری‌های ریزوبیومی رشدیافته بر روی محیط RMM + ACC در مقایسه با محیط‌های شاهد مثبت($RMM + NH_4Cl$) و شاهد منفی (RMM)، درجه‌بندی شدند (Penrose & Glick, 2001). در مرحلهٔ بعد جدایه‌های دارای توان تولید ACC-دآمیناز در سه گروه قوی، متوسط و ضعیف طبقه‌بندی شدند و دو جدایه از گروه قوی و یک جدایه از گروه ضعیف برای آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند.

آزمون کمی توان تولید IAA

توان تولید IAA جدایه‌های انتخاب‌شده برای آزمون گلخانه‌ای، در محیط DF[3] حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر ال- تریپتوفان با سه تکرار بررسی شد. بعد از ۷۲ ساعت، مقدار تولید IAA توسط هر جدایه از مقایسهٔ جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد تهیه‌شده در غلظت‌های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر IAA محاسبه شد (Patten & Glick, 2002).

آزمون گلخانه‌ای

برای کشت گلخانه‌ای از منطقهٔ اطراف کرج نمونه خاک

1. Yeast extract Mannitol Broth

2. Rhizobium Minimal Medium

3. DF Salt minimal medium

مرکب از عمق ۰-۳۰ سانتی‌متر تهیه شد و از الک ۴ میلی‌متری عبور داده شد. همچنین نمونه‌ای از خاک بعد از عبور دادن از الک ۲ میلی‌متری، برای اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکی و شیمیایی (بافت به روش هیدرومتر، ظرفیت زراعی توسط دستگاه صفحات فشاری، مادهٔ آلی به روش والکلی بلک، کربنات کلسیم به روش کلسیمتری، نیتروژن به روش کجلدال، فسفر به روش اولسن و پتاسیم به روش استات آمونیوم) براساس روش‌های متداول (Ehyaee & Behbahani Zadeh, 1993) مورد تجزیه قرار گرفت و نیاز غذایی گیاه با توجه به نتایج آزمون خاک و براساس توصیهٔ کودی تأمین شد (Khademi *et al.*, 2000). در مرحلهٔ بعد مقدار ۵ کیلوگرم خاک الک‌شده به‌ازای هر گلدان توزین و درون کیسه‌های پلاستیکی ریخته شد. در این آزمایش از بذر کلزای رقم RGS003 که از بذر مادری تولید شده‌اند، تهیه‌شده از مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج استفاده شد. بذرهای کلزا به‌مدت ۳۰ ثانیه در الکل ۹۶ درصد و بعد به‌مدت ۱/۵- ۲ دقیقه در محلول هیپوکلریت ضدعفونی سطحی و ۷- ۸ مرتبه با آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. سپس بذرها برای جوانه‌دار شدن درون ظرف‌های پتری استریل حاوی آب آگار، درون انکوباتور با دمای ۲۶ تا ۲۸ درجهٔ سلسیوس گذاشته شدند. پس از ۲۴ ساعت هنگامی که ریشه‌چه‌ها ظاهر شدند، پنج بذر در هر گلدان کشت شد و مقدار یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون کشت تازهٔ هر جدایه پای هر بذر جوانه‌دارشده مایه‌زنی شد و برای تیمار شاهد منفی (control) از YMB بدون باکتری اضافه شد. پس از ظهور گیاهچه‌ها، تعداد آنها به دو عدد در هر گلدان کاهش داده شد.

اعمال تنش شوری در تمام سطوح (تیمارها) دو هفته بعد از سبز شدن بذرها با استفاده از محلول مخلوط املاح NaCl و $MgCl_2$ انجام گرفت. همچنین آبیاری گلدان‌های تحت تنش به روش وزنی و در دامنهٔ رطوبتی ۷۰ تا ۸۰ درصد ظرفیت زراعی صورت گرفت تا هیچ‌گونه تنش رطوبتی به گیاه وارد نشود. دمای گلخانه در طول دورهٔ رشد در محدودهٔ ۲۴ تا ۳۲ درجهٔ سلسیوس و نور گلخانه توسط ترکیبی از لامپ‌های هالوژن زرد و سفید به‌طور یک‌درمیان به مقدار متوسط ۱۳۰۰۰ لوکس و با طول دورهٔ روشنایی ۱۴ ساعت در روز تنظیم شد.

پس از رشد کافی گیاهان کلزا طی یک دورهٔ ۴/۵ ماهه، بوته‌ها برداشت و صفات زیر ارزیابی شدند: وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی، ارتفاع و غلظت فسفر به روش رنگ‌سنجی در طول موج ۴۳۰ نانومتر از طریق اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV3100) و نیتروژن کل با روش هضم به‌وسیلهٔ دستگاه کجلدال اندازه‌گیری شد (Emami, 1996; Cottenie, 1980). پس از اندازه‌گیری غلظت عناصر ماکرو (گرم در ۱۰۰گرم مادهٔ خشک)، نسبت جذب (میلی‌گرم به ازای هر گلدان) نیتروژن و فسفر براساس وزن خشک اندام هوایی محاسبه شد.

داده‌ها با نرم‌افزار SAS تجزیه و میانگین‌ها نیز با روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد به‌وسیلهٔ نرم‌افزار MSTAT-C مقایسه شدند.

نتایج آزمون آزمایشگاهی

بر اساس نتایج حاصل، با افزایش سطوح شوری از مقدار رشد جدایه‌ها کاسته شد. از ۱۰۰ جدایهٔ ریزوبیومی ۳۲ جدایه توانستند در شوری ۴۰ دسی‌زیمنس بر متر به‌خوبی رشد کنند و در گروه متحمل به شوری واقع شدند. به‌طوری‌که از ۳۲ جدایهٔ متحمل، اکثریت جدایه‌ها (۲۶ جدایه) به گونهٔ سینوریزوبیوم ملیلوتی (Sm)، ۴ جدایه به گونهٔ ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار فازئولی (Rlp) و ۲ جدایه به گونهٔ ریزوبیوم لگومینوزاروم بیووار ویسیه (Rlv) تعلق داشتند (شکل ۱).

نتایج نشان داد که جدایه‌های ریزوبیومی بومی توان تولید ACC-دآمیناز را دارند. از ۳۲ جدایهٔ متحمل منتخب برای این آزمون، ۲۵ جدایه (۷۸ درصد) توانستند از ACC به‌عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کنند. با این حال، این توانایی در بین جدایه‌ها یکسان نبود (جدول ۱). در این پژوهش، قطر کلونی هر جدایهٔ رشدیافته بر روی محیط کشت RMM حاوی ACC بعد از دوازده روز، بیانگر وجود آنزیم ACC-دآمیناز در این جدایه‌ها است. از این نظر جدایه‌ها براساس قطر کلونی، در سه گروه ضعیف (۰< قطر کلونی< یک دوم شاهد مثبت)، متوسط (یک دوم شاهد مثبت < قطر کلونی<

شاهد مثبت)، قوی (قطر کلونی > شاهد مثبت) گروه‌بندی شدند. با اینکه NH_4Cl یک منبع نیتروژنی مناسب برای اکثر ریزوبیوم‌ها است، در جدایه‌های قوی، قطر کلونی در محیط ACC+RMM خیلی بزرگ‌تر از قطر کلونی در محیط NH_4Cl+RMM است (شکل ۲)، که بر فعالیت بالای ACC-دآمیناز در این جدایه‌ها دلالت دارد. همچنین، مشاهده می‌شود که در محیط عاری از منبع نیتروژنی (شاهد منفی) جدایه‌ها رشد کرده‌اند که احتمالاً به‌دلیل لیز شدن سلول‌ها باشد که منبع نیتروژنی کافی را برای رشد و توسعهٔ کلونی فراهم می‌آورد.

نتایج آزمون توان تولید IAA در جدایه‌های منتخب برای شرایط گلخانه‌ای، نشان داد هر سه جدایه توانایی تولید IAA را دارند. جدایهٔ R۲۸۱*Rlp* با تولید ۱۰/۲ میلی‌گرم در لیتر در ردهٔ اول قرار گرفت و جدایه‌های R۲۹*Sm* و R۱۰۳*Sm* به‌ترتیب با تولید ۱/۸ و ۱/۲۶ میلی‌گرم در لیتر، سطح یکسانی از IAA را نشان دادند.

نتایج آزمون خصوصیات فیزیکوشیمیایی و زیستی خاک مورد استفاده با بافت لوم به شرح زیر است: واکنش (pH=8/10)، شوری (EC=1/28ds/m)، درصد ظرفیت زراعی (۱۶ درصد)، کربنات کلسیم معادل (۸/۲ درصد)، مادهٔ آلی (۰/۰۷۵ درصد)، نیتروژن کل (۰/۰۵۳ درصد)، فسفر قابل جذب (۵/۶mg/kg)، پتاسیم قابل جذب (۲۳۰mg/kg)، آهن، روی، منگنز و مس قابل استخراج با DTPA به‌ترتیب ۱/۶۷، ۱/۳۸، ۳/۵۷ و ۱/۶۱ (mg/kg)، سدیم محلول (۲meq/l) و جمعیت کل میکروبی ($۲/۵\times ۱۰^{۵}$cfu/gr.soil).

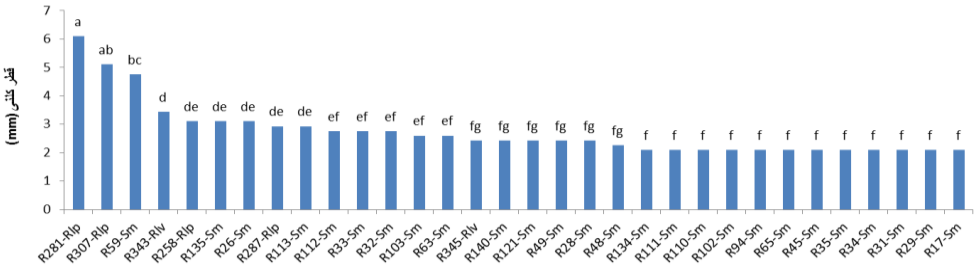
نتایج آزمون گلخانه‌ای

نتایج تجزیهٔ آماری نشان داد در سطح شوری .S هر سه جدایهٔ R۲۸۱*Rlp*، R۱۰۳*Sm* و R۲۹*Sm* وزن تر اندام هوایی را افزایش دادند که به‌ترتیب ۲۴، ۱۴/۵ و ۱۰ درصد بیشتر از تیمار شاهد بود. در سطح شوری $S_۱$ جدایهٔ R۲۸۱*Rlp* با افزایش ۱۳ درصد کارایی بهتری نشان داد. در شوری $S_۲$ افزایش ۲۲/۷، ۱۷ و ۹/۸ درصد در وزن تر اندام هوایی به‌ترتیب در جدایه‌های R۲۸۱*Rlp*، R۱۰۳*Sm* و R۲۹*Sm* مشاهده شد. در سطح $S_۳$ جدایه‌های R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* به یک اندازه در افزایش وزن تر اندام هوایی مؤثر بودند (۲۲ درصد). در شرایط طبیعی (.S) تیمارهای R۲۸۱*Rlp*، R۱۰۳*Sm* و R۲۹*Sm* به‌ترتیب ۲۵، ۱۲ و ۶ درصد افزایش معنی‌دار در وزن خشک اندام هوایی را نسبت به شاهد نشان دادند. در سطوح شوری $S_۱$ و $S_۲$ تیمار R۲۸۱*Rlp* به‌ترتیب با افزایش ۳۱/۷ و ۲۴/۸ درصد بیشترین کارایی را نشان داد. همچنین در سطح $S_۳$، افزایش ۲۳/۵، ۲۰ و ۱۴/۸ درصد در وزن خشک اندام هوایی به‌ترتیب از تیمارهای R۲۸۱*Rlp*، R۱۰۳*Sm* و R۲۹*Sm* به‌دست آمد (جدول ۲).

جدول ۱. گروه‌بندی جدایه‌های ریزوبیومی بر پایهٔ استفاده از ACC در محیط رشد

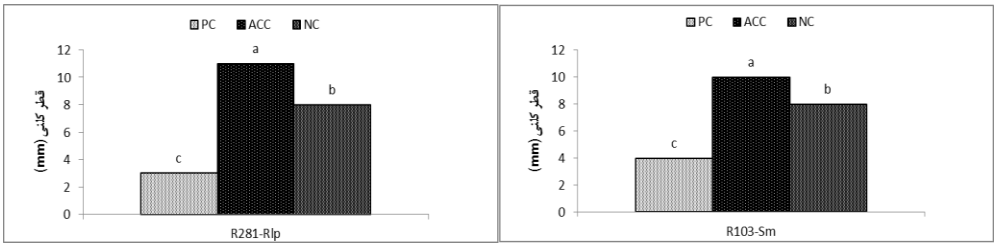
جدایه	قوی	متوسط	ضعیف	ACC-d⁻
R۳۰۷-*Rlp*	+	–	–	–
R۲۸۱-*Rlp*	+	–	–	–
R۱۰۳-*Sm*	+	–	–	–
R۱۳۵-*Sm*	+	–	–	–
R۲۸۷-*Rlp*	+	–	–	–
R۶۵-*Sm*	+	–	–	–
R۳۴۵-*Rlv*	+	–	–	–
R۴۹-*Sm*	+	–	–	–
R۶۳-*Sm*	+	–	–	–
R۳۳-*Sm*	–	+	–	–
R۱۴۰-*Sm*	–	+	–	–
R۳۵-*Sm*	–	+	–	–
R۳۱-*Sm*	–	+	–	–
R۱۰۲-*Sm*	–	+	–	–
R۱۱۳-*Sm*	–	+	–	–
R۳۴۳-*Rlv*	–	+	–	–
R۱۳۴-*Sm*	–	–	+	–
R۹۴-*Sm*	–	–	+	–
R۴۸-*Sm*	–	–	+	–
R۱۱۰-*Sm*	–	–	+	–
R۱۱۱-*Sm*	–	–	+	–
R۲۹-*Sm*	–	–	+	–
R۱۲۱-*Sm*	–	–	+	–
R۵۹-*Sm*	–	–	+	–
R۳۲-*Sm*	–	–	+	–
R۲۵۸-*Rlp*	–	–	–	+
R۲۸-*Sm*	–	–	–	+
R۴۵-*Sm*	–	–	–	+
R۳۴-*Sm*	–	–	–	+
R۲۶-*Sm*	–	–	–	+
R۱۷-*Sm*	–	–	–	+
R۱۱۲-*Sm*	–	–	–	+

ACC-d⁻: بدون آنزیم ACC-دآمیناز، +: حضور آنزیم، - : نبود آنزیم.



شکل ۱. مقایسهٔ میانگین قطر کلونی جدایه‌های ریزوبیومی در شوری ۴۰ دسی‌زیمنس بر متر

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.



شکل ۲. مقایسهٔ قطر کلونی جدایه‌های قوی روی محیط کشت حاوی ACC، NH_4Cl_2 (PC) و کنترل منفی (NC) بعد از دوازده روز.

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

جدول ۲. اثر تیمارهای باکتری بر شاخص‌های رشد کلزا در سطوح مختلف شوری

جدایه	وزن تر اندام هوایی (گرم)				وزن خشک اندام هوایی (گرم)			
	۰dS/m (S.)	۳dS/m (S_1)	۶dS/m (S_2)	۹dS/m (S_3)	۰dS/m (S.)	۳dS/m (S_1)	۶dS/m (S_2)	۹dS/m (S_3)
شاهد (control)	۶۶/۸۸ef	۶۳/۲gh	۵۵/۳k	۴۹/۲۹l	۲۲/۷۷d	۱۹/۵۷gh	۱۸/۱ij	۱۵/۳m
R۲۹*Sm*	۷۴/۰۸bc	۶۷/۳ef	۶۰/۷۶hi	۱۹/۵۴k	۲۴/۱۵c	۲۲/۰۵de	۲۰/۱۸fg	۱۷/۵۷jk
R۱۰۳*Sm*	۷۸/۳b	۶۷/۲۵ef	۶۴/۸fg	۶۰/۱۲ij	۲۵/۵b	۲۲/۵d	۲۰/۹۶ef	۱۸/۴ij
R۲۸۱*Rlp*	۸۳/۲a	۷۱/۵cd	۶۷/۹de	۶۰/۰۶ij	۲۸/۳۸a	۲۵/۷۸b	۲۲/۶d	۱۸/۹hi
جدایه	وزن تر ریشه (گرم)				وزن خشک ریشه (گرم)			
	۰dS/m (S.)	۳dS/m (S_1)	۶dS/m (S_2)	۹dS/m (S_3)	۰dS/m (S.)	۳dS/m (S_1)	۶dS/m (S_2)	۹dS/m (S_3)
شاهد (control)	۱۱fg	۹/۳hi	۸/۷ij	۷/۳jk	۲/۲۶fg	۱/۹۳hi	۱/۶jk	۱/۲۳l
R۲۹*Sm*	۱۱/۲fg	۱۰/۵gh	۹/۵hi	۷/۵jk	۳/۰۵cd	۲gh	۱/۶jk	۱/۳۳kl
R۱۰۳*Sm*	۱۵/۷ab	۱۳/۶cd	۱۲/۱ef	۹/۵hi	۳/۹a	۲/۷de	۲/۴۵ef	۱/۸۶hi
R۲۸۱*Rlp*	۱۶/۹a	۱۳de	۱۱/۷۶ef	۹/۶۶hi	۳/۵ab	۲/۵ef	۲/۳۳fg	۲gh

جدایه	ارتفاع (cm)			
	۰dS/m (S.)	۳dS/m (S_1)	۶dS/m (S_2)	۹dS/m (S_3)
شاهد (control)	۵۲cde	۴۹/۳efg	۴۳/۶hi	۲۹m
R۲۹*Sm*	۶۸/۵b	۵۵/۳cd	۴۲/۳ij	۳۴/۶klm
R۱۰۳*Sm*	۷۵b	۵۷cd	۴۸/۳efg	۴۱jk
R۲۸۱*Rlp*	۸۳/۳a	۵۸/۳c	۵۰/۳de	۴۳/۳hij

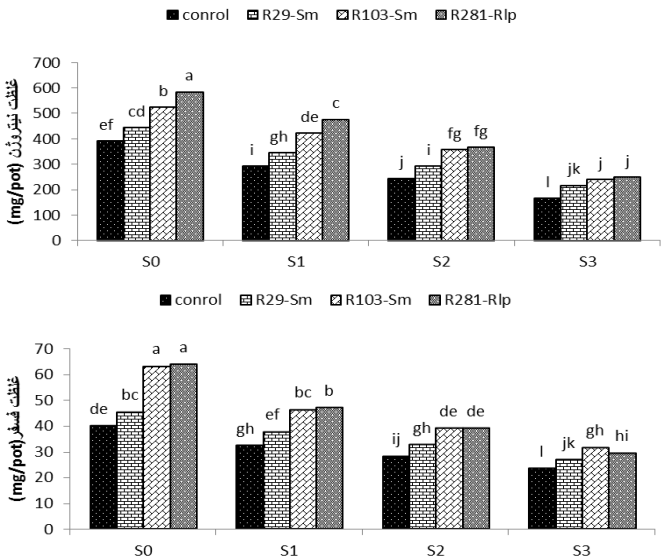
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دارند.

مایه‌زنی با جدایه‌های مولد ACC-دآمیناز وزن تر و خشک ریشه را به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد افزایش داد. نتایج مقایسهٔ میانگین برای وزن تر ریشه نشان داد، در شرایط طبیعی جدایه‌های R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* وزن تر

ریشه را ۵۳/۶ و ۴۲/۷ درصد افزایش دادند. در سطوح شوری S_1 و S_2 تیمار R۱۰۳*Sm* به‌ترتیب با افزایش ۴۶ و ۳۹ درصد در وزن تر ریشه مؤثرتر بود. همچنین در سطح شوری S_3، افزایش ۳۲ و ۳۰ درصد در وزن تر ریشه نسبت به شاهد به‌ترتیب در تیمارهای R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* مشاهده شد. در سطح .S، وزن خشک ریشه در تیمارهای باکتری ۷۲/۵، ۵۴/۸ و ۳۴/۹ درصد افزایش نشان داد که به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های R۱۰۳*Sm*، R۲۸۱*Rlp* و R۲۹*Sm* بود. در سطح S_1، وزن خشک ریشه در جدایه‌های R۱۰۳*Sm* و R۲۸۱*Rlp* به‌ترتیب ۳۹/۹ و ۲۹/۵ درصد بیشتر از شاهد بود. همچنین در سطح S_2، هر دو جدایهٔ مذکور وزن خشک ریشه را ۵۳ و ۴۵/۶ درصد افزایش دادند. در سطح S_3، R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* وزن خشک ریشه را ۶۲/۶ و ۵۱ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند (جدول ۲).

نتایج مقایسهٔ میانگین داده‌ها نشان داد سطح .S، R۲۸۱*Rlp*، R۱۰۳*Sm* و R۲۹Sm به‌ترتیب موجب افزایش ۶۰، ۴۴/۲ و ۳۱/۷ درصد در ارتفاع گیاه شدند. در سطح S_1، هر سه جدایه در یک گروه آماری واقع شدند و R۲۸۱*Rlp* با افزایش ۱۸ درصد در ارتفاع گیاه مؤثرتر بود. در سطح S_2، افزایش ۱۵/۳ و ۱۰/۷ درصد در ارتفاع گیاه به‌ترتیب در تیمارهای R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* مشاهده شد. همچنین این جدایه‌ها در سطح S_3 افزایش معنی‌داری (به‌ترتیب افزایش ۴۹ و ۴۲/۳ درصد در تیمارهای R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm*) را در ارتفاع گیاه نسبت به شاهد نشان دادند (جدول ۲).

نتایج مقایسهٔ میانگین نشان داد اثر تیمارهای باکتری بر مقدار جذب (میلی‌گرم در گلدان یا میلی‌گرم عنصر مورد نظر در ۵ کیلوگرم خاک گلدان) در نیتروژن و فسفر معنی‌دار است. در سطوح شوری .S و S_1، بیشترین مقدار جذب نیتروژن (به‌ترتیب افزایش ۴۹/۷ و ۶۳/۵ درصد نسبت به شاهد) از تیمار R۲۸۱*Rlp* به‌دست آمد. در سطح S_2، تیمارهای R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* به‌ترتیب با افزایش ۵۰ و ۴۵/۹ درصد در مقدار جذب نیتروژن در یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین در سطح S_3 نیز جدایه‌های مذکور تفاوت معنی‌دار با یکدیگر نشان ندادند که به‌ترتیب ۵۰ و ۴۴/۵ درصد افزایش در جذب نیتروژن را نسبت به شاهد داشتند. در مورد فسفر، بالاترین میانگین آن در سطح .S از تیمارهای R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* به‌دست آمد که به‌ترتیب ۶۰/۲ و ۵۸ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان دادند. در سطح S_1 جدایهٔ R۲۸۱*Rlp* بدون تفاوت معنی‌دار با R۱۰۳*Sm*، کارایی بهتری نشان داد که می‌تواند ناشی از خطای احتمالی در آزمایش باشد. R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm* با افزایش ۳۸ درصد در جذب فسفر، در سطح S_2 کارایی یکسانی داشتند. در سطح S_3، R۱۰۳*Sm* با افزایش ۳۴/۵ درصد نسبت به شاهد در مقام نخست قرار گرفت و در مرحلهٔ بعدی R۲۸۱*Rlp* قرار داشت (شکل ۳).



شکل ۳. مقایسهٔ میانگین اثر تیمارهای باکتری بر جذب نیتروژن و فسفر در سطوح مختلف شوری

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد فاقد تفاوت معنی‌دارند.

مطالعات همبستگی

همبستگی مثبتی (۰/۸۲<) بین فعالیت ACC-دآمیناز جدایه‌ها و شاخص‌های رشد گیاه مشاهده شد (جدول۳). در سطوح شوری .S، S_1 و S_2 بیشترین همبستگی مثبت معنی‌دار در شاخص‌های وزن تر ریشه و جذب فسفر و نیتروژن به‌دست آمد. در سطح شوری S_3 نیز بالاترین همبستگی مربوط به شاخص‌های وزن تر و خشک ریشه، وزن تر اندام هوایی و ارتفاع گیاه بود.

جدول ۳. همبستگی بین فعالیت ACC-دآمیناز و شاخص‌های رشد گیاه کلزا

تیمار	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	ارتفاع	فسفر	نیتروژن
۰ds/m	۰/۹۸۶*	۰/۹ns	۰/۹۵۲*	۰/۹ns	۰/۹۲ns	۰/۹۹۸**	۰/۹۷۶*
۳ds/m	۰/۹۷۶*	۰/۹۵۲*	۰/۸۲ns	۰/۸۵ns	۰/۸۸ns	۰/۹۹۱**	۰/۹۷۷*
۶ds/m	۰/۹۸۵*	۰/۹۶۴*	۰/۹۵۹*	۰/۹۱ns	۰/۹۵۱*	۰/۹۸۲*	۰/۹۸۶*
۹ds/m	۰/۹۹۲**	۰/۹۸۱*	۰/۹۷۳*	۰/۹ns	۰/۹۸۲*	۰/۹۱ns	۰/۹۲ns

**، *، ns، به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد، ۵ درصد و غیرمعنی‌دار.

بحث

در این پژوهش سه جدایهٔ PGPR متحمل به شوری، براساس فعالیت ACC-دآمیناز، تحت سطوح شوری ۰، ۳، ۶ و ۹ دسی‌زیمنس بر متر برای آزمون گلخانه‌ای گیاه کلزا انتخاب شدند. در مجموع با افزایش شوری، رشد گیاه کاهش یافت. نتایج نشان داد مایه‌زنی جدایه‌ها وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و ارتفاع گیاه را حتی در سطوح شوری بالا (۹ دسی‌زیمنس بر متر) افزایش داد.

تحت تنش شوری، افزایش در غلظت اتیلن از رشد گیاه ممانعت می‌کند و با اثرگذاری در فازهای مختلف رشد سبزینگی گیاه، به کاهش رشد کلی منجر می‌شود. در موارد زیادی، حذف یا کاهش اثر اتیلن تنشی به کاهش اثر شوری منجر شده است (Nadeem *et al.*, 2010). احتمالاً جدایه‌های PGPR با توانایی تجزیهٔ ACC در ریشه، اثرهای بازدارندگی اتیلن درونی را کاهش می‌دهند (جدول ۱) و به توسعهٔ هرچه بهتر سیستم ریشه‌ای منجر می‌شوند، که متعاقباً تأثیر مثبتی بر رشد اندام هوایی می‌گذارد. همچنین، همبستگی مثبت معنی‌داری بین فعالیت ACC-دآمیناز جدایه‌ها و افزایش رشد ریشه در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (Shaharoona *et al.*, 2006). براساس نتایج حاصله، سه جدایهٔ متعلق به جنس‌های مختلف ریزوبیومی، کارایی متفاوتی در افزایش شاخص‌های رشد گیاه تحت تنش نشان دادند. در بین جدایه‌ها، مایه‌زنی با جدایهٔ R۲۸۱*Rlp* کارایی بهتری در تمام سطوح شوری نشان داد. در مرتبهٔ بعدی جدایهٔ R۱۰۳*Sm* قرار گرفت و جدایهٔ R۲۹*Sm* حداقل تأثیر را در شاخص‌های رشد گیاه داشت. تفاوت کارایی جدایه‌ها در افزایش شاخص‌های رشد احتمالاً به‌دلیل تفاوت آنها در کارایی کلونیزاسیون ریشه‌های جوانه‌زده و هیدرولیز ACC سنتزشده در ریشه‌ها باشد. بنابراین، کارایی بالای R۲۸۱*Rlp* می‌تواند مربوط به فعالیت بالای ACC-دآمیناز و کلونیزاسیون بهتر ریشه توسط این جدایه باشد که موجب شده است نسبت به جدایه‌های دیگر قدرت رقابتی بالایی تحت تنش شوری داشته باشد. محققان نشان دادند جدایه‌های با فعالیت بالای ACC-دآمیناز، توانایی بیشتری برای کلونیزاسیون ریشه دارند (Nadeem *et al.*, 2006). مشابه این نتایج، گزارش شده است جدایه‌هایی که توانایی بهتری در کلونیزاسیون ریشه دارند از جدایه‌های دیگر مؤثرترند (Shaharoona *et al.*, 2006).

طی تحقیقی، تحت تنش شوری در اثر مایه‌زنی PGPR (باسیلوس) در گیاه کاهو غلظت نیتروژن، فسفر و پتاسیم به‌ترتیب ۵، ۷۰ و ۵۰ درصد نسبت به شاهد افزایش نشان داد (Vivas *et al.*, 2003). همچنین، در آزمایشی اثر باکتری‌های مولد ACC-دآمیناز بر ترکیب یونی گیاه ذرت تحت تنش شوری بررسی شد. نتایج نشان داد غلظت نیتروژن و فسفر به‌ترتیب ۵۵ و ۵۶ درصد در اندام هوایی ذرت نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (Nadeem *et al.*, 2006). نتایج این پژوهش نیز نشان داد مایه‌زنی با جدایه‌های R۲۸۱*Rlp* و R۱۰۳*Sm*

به افزایش معنی‌دار تجمع فسفر و نیتروژن در اندام هوایی کلزا تحت تنش سطوح شوری منجر شد.

در این پژوهش، وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین فعالیت ACC-دآمیناز جدایه‌ها و شاخص‌های رشد گیاه (به‌ویژه زی‌توده) ثابت می‌کند که اثر افزایش رشد جدایه‌های مولد ACC-دآمیناز به‌دلیل کاهش سطح اتیلن درونی از طریق هیدرولیز ACC به‌وسیلهٔ ACC-دآمیناز باکتریایی بوده است که با یافته‌های سایر محققان همخوانی دارد (Li *et al.*, 2000; Shah *et al.*, 1998; Glick & Penrose, 1998). به‌علاوه، همبستگی مثبت و معنی‌داری بین فعالیت ACC-دآمیناز جدایه‌ها و تجمع فسفر و نیتروژن در اندام هوایی گیاه مشاهده شد. در تحقیقات سایر محققان نیز همبستگی مثبتی بین فعالیت ACC-دآمیناز جدایه‌ها و جذب فسفر مشاهده شده است (Mayak *et al.*, 2004a). در تأیید نتایج این پژوهش، محققان نشان دادند همبستگی مثبتی بین زی‌تودهٔ ریشه و اندام هوایی و تجمع نیتروژن با آنزیم ACC-دآمیناز وجود دارد (Marques *et al.*, 2010). همچنین نتایج نشان داد که توان تولید IAA توسط جدایه‌ها رابطهٔ مثبت مشخصی با رشد گیاهک ندارد. این تأیید می‌کند که ACC-دآمیناز احتمالاً عامل اولیه برای رشد گیاهک است که با گزارش‌های محققان دیگر همخوانی دارد (Ghosh *et al.*, 2003; Shaharoona *et al.*, 2006). به‌علاوه، با اینکه جدایه‌های R۱۰۳*Sm* و R۲۹*Sm* تقریباً سطح یکسانی IAA تولید کردند، جدایهٔ R۲۹*Sm* حداقل تأثیر را بر رشد گیاه داشت که این هم تأییدیهٔ دیگری است بر اینکه تولید ACC-دآمیناز، نه IAA، می‌تواند عامل اولیه برای رشد گیاه باشد.

نتیجه‌گیری کلی

مایه‌زنی با جدایه‌های مولد ACC-دآمیناز می‌تواند اثرهای منفی تنش شوری را بر گیاهچه‌های کلزا رشدیافته در محیط‌های شور کاهش دهد. این جدایه‌ها با القای مقاومت به شوری (با کاهش غلظت اتیلن تنشی در ریشه)، افزایش زیست‌تودهٔ سیستم ریشه‌ای و به‌تبع آن به جذب آب و عناصر غذایی از خاک منجر شده و در نهایت سبب افزایش رشد اندام هوایی گیاه می‌شوند. بنابراین پیشنهاد می‌شود استفاده از جدایه‌های با فعالیت بالای ACC-دآمیناز، می‌تواند به‌عنوان یک راهکار سازگار با محیط و اقتصادی در تعدیل اثرهای اتیلن تنشی ناشی از شوری مطرح باشد. با این حال، تحقیقات بیشتری لازم است تا کارایی این جدایه‌ها تحت تنش‌های محیطی مختلف، در شرایط طبیعی نیز مشخص شود.

REFERENCES

1. Ahemad, M. & Khan, M.S. (2011). Functional Aspects of Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Recent Advancements. *Insight Microbiology*, 1(3), 39-54.
2. Al-Karaki, G.N. (2006). Nursery inoculation of tomato with *arbuscular mycorrhizal* fungi and subsequent performance under irrigation with saline water. *Scientia Horticulturae*, 109, 1-7.
3. Bacilio, M., Rodriguez, H., Moreno, M., Hernandez, J.P. & Bashan, Y. (2004). Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a gfp-tagged *Azospirillum lipoferum*. *Biology & Fertility of Soils*, 40, 188-193.
4. Cottenie, A. (1980). Methods of Plant Analysis. In: *Soil and Plant Testing*. Pp, 64-100.
5. Ehyaee, M. & Behbahani zadeh, A.A. (1993). *The methods of soil chemistry analysis*. Vol (1), No (893), Soil and Water Research Institute, Tehran. Iran. (In Farsi)
6. Emami, A. (1996). *Methods of plant analysis*. Vol (1), No (982), Soil and Water Research Institute, Tehran. Iran. (In Farsi)
7. Ghosh, S., Penterman, J.N. & Little, R.D. (2003). Three newly isolated plant growth-promoting bacilli facilitate the seedling growth of canola, *Brassica campestris*. *Plant Physiol Biochem*, 41, 277-281.
8. Glick, B.R., Cheng, Z. & Park, E. (2007). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt. *Can J Microbiol*, 53, 912-918.
9. Glick, B.R., Penrose, D.M. & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. J Theor Biol, 190, 63-68.
10. Khademi, Z., Rezaee, H., Malakuti, M.J. & Milani, P. (2000). Balance nutrition of canola. Tehran. Iran. (In Farsi)
11. Li, J., Ovabin, D.H. & Charles, T.C. (2000). An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Curr Microbiol*, 41, 101-105.
12. Li, Q., Saleh-Lakha, S. & Glick, B.R. (2005). The effect of native and ACC deaminase-containing *Azospirillum brasilense* Cd1843 on the rooting of carnation cuttings. *Can J Microbiol*, 51, 511-514.

13. Ma, W., Sebestianova, S.B., Sebestian, J. & Burd, G.I. (2003). Prevaleance of ACC- deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie van Leeuwenhoek*, 83, 285-291.
14. Marques, P.G.C., Pires, C., Moreira, H., Rangel, O.S.S. & Castro, M.L. (2010), Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology & Biochemistry*, 42, 1229-1235.
15. Martínez-Viveros, O., Jorquera, M.A., Crowley, D.E., Gajardo, G. & Mora, M.L. (2010). Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promoting by rhizobacteria. *J Soil Sci, Plant Nutr*, 10(3), 293-319.
16. Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B.R. (2004a). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 42, 565-572.
17. Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B.R. (2004b). Plant growth-promoting that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci*, 166, 525-530.
18. Mehboob, I., Zahir, Z.A., Mahboob, A., Shahzad, S.M., Jawad, A. & Arshad. M. (2008). Preliminary screening of *rhizobium* isolates for improving growth of maize seedlings under axenic conditions. *Soil & Environment*, 27, 64-71.
19. Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M., Arshad, M. & Shahzad, S.M. (2006). Variation in growth and ion uptake of maize due to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria under salt stress. *Plant, Soil & Environment*, 25, 78-84.
20. Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M. & Ashraf, M. (2010). Microbial ACC-Deaminase: Prospects and Applications for Inducing Salt Tolerance in Plants. *Crit Rev Plant Sci*, 29, 360-393.
21. Patten, C.L. & Glick, B.R. (2002). Role of *pseudomonas putida* indole acetic acid in development of host plant root system. *Appl Environ Microbiol*, pp, 3795-3801.
22. Penrose, D.M. & Glick, B.R. (2001). Levels of ACC and related compounds in exudates and extracts of canola seeds treated with ACC-deaminase-containing plant growth promoting bacteria. *Can J Microbiol*, 47, 368-372.
23. Shah, S., Li, J. & Moffatt, B.A. (1998). Isolation and characterization of ACC-deaminase genes from two different plant grow-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol*, 44, 833-843.
24. Shaharoona, B., Arshad, M. & Khalid, A. (2007a). Differential response of etiolated pea seedlings to inoculation with rhizobacteria capable of utilizing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate or L-methionine. *J Microbiol*, 45, 15-20.
25. Shaharoona, B., Arshad, M. & Zahir, Z.A. (2006). Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 42, 155-159.
26. Van Loon, L.C. & Glick, B.R. (2004). Increased plant fitness by rhizobacteria. In: Sandermann H(d) Molecular ecotoxicology of plants, ecological studies, Springer, Berlin. 170, 177-205.
27. Vivas, A., Marulanda, A., Ruiz-Lozano, J.M., Barea, J.M. & Azcon, R. (2003). Influence of a *Bacillus sp* on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant response to PEG-induced drought stress. *Mycorriza*, 13, 249-256.
28. Glick, B.R., Penrose, D.M. & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria, *J Theor Biol*, 190, 63-68.