

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۵۲-۴۱  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۶

## جداسازی و غربالگری سویه‌های بومی ریزوبیوم تولیدکننده ACC دامیناز و سیدروفور

**بهناز اوژند:** دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران، behnaz.oujand@yahoo.com  
**محمود ملکی \*\*:** استادیار اصلاح نباتات، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، maleki.li@gmail.com  
**شهریار شاکری \*\*:** استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران، shahryar.shakeri@yahoo.com  
**صدیقه نوروزپور:** دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، ایران، sedighe.poorahmadi@yahoo.com  
**پروانه عابدی:** دانشجوی کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، parvanehabedi2008@gmail.com  
**عبدالحمید نمکی شوشتری:** دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران، genabns2@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** ریزوبیوم‌ها باکتری‌هایی هستند که با گیاهان زراعی خانواده لگوم همزیستی دارند. باکتری‌های ریزوبیومی علاوه بر تثبیت نیتروژن، قابلیت‌های دیگری از جمله توانایی تولید آمینو سیکلوپروپان کربوکسیلات (ACC دامیناز) و سیدروفور را دارند، در ایجاد گرهک‌های بیشتر در شرایط مختلف محیطی موفق‌تر خواهند بود. هدف از این مطالعه، غربال سویه‌های ریزوبیومی بومی تولیدکننده آنزیم ACC دامیناز و سیدروفور است.

**مواد و روش‌ها:** برای جداسازی سویه‌های ریزوبیومی تولیدکننده ACC دامیناز، سویه‌ها روی محیط M9 با دو منبع نیتروژن (ACC و NH<sub>4</sub>Cl) کشت داده شدند. همچنین محیط M9 فاقد نیتروژن نیز به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. براساس مقایسه آماری میزان رشد سویه‌ها در محیط M9 حاوی ACC نسبت به دو محیط دیگر، سویه‌های تولیدکننده ACC دامیناز شناسایی شدند. برای جداسازی ریزوبیوم‌های تولیدکننده سیدروفور از روش سنجش مایع (CAS) Chrome Azurol S استفاده شد. تمام تیمارها در دو تکرار انجام گرفت و آنالیز آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. برای شناسایی بهترین سویه‌های تولیدکننده ACC دامیناز و سیدروفور از روش توالی‌یابی ژن *16S rDNA* استفاده شد.

**نتایج:** در این مطالعه ۱۴ سویه ریزوبیوم به‌منظور تولید ACC دامیناز و سیدروفور جداسازی و غربالگری شدند. نتایج نشان داد که از بین همه سویه‌ها، فقط سویه R8 دارای توان تولید آنزیم ACC دامیناز بود و این سویه توانست رشد بهتری در محیط کشت M9+ACC نسبت به دو محیط M9 و M9+NH<sub>4</sub>Cl داشته باشد. در مرحله بعد با استفاده از روش سنجش مایع CAS مشخص شد که ۸ سویه توانایی تولید سیدروفور را دارند. از بین آن‌ها سویه R12 بیشترین میزان تولید سیدروفور را داشت. با توجه به نتایج آنالیز مولکولی، سویه‌های R8 و R12 به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شدند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** به احتمال زیاد وجود سویه R8 که دارای توانایی تولید ACC دامیناز است می‌تواند از آثار سوء اتیلن در هنگام گرهک‌زایی و نیز از تنش جلوگیری کند. از طرفی سویه R12 نیز که توانایی تولید سیدروفور را دارد علاوه بر تسهیل گرهک‌زایی و تأمین نیاز گیاه به آهن، می‌تواند اثر بازدارندگی بر پاتوژن‌های خاکزاد داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ریزوبیوم، ACC دامیناز، سیدروفور

\* نویسنده مسئول مکاتبات

\*\* گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران

Copyright© 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

## مقدمه

ریزوبیوم‌ها باکتری‌هایی هستند که پس از استقرار در داخل گرهک‌های ریشه، قادر به تثبیت نیتروژن هستند و از این طریق قسمتی از نیاز گیاه به نیتروژن را رفع می‌کنند (۱). برای سال‌های زیادی، باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن به‌عنوان همزیست‌های اختصاصی برای لگوم‌ها شناخته شدند؛ اما در دهه‌های اخیر مشخص شده است که ریشه‌خانواده گرامینه مثل برنج (*Oryza sativa*)، گندم (*Triticum aestivum*)، نیسکر (*Saccharum sp.*) و ذرت (*Zea mays*) نیز می‌توانند میزبان باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن باشند (۲-۴). مشخص شده است که این ارتباط باکتری-گیاه می‌تواند پتانسیل خوبی برای بهبود تولید گیاهان زراعی غیرلگوم از طریق افزایش بنیه گیاهچه، عملکرد، رشد و جذب مواد غذایی، فعالیت فتوسنتزی و محتوای نیتروژن فراهم کند (۴). اعتقاد بر این است که سودمندی ریزوبیوم‌ها در ارتباط با گیاهان غیرلگوم به دلیل فعالیت‌های دیگر این باکتری‌ها مثل افزایش جذب و فراهم کردن عناصر غذایی، تولید هورمون‌های رشد گیاهی، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید سیدروفورهای کلاته‌کننده آهن و تولید آنزیم ACC دامیناز است (۳ و ۵). اتیلن یک هورمون گیاهی مهم است که در بسیاری از فرایندهای فیزیولوژیکی مهم گیاهی مثل رسیدگی میوه‌ها، جوانه‌زنی، تمایز بافت و پیری و ریزش اندام‌های گیاهی شرکت می‌کند (۶). همچنین در شرایط تنشی نیز سطح اتیلن در داخل گیاه بالا می‌رود که به آن اتیلن تنشی گفته می‌شود و مشخص شده است که اتیلن از تولید سلول‌های ریشه و ساقه گیاه جلوگیری می‌کند (۷). باکتری‌های حاوی ACC دامیناز با تبدیل ACC (پیش‌ماده تولید اتیلن) به آمونیوم و آلفاکتوبوتیرات باعث کاهش سطح اتیلن می‌شوند (۸).

آزمایش‌ها نشان داده‌اند که گیاهانی که با باکتری‌های دارای آنزیم ACC دامیناز تلقیح شده‌اند، ریشه‌های طولی‌تری دارند و بهتر می‌توانند در مقابل آثار سوء اتیلن، تنشی روی رشد گیاه که بر اثر تنش‌های محیطی ایجاد می‌شود، مقاومت کنند (۹-۱۱). به دلیل اهمیت این نوع از ریزوباکتری‌ها تاکنون تلاش‌های زیادی برای جداسازی ریزوباکتری‌های تولیدکننده ACC دامیناز صورت گرفته است (۱۲-۱۴).

از طرف دیگر، آهن موجود در خاک چهارمین عنصر فراوان روی زمین است و اغلب به‌شکل آهن سه‌ظرفیتی ( $Fe^{+3}$ ) در خاک‌های هوازی که قابلیت انحلال در آن‌ها کم است، یافت می‌شود. در بیشتر مواقع، این مقدار آهن در این خاک‌ها، برای برطرف کردن نیاز گیاهان کافی نیست. به‌طور کلی با افزایش pH، قابلیت انحلال آهن سه‌ظرفیتی کاهش می‌یابد (۱۵). مشخص شده است که آهن در سیستم تثبیت‌کننده نیتروژن یعنی در سنتز کمپلکس آنزیم نیتروژناز، لگ هموگلوبین، فرودوکسین، هیدروژناز و سیتوکروم‌ها دخیل است (۱۶). بنابراین کمبود آهن ممکن است از طریق آسیب‌رساندن به زنده‌مانی ریزوبیوم و نیز استقرار گره‌های کارکردی روی تثبیت همزیستی اثر بگذارد (۱۶). مطالعات مختلف نشان داده‌اند که ترشح سیدروفورها به وسیله باکتری‌ها از طریق بهبود جذب آهن و نیز جلوگیری از استقرار پاتوژن‌های گیاهی باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند (۱۷ و ۱۸). به همین دلیل در مطالعات مختلف سویه‌های ریزوبیومی تولیدکننده سیدروفور جداسازی و شناسایی شدند (۱۹)، (۲۰). با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیطی و اقلیمی زیستگاه خود، در این مطالعه ریزوبیوم‌های بومی تولیدکننده ACC دامیناز و سیدروفور که با شرایط خاک و اقلیم کشور سازگارند

مایع M9 بدون  $2 \text{ NH}_4\text{Cl}$  (M9) با  $3 \text{ NH}_4\text{Cl}$  (M9) با ACC. در این مرحله از کار میکرو پلیت ۹۶ تایی ۱۲ ستون و ۸ ردیف تهیه شد و سپس در تمام چاهک‌های آن، ۱۲۰ میکرولیتر محیط کشت مایع M9 افزوده شد و در ستون ۱ و ۲ که به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده، فقط محیط مایع M9 اضافه شد و در ستون ۳ و ۴ که شاهد مثبت در نظر گرفته شده، علاوه بر M9، ۱۵ میکرولیتر  $0.3 \text{ NH}_4\text{Cl}$  مولار به چاهک‌ها افزوده شد و در ستون ۵ و ۶ علاوه بر M9، ۱۵ میکرولیتر محلول آماده شده ACC ۳ میلی مولار به آن افزوده شد و سپس به تمامی چاهک‌ها ۱۵ میکرولیتر محیط کشت باکتریایی تلقیح شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گذاشته شد و جذب نوری (OD) آن‌ها را با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۳۰ نانومتر بعد از مدت زمان ۲۴ ساعت خوانده شد و با مقایسه OD چاهک‌های ACC،  $\text{NH}_4\text{Cl}$  و شاهد، توان ریزوباکتری‌ها برای تولید ACC مشخص شد.

جدول ۱- فرمولاسیون محیط‌های کشت برای جداسازی

تولیدکننده‌های ACC دآمیناز

مواد	$\text{M}_9$ (گرم بر لیتر)	$\text{M}_9 + \text{NH}_4\text{Cl}$	$\text{M}_9 + \text{ACC}$
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	۵/۸	۵/۸	۵/۸
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	۳	۳	۳
$\text{NaCl}$	۰/۵	۰/۵	۰/۵
$\text{CaCl}_2$	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵	۰/۰۲۵
$\text{MgSO}_4$	۰/۰۸۸	۰/۰۸۸	۰/۰۸۸
glucose	۲	۲	۲
$\text{NH}_4\text{Cl}$	۰	*۳	۰
ACC	۰	۰	*۴

۳ علامت ستاره نشان‌دهنده این است که محیط حاوی  $\text{NH}_4\text{Cl}$  است.

۴ علامت ستاره نشان‌دهنده این است که محیط حاوی ACC است.

جداسازی و غربالگری شدند تا در کنار تثبیت نیتروژن هوا قادر به کاهش سطح اتیلن گیاه از طریق تولید ACC دآمیناز در شرایط تنش و نیز کمک به گیاه در جذب بهتر آهن موجود در خاک از طریق تولید سیدروفور شوند.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی ریزوبیوم‌ها: برای جداسازی باکتری‌های

ریزوبیوم، ابتدا ریشه گیاهان یونجه و شبدر از شهرهای ماهان و کرمان از خاک بیرون کشیده شد و سپس غده‌ها با پنس جدا و در کیسه‌های پلاستیکی استریل به آزمایشگاه انتقال داده شدند. عمل ضدعفونی با الکل ۷۰ درصد و آب مقطر ۳ بار تقطیر انجام گرفت که در هر بار غده‌ها ۱ دقیقه در الکل ۷۰ درصد و سپس به مدت ۱ دقیقه در آب مقطر استریل قرار گرفتند. سپس نمونه له شده غده بر روی محیط کشت عصاره مخمر-مانیتول آگار (YEMA<sup>۲</sup>) قرار داده شد. پلیت‌ها به صورت وارونه به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پلیت‌ها از نظر وجود کلنی بررسی شدند و کلنی‌های مورد نظر با لوپ استریل به محیط کشت جدید جهت دست یافتن به کلنی‌های خالص انتقال داده شدند.

### جداسازی باکتری‌های تولیدکننده ACC دآمیناز:

جداسازی اختصاصی باکتری‌های تولیدکننده ACC دآمیناز از طریق تعیین میزان رشد سویه در حضور ACC و در مقایسه با دو نمونه شاهد انجام گرفت (۲۱، ۲۲) که به صورت خلاصه در زیر بیان می‌شود: ابتدا سویه‌های ریزوبیومی را در محیط کشت مایع M9 (جدول ۱) تلقیح داده شدند و در انکوباتور چرخان با ۱۰۰ rpm به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا باکتری‌ها رشد کنند. سپس ۳ نوع محیط کشت به شرح زیر آماده شد: ۱- محیط کشت حداقل

### جداسازی باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور: در

این مرحله از بین باکتری‌های جداسازی شده در مرحله نخست، آن‌هایی که توانایی بالایی برای تولید سیدروفور داشتند با استفاده از محیط کشت اختصاصی سنجش مایع CAS شناسایی شدند (۲۳). ابتدا نمونه‌ها داخل محیط مایع M9 با فسفات کاهش یافته تلقیح داده شدند. بعد از تلقیح، نمونه‌ها به مدت ۴ روز در شیکر انکوباتور چرخان با دور rpm100 دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از ۴ روز ۱ میلی‌لیتر از محیط کشت برداشته شد و درون ویال ریخته شد و با دور ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از سانتریفیوژ، ۰/۵ میلی‌لیتر سوپرناتانت از هر کدام از نمونه‌ها به ویال‌های جدید منتقل شد. گام بعدی، آماده‌سازی محلول سنجش CAS بود. برای تهیه این محلول چهار محلول استوک درست شد. ۱- محلول استوک CAS با غلظت ۲ میلی‌مولار: ۰/۱۲۱ گرم CAS در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. ۲- محلول استوک Fe با غلظت ۱ میلی‌مولار: یک میلی‌مولار  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  در ۱۰ میلی‌مولار HCl حل شد. ۳- محلول پیرازین: ۴/۳۰۷ گرم پیرازین در ۳۰ میلی‌لیتر آب حل شد. pH با سود تنظیم شد تا به ۵/۶ برسد. ۴- محلول HDTMA: ۰/۰۲۱۹ گرم HDTMA در ۵۰ میلی‌لیتر آب در بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری حل شد. برای درست کردن محلول سنجش CAS، ۱/۵ میلی‌لیتر محلول  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  با ۷/۵ میلی‌لیتر محلول CAS مخلوط شد و به محلول HDTMA در بالن ژوژه اضافه شد و بعد محلول پیرازین به آن اضافه شد و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد که در نهایت محلول سنجش CAS آماده شد. رنگ این محلول آبی تیره بود. برای تهیه محلول شاتل ۰/۴۳۶۴ گرم ۵- سولفوسالیسیک در ۱۰ میلی‌لیتر آب حل شد.

### تعیین واحد سیدروفوری با اندازه‌گیری جذب

در ۶۳۰ نانومتر: به هر کدام از ویال‌ها که قبلاً ۰/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت ریخته شده بود، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سنجش CAS اضافه شد و با استفاده از ورتکس، مخلوط شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول شاتل به ویال اضافه شد و دوباره ورتکس انجام شد. طیف جذبی ۶۳۰ نانومتر برای کاهش رنگ آبی بررسی شد. جهت سنجش جذب از محیط کشت حداقل به‌عنوان شاهد استفاده شد و محیط حداقل حاوی محلول سنجش CAS و محلول شاتل به‌عنوان رفرنس استفاده شد. نمونه (s) به دلیل دارا بودن سیدروفور یک جذب نوری کمتر از رفرنس دارد. واحد سیدروفور از فرمول زیر به دست آمد:

$$(1) \text{ واحد سیدروفور} = \left[ \frac{(Ar - As)}{Ar} \right] 100$$

که در فرمول بالا Ar جذب رفرنس (محلول شاتل + محلول سنجش CAS + محیط حداقل) در ۶۳۰ نانومتر و As جذب نمونه (سوپرناتانت + محلول سنجش CAS + محلول شاتل) در ۶۳۰ نانومتر است (۲۳).

**آنالیز آماری:** تمامی تیمارها در دو آزمایش غربال سویه‌های رایزوبیومی تولیدکننده آنزیم ACC دآمیناز و سیدروفورها در دو تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی توسط نرم‌افزارهای Excel و SAS آنالیز آماری شدند. همچنین مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت.

### تکثیر ژن *I6S rDNA*، توالی‌یابی آن و شناسایی

سویه مورد نظر: بهترین سویه تولیدکننده آنزیم ACC دآمیناز و نیز بهترین سویه تولیدکننده سیدروفور شناسایی مولکولی شدند. DNA این سویه‌ها با استفاده از روش Ausubel و همکاران (۱۹۹۹) استخراج شد

مشخص کردن قابلیت این سویه‌ها از نظر توانایی تولید ACC دامیناز و نیز سیدروفورها از محیط کشت‌های اختصاصی استفاده شد.

#### سویه‌های تولیدکننده ACC دامیناز: توانایی

سویه‌های ریزوبیومی برای استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن، براساس میزان رشد باکتری تعیین شد. در واقع سویه‌هایی که توانایی استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن دارند در محیط حاوی ACC رشد خوبی خواهند داشت و حداقل نسبت به محیط حداقل (M9 بدون منبع نیتروژن) رشد بهتری خواهند داشت. پس از تلقیح نمونه‌های ریزوبیومی روی دو منبع نیتروژن ACC و NH<sub>4</sub>Cl و نیز محیط حداقل فاقد نیتروژن، از بین ۱۴ نمونه ریزوبیومی، فقط سویه R8 دارای قدرت استفاده از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن بود. OD این سویه در محیط حاوی ACC برابر با ۰/۸۳۴ بود که در مقایسه با OD محیط شاهد فاقد ACC اختلاف معنی‌دار داشت. برای اینکه تفاوت‌های مشاهده‌شده از نظر آماری به اثبات برسد، داده‌های حاصل از تأثیر سه محیط کشت مختلف بر سویه R2 در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار مورد تجزیه واریانس قرار گرفتند. نتایج نشان داد که حداقل بین سه تیمار (محیط کشت) در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار وجود دارد (جدول ۳). برای اینکه مشخص شود که بین کدام یک از محیط کشت‌ها تفاوت وجود دارد، مقایسه میانگین به‌روش دانکن انجام گرفت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که تفاوتی بین میزان رشد سویه R8 در دو محیط کشت M9 و M9+NH<sub>4</sub>Cl وجود نداشته است اما میزان رشد در محیط کشت M9+ACC تفاوت معنی‌داری با دو محیط کشت دیگر دارد که این نشان‌دهنده این است که این سویه از ACC به‌عنوان منبع نیتروژن استفاده می‌کند (شکل ۱).

(۲۴). ژن *16S rRNA* توسط ترکیب پرایمری 8F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAG (3' و (CCGCA-3' و با استفاده از دستگاه PCR تکثیر شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد بارگذاری شد و پس از رؤیت باند مورد نظر برای توالی‌یابی با استفاده از پرایمر 8F ارسال شد. پس از به‌دست آمدن توالی *16S rDNA*، با استفاده از وب‌سایت NCBI قسمت BLAST توالی‌ها آنالیز شدند و نام باکتری مورد نظر شناسایی شد (۲۵). سپس نام و مشخصات سویه به‌همراه شماره دسترسی اختصاصی در داخل سایت NCBI ثبت شدند.

جدول ۲- جداسازی سویه‌های ریزوبیومی از رایزوسفر گیاهان

#### مختلف

ردیف	نام سویه	گیاه	محل جمع‌آوری
۱	R1	شبدر	کرمان
۲	R2	شبدر	کرمان
۳	R3	یونجه	کرمان
۴	R4	یونجه	کرمان
۵	R5	یونجه	اصفهان
۶	R6	یونجه	اصفهان
۷	R7	یونجه	اصفهان
۸	R8	یونجه	اصفهان
۹	R9	یونجه	اصفهان
۱۰	R10	یونجه	اصفهان
۱۱	R11	یونجه	اصفهان
۱۲	R12	یونجه	اصفهان
۱۳	R13	یونجه	اصفهان
۱۴	R14	یونجه	اصفهان

#### نتایج

در این پژوهش چهارده سویه ریزوبیومی از غده‌های ریشه گیاهان یونجه و شبدر واقع در استان‌های کرمان و اصفهان جداسازی شدند (جدول ۲). سپس برای

برای اینکه تفاوت‌های بین سویه‌های تولیدکننده سیدروفور از نظر میزان تولید سیدروفور مشخص شوند، داده‌های به‌دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS آنالیز شدند. نتایج نشان داد که بین تیمارها، در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۵). این نتیجه به این معنی است که حداقل بین دو سویه ریزوبیومی از نظر میزان تولید سیدروفور تفاوت معنی‌دار وجود دارد. برای اینکه تفاوت بین سویه‌ها از نظر آماری مشخص شوند، مقایسه میانگین بین تیمارها به روش دانکن انجام گرفت تا تفاوت بین تیمارها مشخص شود (شکل ۲). همان‌طور که در شکل ۲ نیز مشخص است سویه R12 بیشترین میزان تولید سیدروفور و سویه‌های R13، R3 و R11 کمترین میزان تولید سیدروفور را دارند. از بین ۸ سویه، ۳ سویه R13 (۲۸ درصد)، R3 (۲۹ درصد) و R11 (۲۹ درصد) زیر ۴۰ درصد، ۴ سویه R1 (۴۶ درصد)، R14 (۵۰ درصد)، R6 (۵۴ درصد) و R7 (۵۸ درصد) زیر ۶۰ درصد و یک سویه R12 (۹۰ درصد) بالای ۶۰ درصد واحد سیدروفوری را به خود اختصاص داده‌اند. سویه R12 با استفاده از روش *16S rDNA* شناسایی شده و با نام FIR004 و شماره دسترسی KM044042 در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیده است. با توجه به آنالیز مولکولی، این سویه به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شد.

جدول ۵- تجزیه واریانس باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور

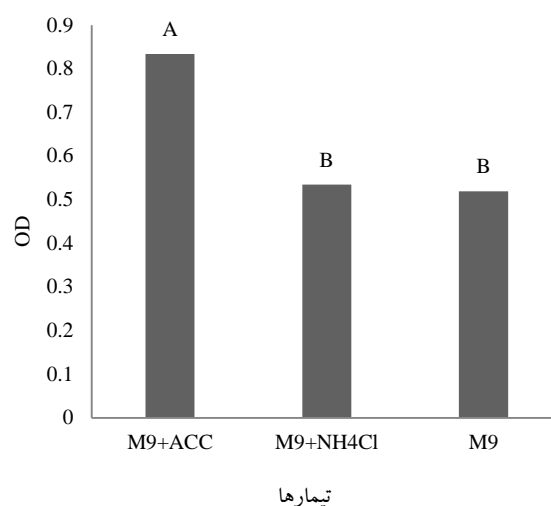
منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
تیمار	۷	۰/۵۸۶۴	۰/۰۸۴*
خطا	۸	۰/۰۲۰۹	۰/۰۰۳

علامت \* به معنی معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.

جدول ۳- آنالیز تجزیه واریانس تیمارهای مختلف در سویه R8

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات
تیمار	۲	۰/۱۲۶۱	۰/۰۶۳۱*
خطا	۳	۰/۰۱۱۷	۰/۰۰۳۹

علامت \* به معنی معنی‌داری در سطح ۵ درصد است.



شکل ۱- مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف در سویه R8

سویه R8 با استفاده از روش *16S rDNA* شناسایی شد و با شماره دسترسی KT737475 در پایگاه اطلاعاتی NCBI به ثبت رسیده است. با توجه به آنالیز مولکولی، این سویه به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شد.

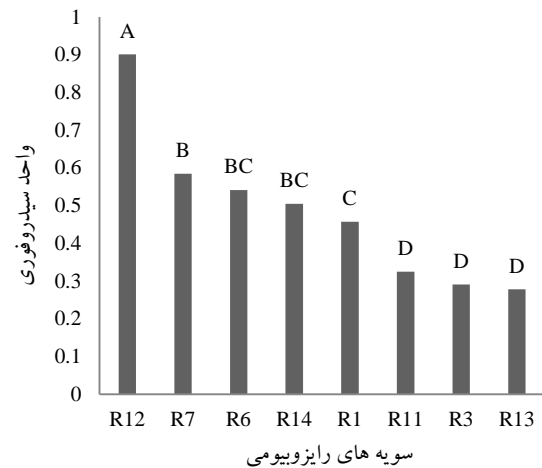
نتایج حاصل از آزمایش‌ها توان تولید آنزیم ACC دامیناز اندازه‌گیری شده در ۱۴ سویه ریزوبیومی، نشان می‌دهد که برخی از باکتری‌های ریزوبیومی توان تولید این آنزیم را دارند و می‌توان آن‌ها را در لیست باکتری‌های تولیدکننده آنزیم ACC دامیناز قرار داد.

#### باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور: نتایج نشان داد

که از بین ۱۴ نمونه ریزوبیومی، تعداد ۸ سویه (۵۷ درصد) از کل سویه‌ها) دارای توان تولید سیدروفور هستند.

آلفا کتوبوتیرات می‌شوند و از این طریق سطوح اتیلن در گیاهان را پایین می‌آورند (۳۱، ۳۲) و در نتیجه از آثار زیان‌بار اتیلن در هنگام گره‌زایی و نیز تنش‌های غیرزنده جلوگیری می‌کنند. به همین دلیل، مطالعات زیادی تاکنون انجام شده است تا ریزوباکتری‌های تولیدکننده ACC دآمیناز را جداسازی کنند (۱۲-۱۴، ۳۳ و ۳۴). نتایج حاصل از این پژوهش نیز نشان داد که از بین ۱۴ سویه ریزوبیومی، فقط سویه R8 دارای توان تولید ACC دآمیناز بود. این سویه به‌عنوان *Sinorhizobium meliloti* شناسایی شد. برخی مطالعات مشابه نیز نشان‌دهنده توانایی این گونه در تولید آنزیم ACC دآمیناز است (۳۵ و ۳۶). از این سویه می‌توان برای مطالعه تأثیر این آنزیم بر گره‌زایی در شرایط مختلف رشدی در لگوم‌ها و نیز مطالعه اثر آن بر گیاهان غیرلگومی استفاده کرد. پژوهشگران دیگر نیز تولید ACC دآمیناز از سویه‌های ریزوبیومی را گزارش کرده‌اند. ما<sup>۴</sup> و همکاران (۳۴)، ۱۳ جدایه ریزوبیومی را جداسازی کردند که فقط ۵ تا از آن‌ها حاوی ACC دآمیناز بودند. دان<sup>۵</sup> و همکاران (۳۳) نشان دادند که از بین ۲۳۳ سویه ریزوبیومی تنها ۲۷ سویه، قابلیت تولید ACC دآمیناز را داشتند.

بسیاری از گیاهان روی خاک‌های آهنی و قلیایی که از کمبود آهن دارند، رشد می‌یابند. گره‌ک‌زایی ضعیف ناشی از کمبود آهن گیاهان زراعی خانواده لگوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳۷-۳۹). سیدروفورها مولکول‌های آلی کوچکی هستند که با کلاته کردن آهن، آن را در دسترس گیاهان قرار می‌دهند و باعث فراهم کردن بیشتر آهن برای گیاهان می‌شوند (۴۰). سیدروفور باکتریایی رشد گیاهان را به‌طور مستقیم با افزایش فراهم کردن آهن خاک اطراف ریشه و یا به‌طور



شکل ۲- مقایسه میانگین بین باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور در طیف جذبی ۶۳۰ نانومتر

## بحث و نتیجه‌گیری

ریزوبیوم‌ها باکتری‌هایی هستند که یک رابطه همزیستی با گیاهان خانواده لگوم در گره‌ک‌های ریشه گیاهان ذکر شده برقرار می‌کنند و قادر به تثبیت نیتروژن هوا هستند (۲۶). اتیلن، یکی از هورمون‌های گیاهی است که فرآیند گره‌زایی را تنظیم می‌کند و در بسیاری از فرآیندهای چرخه زندگی گیاه دخیل است. اتیلن در هنگام برهم‌کنش بین گیاهان و ریزوبیوم‌ها هم‌سنتز می‌شود (۲۷، ۲۸). گزارش شده است که این هورمون از گره‌سازی لگوم‌ها و طویل شدن ریشه جلوگیری می‌کند (۲۹) و همچنین در پاسخ به تنش‌های غیرزنده نیز سنتز می‌شود (۲۷، ۲۸، ۲۹). از طرفی پیش‌ماده سنتز اتیلن در گیاهان مولکول ۱-آمینو سیکلو پروپان کربوکسیلیک اسید (ACC) است که در واکنشی که به وسیله آنزیم ACC اکسیداز کاتالیز می‌شود، به اتیلن و دی‌اکسید کربن و سیانید هیدروژن تبدیل می‌شود (۲۷، ۳۰). میکروارگانیسم‌های خاکزاد مثل باکتری‌ها با بیان آنزیم ACC دآمیناز باعث تخریب ACC به آمونیاک و

*S. meliloti* s. ۱۲ سویه قابلیت تولید سیدروفور را داشتند. بارهوه<sup>۹</sup> و همکاران (۴۶) نیز نشان دادند که تنها ۲ سویه از بین ۳۵ سویه ریزوبیومی توانایی تولید سیدروفور را دارند. با توجه به سازگاری میکروارگانیسم‌ها با شرایط محیطی و اقلیمی زیستگاه خود در این کار ریزوبیوم‌های تولیدکننده سیدروفور و ACC دآمیناز بومی که با شرایط خاک و اقلیم کشور سازگارند جداسازی و غربال شدند. این سویه‌ها در کنار عمل تثبیت نیتروژن، در شرایط کمبود آهن در رقابت با سایر باکتری‌ها موفق‌تر عمل خواهند کرد که این امر موفقیت بیشتر این سویه‌ها در ایجاد گرهک‌های ریشه و در نتیجه تثبیت بیشتر نیتروژن را در پی خواهد داشت. از طرفی سویه R8 که توانایی تولید ACC دآمیناز را دارد احتمالاً به دلیل کاهش میزان اتیلن، میزان گرهک‌های بیشتری را در شرایط نرمال و تنش ایجاد خواهد کرد. از طرف دیگر ریزوبیوم‌های تولیدکننده سیدروفور و ACC دآمیناز به دلیل اینکه علاوه بر تثبیت نیتروژن قابلیت‌های دیگری را نیز دارند، می‌توانند برای بهبود رشد و عملکرد سایر گیاهان زراعی غیرلگوم نیز به کار روند.

#### تشکر و قدردانی

از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان برای تأمین هزینه مالی این پژوهش از محل طرح پژوهشی (با شماره ۱/۶۸۸۷) تشکر و قدردانی می‌شود.

غیرمستقیم از طریق جلوگیری از رشد پاتوژن‌های گیاهی، رشد گیاهان را تقویت می‌کنند (۴۰). در خاک‌های تحت تنش کمبود آهن، سویه‌های تولیدکننده سیدروفور افزایش بیشتری می‌یابند و موفق‌تر عمل خواهند کرد (۴۱). به دلیل اهمیت بالای سیدروفورها در جذب آهن توسط گیاهان، مطالعات زیادی برای جداسازی ریزوباکتری‌های تولیدکننده سیدروفور صورت گرفته است (۱۹، ۲۰، ۴۲، ۴۳). در این پژوهش نیز برای جداسازی سویه‌های ریزوبیومی تولیدکننده سیدروفور، از روش سنجش CAS استفاده شد. نتایج نشان داد که ۸ سویه ریزوبیومی توان تولید سیدروفور را داشتند. در پژوهشی که تیان<sup>۶</sup> و همکاران (۴۴) در سال ۲۰۰۹ انجام دادند ۲۲۹ سویه در محیط کشت مایع فاقد آهن، سیدروفور تولید کردند. تولید سیدروفورها به عنوان واحد سیدروفور ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که بیش از ۷۵ درصد از کل سویه‌ها، بین ۲۰ تا ۴۰ درصد واحد سیدروفوری و کمتر از ۲۵ درصد از کل سویه‌ها، بین ۴۰ و ۶۰ درصد واحد سیدروفور را به خود اختصاص دادند، در صورتی که در این مطالعه ۳ سویه R13 (۲۸ درصد)، R3 (۲۹ درصد) و R11 (۲۹ درصد) زیر ۴۰ درصد، ۴ سویه R1 (۴۶ درصد)، R14 (۵۰ درصد)، R6 (۵۴ درصد) و R7 (۵۸ درصد) زیر ۶۰ درصد و یک سویه R12 (۹۰ درصد) بالای ۹۰ درصد واحد سیدروفوری را به خود اختصاص داده‌اند. رایت و همکاران (۱۹) و وحید و همکاران (۲۰) سویه‌های ریزوبیومی تولیدکننده سیدروفور را از بین سویه‌های مطالعه شده جداسازی کردند. همچنین ری و اکانل<sup>۷</sup> (۴۳) سویه‌های مختلف ریزوبیومی تولیدکننده سیدروفور را جداسازی و شناسایی کردند که در بین آن‌ها ۵ سویه *S. meliloti* قرار داشتند. فایانو<sup>۸</sup> و همکاران (۴۵) نیز نشان دادند که از بین ۱۶ سویه



## References

- (1) El-Akhal MR, Rincón A, Coba de la Peña T, Lucas MM, El Mourabit N, Barrijal S, et al. Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. *Plant Biology*. 2013; 15(2): 415-421.
- (2) Chaintreuil C, Giraud E, Prin Y, Lorquin J, Bâ A, Gillis M, et al. Photosynthetic bradyrhizobia are natural endophytes of the African wild rice *Oryza breviligulata*. *Applied and environmental microbiology*. 2000; 66(12): 5437-5447.
- (3) Hilali A, Prévost D, Broughton WJ, Antoun H. Effets de l'inoculation avec des souches de *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii sur la croissance du blé dans deux sols du Maroc. *Canadian Journal of Microbiology*. 2001; 47(6): 590-593.
- (4) Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay SN. Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008; 80(2): 199-209.
- (5) Yanni YG, Rizk RY, El-Fattah FKA, Squartini A, Corich V, Giacomini A, et al. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. *Functional Plant Biology*. 2001; 28(9): 845-870.
- (6) Glick BR. Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. *FEMS Microbiology Letters*. 2005; 251(1): 1-7.
- (7) Arshad M, Saleem M, Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends in biotechnology*. 2007; 25(8): 356-362.
- (8) Glick BR, Cheng Z, Czarny J, Duan J. Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *European journal of plant pathology*. 2007; 119: 329-339.
- (9) Barnawal D, Bharti N, Maji D, Chanotiya CS, Kalra A. ACC deaminase-containing *Arthrobacter protophormiae* induces NaCl stress tolerance through reduced ACC oxidase activity and ethylene production resulting in improved nodulation and mycorrhization in *Pisum sativum*. *Journal of plant physiology*. 2014; 171(11): 884-894.
- (10) Shagol CC, Subramanian P, Krishnamoorthy R, Kim K, Lee Y, Kwak C. et al. ACC Deaminase Producing Arsenic Tolerant Bacterial Effect on Mitigation of Stress Ethylene Emission in Maize Grown in an Arsenic Polluted Soil. *Korean journal of soil science and fertilizer*. 2014; 47(3): 213-216.
- (11) Yan J, Smith MD, Glick BR, Liang Y. Effects of ACC deaminase containing rhizobacteria on plant growth and expression of Toc GTPases in tomato (*Solanum lycopersicum*) under salt stress. *Botany*. 2014; 92(11): 775-781.
- (12) Bal HB, Nayak L, Das S, Adhya TK. Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and soil*. 2013; 366(1-2): 93-105.
- (13) Jha CK, Annapurna K, Saraf M. Isolation of Rhizobacteria from *Jatropha curcas* and characterization of produced ACC deaminase. *Journal of basic microbiology*. 2012; 52(3): 285-295.
- (14) Qin S, Zhang YJ, Yuan B, Xu PY, Xing K, Wang J, Jiang JH. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and soil*. 2014; 374(1-2): 753-766.
- (15) Chen Y, Barak P. Iron nutrition of plants in calcareous soils. *Advances in Agronomy*. New York: Academic Press; 1982.
- (16) Johnson GV, Barton LL. Selected physiological responses associated with Fe (III) and Fe (II) metabolism. *Iron chelation*

- in plants and soil microorganisms*. California: Academic Press; 1993.
- (17) Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, Mengel K. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils*. 2000; 30(5-6): 433-439.
- (18) Schroth MN, Hancock JG. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*. 1982; 216(4553): 1376-1381.
- (19) Wright W, Little J, Liu F, Chakraborty R. Isolation and structural identification of the trihydroxamate siderophore vicibactin and its degradative products from *Rhizobium leguminosarum* ATCC 14479 bv. trifolii. *BioMetals*. 2013; 26(2): 271-283.
- (20) Waheed A, Afzal A, Sultan T, Ijaz F, Manan S, Zia MA. et al. Isolation and biochemical characterization of rhizobium from pea crop at Swabi. *International Journal of Biosciences (IJB)*. 2014; 4(8): 231-240.
- (21) Jacobson CB, Pasternak JJ, Glick BR. Partial purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *Canadian Journal of Microbiology*. 1994; 40(12): 1019-1025.
- (22) Shahzad SM, Khalid A, Arshad M. Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. *Soil and Environment*. 2010; 29(1): 38-46.
- (23) Payne SM. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in enzymology*. 1994; 235: 329-344.
- (24) Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology, 4th Edition, John Wiley and sons, Inc., New York, 1512 pp; 1995.
- (25) Nezhad SS, Khorasgani MR, Emtiazi G, Yaghoobi MM, Shakeri S. Isolation of copper oxide (CuO) nanoparticles resistant *Pseudomonas* strains from soil and investigation on possible mechanism for resistance. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014; 30(3):809-817.
- (26) Murset V, Hennecke H, Pessi G. Disparate role of rhizobial ACC deaminase in root-nodule symbioses. *Symbiosis*. 2012; 57(1): 43-50.
- (27) Abeles FB, Morgan PW, Saltveit Jr ME. *Ethylene in plant biology*. California: Academic Press. 1992.
- (28) Spaink HP. Ethylene as a regulator of *Rhizobium* infection. *Trends in Plant Science*. 1997; 2(6): 203-204.
- (29) Nukui N, Ezura H, Yuhashi KI, Yasuta T, Minamisawa K. Effects of ethylene precursor and inhibitors for ethylene biosynthesis and perception on nodulation in *Lotus japonicus* and *Macroptilium atropurpureum*. *Plant and Cell Physiology*. 2000; 41(7): 893-897.
- (30) Lin Z, Zhong S, Grierson, D. Recent advances in ethylene research. *Journal of experimental botany*. 2009; 60(12): 3311-3336.
- (31) Glick BR, Penrose DM, Li J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *Journal of Theoretical Biology*. 1998; 190(1): 63-68.
- (32) Ma W, Penrose DM, Glick BR. Strategies used by rhizobia to lower plant ethylene levels and increase nodulation. *Canadian journal of microbiology*. 2002; 48(11): 947-954.
- (33) Duan J, Müller KM, Charles TC, Vesely S, Glick BR. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase genes in rhizobia from southern Saskatchewan. *Microbial ecology*. 2009; 57(3): 423-436.
- (34) Ma W, Sebastianova SB, Sebastian J, Burd GI, Guinel FC, Glick BR. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate

- deaminase in *Rhizobium* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2003; 83(3): 285-291.
- (35) Kuhn S, Stiens M, Pühler A, Schlüter A. Prevalence of pSmeSM11a-like plasmids in indigenous *Sinorhizobium meliloti* strains isolated in the course of a field release experiment with genetically modified *S. meliloti* strains. *FEMS Microbiol Ecol*. 2008; 63:118-131.
- (36) Tittabutr PP, Awaya JD, Li QX, Borthakur D. The cloned 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase gene from *Sinorhizobium* sp. strain BL3 in *Rhizobium* sp. strain TAL1145 promotes nodulation and growth of *Leucaena leucocephala*. *Systematic and Applied Microbiology*. 2008; 31(2): 141-150.
- (37) Hemantaranjan A, Garg OK. Introduction of nitrogen-fixing nodules through iron and zinc fertilization in the nonodule-forming French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Plant Nutrition*. 1986; 9(3-7): 281-288.
- (38) O'HARA GW, Dilworth MJ, Boonkerd N, Parkpian P. Iron-deficiency specifically limits nodule development in peanut inoculated with *Bradyrhizobium* sp. *New Phytologist*. 1988; 108(1): 51-57.
- (39) Rai R, Singh SN, Prasad V. Effect of pressmud amended pyrite on symbiotic N<sub>2</sub>-fixation, active iron contents of nodules, grain yield and quality of chick pea (*Cicer arietinum* Linn.) Genotypes in calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition*. 1982; 5(4-7): 905-913.
- (40) Marek-Kozaczuk M, Deryto M, Skorupska A. Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas* sp. 267 defective in siderophore production and their effect on clover (*Trifolium pratense*) nodulated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Plant and soil*. 1996; 179(2): 269-274.
- (41) Carson KC, Meyer JM, Dilworth MJ. Hydroxamate siderophores of root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*. 2000; 32(1): 11-21.
- (42) Mehdipour Moghaddam M, Emtiazi G, Bouzari M. Improvement of endophytic *Azospirillum* colonization by co-inoculation with *Cellulomonas Uda* ATCC 491. *Biological Journal of Microorganisms*. 2014; 3 (9) :99-112
- (43) Reigh GERALDINE, O'Connell MICHAEL. Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*. 1993; 175(1): 94-102.
- (44) Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L, Du B. Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2009; 40(2): 276-284.
- (45) Fabiano E, Gualtieri G, Pritsch C, Polla G, Arias A. Extent of high-affinity iron transport systems in field isolates of rhizobia. *Plant and soil*. 1994. 164(2): 177-185.
- (46) Berraho EL, Lesueur D, Diem HG, Sasson A. Iron requirement and siderophore production in *Rhizobium ciceri* during growth on an iron-deficient medium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1997; 13(5): 501-510.

<sup>1</sup>- 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

<sup>2</sup>- Yeast Extract Mannitol Agar

<sup>3</sup>- National Center for Biotechnology Information

[<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]

<sup>4</sup>- Ma

<sup>5</sup>- Duan

<sup>6</sup>- Tian

<sup>7</sup>- Reigh and O'Connell

<sup>8</sup>- Fabiano

<sup>9</sup>- Berraho



## Isolation and screening of native ACC deaminase and siderophore producing rhizobia

**Behnaz Oujand**

M.Sc Student of plant breeding, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, behnaz.oujand@yahoo.com

**Mahmood Maleki**\*

Assistant professor of Plant Breeding, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, maleki.li@gmail.com

**Shahryar Shakeri**

Assistant professor of Microbiology, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, shahryar.shakeri@yahoo.com

**Sedigheh Norouzpoor**

MSc Student of plant breeding, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran, sedighe.poorahmadi@yahoo.com

**Parvaneh Abedi**

M.Sc. Student of Microbiology, Shahid Bahonar university, Kerman, Iran, parvanehabedi2008@gmail.com

**Abdolhamid Namaki-Shoushtari**

Associate professor of Microbiology, Shahid Bahonar university, Kerman, Iran, genabns2@yahoo.com

### Abstract

**Introduction:** Rhizobia are bacteria that have a symbiosis with legumes. Rhizobia that have some capabilities like ACC deaminase and siderophore production in addition to nitrogen fixation are successful competitors in different environmental conditions for production of more nodules. The aim of this study was the screening of ACC deaminase and siderophore producing Rhizobia.

**Materials and methods:** For screening of ACC deaminase producing rhizobia, all isolates were cultured on M9 medium with two different nitrogen sources, ACC and NH<sub>4</sub>Cl, and M9 medium without nitrogen source was considered as a control treatment. ACC deaminase producing Rhizobia were identified based on statistical comparison of growth rate on M9 medium with ACC against other mediums. Chrome Azurol S (CAS) liquid assay was used for siderophore producing Rhizobia. All treatments repeated two times and all data analyzed in the base of the completely randomized design. 16S rRNA gene sequencing was used for identifying the best ACC deaminase and siderophore producing strain.

**Results:** 14 isolates of *Rhizobium* were used for screening of ACC deaminase and siderophore producing isolates. Results showed that just R8 strain was isolated with the capability of ACC deaminase production. This isolate could have better growth on M9 with ACC than two other mediums. In the next experiment, it was determined that 8 isolates are siderophore producing rhizobia based on CAS liquid assay. The result showed that R12 isolate could produce more siderophore than others. According to 16S rRNA gene sequencing, R8 and R12 isolates identified as *Sinorhizobium meliloti*.

**Discussion and conclusion:** The R8 strain that have the capability of ACC deaminase production probability can prevent adverse effects of ethylene during nodulation and abiotic stress. On the other side, R12 that are able to produce siderophore can prevent the growth of soil born pathogen in addition to facilitating nodulation and iron uptake by plants.

**Key words:** *Rhizobium*, ACC deaminase, Siderophore

---

\* Corresponding author

**Received:** June 1, 2015 / **Accepted:** October 28, 2015