فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۹، بهار ۱۳۹۳، صفحه ۹۹- ۱۱۲
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

تحریک کلونیزاسیون *Azospirillum* اندوفیت بدنبال تلقیح توأم با *Cellulomonas uda* ATCC 491

محمد جواد مهدی پور مقدم: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه گیلان، ایران، mj_mehdipour@guilan.ac.ir *
گیتی امتیازی: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، emtiazi@yahoo.com
مجید بوذری: دانشیار ویروس شناسی، دانشگاه اصفهان، ایران، bouzari@sci.ui.ac.ir

چکیده

مقدمه: بسیاری از ریزو باکتری‌های محرک رشد گیاه نظیر *Azospirillum* اگر با باکتری‌های تولید کننده سلولاز قوی نظیر *Cellulomonas* همراه شوند، ممکن است میزان کلونیزاسیون آن‌ها افزایش یافته و در نتیجه باعث تحریک بیشتری در رشد گیاه میزبان شوند.

مواد و روش‌ها: ۶ جدایه اندوفیت *Azospirillum* از ریشه سه رقم برنج و سه رقم گندم و همچنین، یک جدایه از نوعی کود زیستی تجاری (شرکت زیست فناور سبز) بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و تحلیل ۱۶S rDNA شناسایی و بر اساس تولید سلولاز، پکتیناز و اکسین مطالعه شدند. همچنین، کموتاکسی آن‌ها به سمت تراوشات ریشه ارقام برنج و گندم نیز بررسی شد. دو جدایه با فعالیت سلولازی (A5 و A6) و دو جدایه با عدم فعالیت سلولازی (A2 و A3) انتخاب و برهمکنش آن‌ها با *C. uda* ATCC 491 بر تولید اکسین و کلونیزاسیون روی ریشه‌ها مقایسه شد.

نتایج: یافته‌های حاصل از این مطالعه نشان داد که هیچکدام از جدایه‌ها دارای فعالیت پکتیناز نبودند، اما *Azospirillum* جدا شده از برنج دارای فعالیت کربوکسی متیل سلولاز (CMCase) بیشتری است. *C. uda* ATCC 491 و جدایه‌های انتخابی دارای کموتاکسی به سمت تراوشات ریشه‌ها بودند. برای اکثر جدایه‌ها، مقدار تولید اکسین در تلقیح توأم با *C. uda* ATCC 491 افزایش پیدا کرد. همچنین، مشخص شد که *C. uda* ATCC 491 سبب تحریک کلونیزاسیون *Azospirillum* بدون و یا با فعالیت سلولازی به ترتیب روی ریشه‌های برنج و گندم می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: تلقیح توأم *Azospirillum* با *C. uda* ATCC 491 ممکن است به علت تحریک یا اثر افزایشی تولید اکسین و فعالیت سلولازی، باعث افزایش توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه شده و در نتیجه تعداد مکان‌های کلونیزاسیون را در ریشه برای باکتری‌های مفیدی نظیر *Azospirillum* افزایش می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: *Azospirillum*، سلولاز، کموتاکسی، اکسین، کلونیزاسیون، تلقیح توأم، *Cellulomonas*

---

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

سالیان متمادی است که باکتری‌های جنس *Azospirillum* (از زیر رده α- پروتئوباکتری‌ها) به عنوان ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه[1] شناخته شده‌اند. اعضای جنس *Azospirillum* از طریق مکانیسم‌هایی نظیر تثبیت ازت، اثرات هورمونی، افزایش ترشح پروتون از ریشه‌های گیاهان و همچنین مکانیسم‌های دیگر باعث تحریک رشد و توسعه گیاهان می‌شوند. آن‌ها در بیشتر موارد روی سطوح ریشه کلونیزه شده و فقط برخی از سویه‌ها می‌توانند گیاهان را آلوده کنند (۱). برخی از سویه‌های *Azospirillum* دارای مکانیسم‌های اختصاصی برای برهمکنش با ریشه‌های گیاهان و حتی کلونیزاسیون در داخل ریشه هستند، اما بقیه روی لایه‌های لعابی[2] و یا سلول‌های پوسته ای[3] ریشه‌های آسیب دیده کلونیزه می‌شوند. هر چند پکتین به عنوان جز اصلی دیواره سلولی اولیه و لایه میانی شناخته شده است، ولی اعضای جنس *Azospirillum* فاقد فعالیت آنزیم‌های هیدرولیز کننده سلولز و پکتین هستند. بنابراین، این باکتری‌ها ممکن است به طور تصادفی از طریق تجزیه آنزیمی لایه میانی دیواره سلولی میزبان وارد فضای بین سلولی پوسته ریشه شوند (۲).

موفقیت برهمکنش[4] *Azospirillum* -گیاه وابسته به مقاومت و بقای این باکتری‌ها در خاک و کلونیزاسیون موثر در ناحیه ریزوسفری این گیاهان است. کموتاکسی یکی از چند خصوصیتی است که ممکن است به بقا، کلونیزاسیون ریزوسفری و شروع برهمکنش‌های متقابل توسط گونه‌های *Azospirillum* نقش داشته باشد (۳ و ۴). یکی از دلایل دیگر که برای تحریک رشد گیاه به دنبال تلقیح با *Azospirillum* پیشنهاد می‌شود، تولید مواد تنظیم کننده رشد گیاه توسط این باکتری است. مهم‌ترین و بیشترین فیتوهورمونی که توسط *Azospirillum* تولید می‌شود، هورمون اکسین اندول ۳-استیک اسید است (۱).

ظاهراً تلقیح توأم[5] به گیاهان اجازه می‌دهد که تغذیه بسیار متعادل داشته و جذب ازت، فسفر و سایر مواد معدنی مغذی توسط آن‌ها افزایش یابد. تلقیح توأم *Azospirillum brasilense* و باکتری حل کننده فسفات به نام *Pseudomonas striata* یا *Bacillus polymyxa* روی سورگوم رشد یافته تحت شرایط مزرعه‌ای، به طور معنی‌داری عملکرد دانه و ماده خشک و همچنین، جذب ازت و فسفر را در مقایسه با تلقیح منفرد از هر میکروارگانیسم افزایش می‌دهد. در تلقیح توأم *Azospirillum lipoferum* و *Agrobacterium radiobacter* حل کننده فسفات و همچنین، *Azospirillum lipoferum* و *Arthrobacter mysorense* در مقایسه با تلقیح منفرد در آزمایش گلدانی با جو، افزایش معنی‌داری در عملکرد دانه حاصل شد. همچنین، تثبیت ازت در ریشه و تجمع ازت در گیاهان نیز در تقلیح توأم *Azospirillum lipoferum* و *Agrobacterium radiobacter* مشاهده شد. حداکثر اثر مثبت تلقیح توأم روی توسعه گیاه وقتی مشاهده شد که ازت ترکیبی در خاک اندک بود. آزمایش‌های مزرعه‌ای با سه رقم جو نیز تأییدی بر این مدعا بود. تلقیح توأم لگوم‌ها با *Azospirillum* و *Rhizobium* در مقایسه با تلقیح منفرد، چندین متغیر رشد گیاه را افزایش داد. *Azospirillum* به عنوان کمک‌کننده *Rhizobium* در تحریک تشکیل گرهک، نقش گرهک و شاید متابولیسم گیاه مطرح است. فیتوهورمون تولید شده توسط *Azospirillum* باعث تحریک تمایز سلول اپیدرم در تارکشنده ریشه شده که این به نوبه خود باعث

افزایش تعداد جایگاه‌های اتصال برای آلودگی ریزوبیومی شده و از این رو گرهک‌های زیادی تشکیل می‌شود. در آزمایش‌های مزرعه‌ای با عدس، تلقیح توأم *Azospirillum* و *Rhizobium* به طور معنی‌داری باعث افزایش تعداد گرهک‌ها، وزن خشک گرهک‌ها و عملکرد ساقه و همچنین، افزایش در خور توجهی در عملکرد دانه می‌شود. نتایج مشابهی در ارتباط با نخود حاصل شد. این برهمکنش با حضور مواد آلی در محیط رشد گیاه افزایش پیدا کرد (۱).

هدف از این مطالعه، ارزیابی اثر کشت توأم اعضای *Azospirillum* اندوفیت با *C. uda* ATCC 491 در تولید اکسین و کلونیزاسیون آن‌ها روی ریشه‌های برنج و گندم است.

مواد و روش‌ها

جداسازی آزوسپریلوم‌های اندوفیت از ریشه‌های برنج و گندم

باکتری‌های استاندارد استفاده شده در این مطالعه *Azospirillum brasilense* Sp7 (DSMZ, Germany) (که به طور مختصر با A1 نمایش داده می‌شود) و *Azospirillum lipoferum* (جداسازی شده از کود زیستی تجاری (A2)) بودند. نمونه‌های ریشه تازه از سه رقم برنج (طارم (A3)، خزر (A4) و هاشمی (A5)) و سه رقم گندم (گلستان (A5)، شیرازی (A6) و سفیدمحلی (A7)) در استان گیلان فراهم شدند. نمونه‌های ریشه (تارهای کشنده) به منظور جداکردن ذرات خاک متصل به سطح ریشه به مدت ۲۰دقیقه با آب شستشو شدند. ریشه‌های شسته شده با محلول هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ دقیقه استریل سطحی شدند. ریشه‌ها حداقل ۳ بار با آب مقطر استریل آبکشی و سپس به قطعات ۵ تا ۸ میلی‌متر بریده شدند. قطعات پس از فشرده‌شدن با پنس استریل، به لوله‌های حاوی محیط نیمه‌جامد فاقد ازت[۶] انتقال و در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور قرار داده شدند (۵).

پس از گذشت ۳ تا ۵ روز که رشد باکتری نزدیک سطح محیط مشاهده شد، این باکتری‌ها به محیط جامد فاقد ازت انتقال داده شدند. وقتی برخی باکتری‌های اندوفیت تثبیت کننده ازت در محیط نیمه جامد تکثیر شوند، یک دیسک رشدی[۷] تشکیل می‌شود که با گذشت زمان ممکن است تا نزدیک سطح محیط مهاجرت نماید، که در اصطلاح به آن پلیکل گفته می‌شود. پس از رشد باکتری‌ها در سطح محیط جامد فاقد ازت، دوباره به محیط نیمه‌جامد فاقد ازت منتقل و در صورت تشکیل مجدد پلیکل، این نتیجه حاصل می‌شود که باکتری‌های جداسازی شده تثبیت‌کننده ازت هستند. اجزای محیط فاقد ازت عبارتند از: مالیک اسید ۵ گرم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۲ گرم، محلول عناصر کمیاب ۲ میلی‌لیتر، محلول الکلی بروموتیمول‌بلو ۲ میلی‌لیتر (۵ درصد)، اتیلن دی آمین ترا استات ۴ میلی‌لیتر، محلول ویتامین ۱ میلی‌لیتر، هیدروکسید پتاسیم ۴ میلی‌لیتر، آگار ۱/۷۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر (محلول سود برای تنظیم اسیدیته تا ۶/۸). اجزای محلول عناصر کمیاب عبارتند از: مولیبدات سدیم ۰/۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۲۳۵ گرم، بوریک اسید ۰/۲۸ گرم، سولفات مس ۰/۰۰۸ گرم، سولفات روی ۰/۰۲۴گرم و آب مقطر ۲۰۰ میلی‌لیتر. محلول ویتامین حاوی بیوتین ۰/۰۱ گرم، پیرودوکسین ۰/۰۲ گرم و آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر بود (۵).

استخراج DNA و تکثیر ژن ۱٦S rDNA

DNA ژنومی از کشت خالص *Azospirillum* با استفاده از تیمار با پروتئیناز K و سدیم دو دسیل سولفات[8] و سپس استخراج با فنل-کلروفرم و رسوب با اتانل به دست آمد (۶). به منظور تکثیر ژن ۱۶ S rDNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز[9]، از پرایمر رفت (نوکلئوتید ۳۷ تا ۶۴ از ۱۶S rDNA *Azospirillum*) و پرایمر برگشت (نوکلئوتید ۴۰۷ تا ۴۳۶ از ۱۶S rDNA*Azospirillum*) با توالی زیر استفاده شد:

PFAZO: 5'-AGA GGG GCC CGC GTC CGA TTA GGT AGT T-3'

PRAZO: 5'-CCC GAC AGT ATC AAA TGC AGT TCC CAG GTT-3'

طراحی پرایمرها برای منطقه ۱۶S rDNA با استفاده از ژن بانک[10] انجام شد. هر ۲۵ ماکرولیتر محلول واکنش PCR شامل: پرایمرها هر کدام ۲ ماکرولیتر (۱۰ ماکرومولار)، DNA الگو ۲ ماکرولیتر، dNTPs (dATP، dCTP، dGTP و dTTP) ۰/۵ ماکرولیتر (۱۰ میلی‌مولار)، *Taq Pol* DNA ۰/۵ ماکرولیتر (۰/۲۵ واحد)(از ژن فن‌آوران، ایران)، بافر 10X PCR ۲/۵ ماکرولیتر، کلرید منیزیم ۰/۵ ماکرولیتر (۵۰ میلی‌مولار) و آب مقطر استریل ۱۵ ماکرولیتر بود. مراحل PCR در دستگاه ترموسایکلر (بایو رد[11]، ساخت آمریکا) انجام شد. برنامه شامل: واسرشت‌شدن اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ سیکل شامل: ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و یک سیکل نهایی سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه بود.

سنجش کمپلکس سلولاز

از بین جدایه‌ها و سویه‌های استاندارد، جدایه‌های A5 و A6 به علت رشد بیشتر نسبت به سایر جدایه‌ها، برای بررسی کمپلکس سلولازی و مقایسه فعالیت این کمپلکس در دو رقم برنج و گندم مطالعه و همچنین، فعالیت کربوکسی متیل سلولاز *C. uda* ATCC 491 نیز سنجش شد.

سویه‌ها به محیط مایع سلولز، کربوکسی متیل سلولز[12] (CM 23, CMC low viscose)، کاغذ فیلتر[13] و سالیسین (یک بتاگلیکوزید الکلی) انتقال یافتند. محیط سلولز به عنوان محیط پایه در نظر گرفته شد و با تغییر منابع کربن، فعالیت کمپلکس آنزیمی سلولاز شامل: کربوکسی متیل سلولاز، FPase و سلوبیاز در آن منابع بررسی شد. ۱ میلی‌لیتر از جدایه‌های باکتریایی (جذب نوری برابر ۰/۵) به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط‌های سلولز، کربوکسی متیل سلولز، کاغذ فیلتر و سالیسین تلقیح و فعالیت آنزیم‌ها به مدت ۵ الی ۶ روز سنجش شد (۷).

برای سنجش فعالیت آنزیم، یک میلی‌لیتر از مایع رویی از محیط‌های سلولز، کربوکسی متیل سلولز و کاغذ فیلتر به لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۰۵ گرم کربوکسی متیل سلولز (CM 23, CMC low viscose) (برای سنجش کربوکسی متیل سلولاز) یا ۰/۰۵ گرم کاغذ واتمن شماره یک (تکه‌های ۶×۱ سانتی‌متر مربع) (برای سنجش FPase) و یا ۰/۰۵ گرم سالیسین (برای سنجش سلوبیاز) به همراه ۱ میلی‌لیتر بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با اسیدیته برابر ۴/۸ انتقال داده شد و لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس ۲ میلی‌لیتر معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید[14] (اجزای معرف عبارتند از: سود ۱۰ گرم،

دی نیتروسالیسیلیک اسید ۳/۵ گرم، فنل ۲ گرم و سولفیت سدیم ۰/۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) به لوله‌های آزمایش اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت ۱ میلی‌لیتر تارتارات سدیم پتاسیم و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه و میزان جذب گلوکز آزاد شده در طول موج ۵۷۵ نانومتر خوانده شد. اجزای محیط مایع سلولز عبارتند از: سلولز ۱۰ گرم، کلرید آهن III ۰/۰۰۴ گرم، سولفات آمونیوم ۱ گرم، کلرید سدیم ۰/۶ گرم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۰/۵ گرم، سولفات منیزیم ۰/۵ گرم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۵ گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۰۰۲ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر (اسیدیته برابر ۵ تا ۷). محیط‌های مایع کربوکسی متیل سلولز، کاغذ فیلتر و سالیسین مشابه محیط مایع سلولز هستند، اما در محیط کربوکسی متیل سلولز و سالیسین به جای ۱۰ گرم سلولز به ترتیب ۱۰ گرم کربوکسی متیل سلولز و ۱۰ گرم سالیسین و در محیط کاغذ فیلتر، ۱۰ گرم کاغذ واتمن شماره یک (تکه‌های ۶×۱ سانتی‌متر مربع) استفاده شد (۷).

سنجش فعالیت آنزیم پکتیناز

برای بررسی سنجش پکتیناز (پلی گالاکتوروناز)، ابتدا جدایه‌ها در محیط پکتین آگار کشت داده شدند. تعداد ۲ الی ۳ کلونی از سویه‌ها به داخل محیط پکتین-آگار فرو برده شد و کشت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از این که کلونی‌ها به قطر ۳ میلی‌متر رسیدند، محلول یدید پتاسیم-یدین (یدین ۱ گرم، یدید پتاسیم ۵ گرم و آب مقطر ۳۳۰ میلی‌لیتر) برای آشکار ساختن منطقه هیدرولیز شده اضافه شد. فعالیت پکتیناز با اندازه‌گیری گروه‌های احیاکننده آزاد شده با استفاده از معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید سنجش شد. مخلوط واکنش شامل: محلول ۱ درصد پکتین مرکبات ۰/۸ میلی‌لیتر (با ۶۷ درصد متیلاسیون) در بافر فسفات-سیترات ۰/۲ مولار با اسیدیته برابر ۶ و ۱ ماکرومول مایع رویی کشت، در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. یک واحد فعالیت آنزیمی به شکل ۱ ماکرومول پلی‌گالاکتورونیک اسید آزاد شده در هر دقیقه تعریف می‌شود. اجزای محیط پکتین آگار عبارتند از: پکتین مرکبات (با ۶۷ درصد متیلاسیون) ۱۰ گرم، سولفات آمونیم ۱/۴ گرم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۲ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، محلول مغذی ۰/۱ درصد (سولفات آهن II ۰/۰۰۵ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۰۱۶ گرم، سولفات روی ۰/۰۰۱۴ گرم، کلرید کبالت ۰/۰۰۲ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر)، آگار ۲۰ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر (اسیدیته برابر ۶) (۸)

سنجش اکسین

روش رنگ سنجی: دو کلونی از هر کشت در فلاسک‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط تریپتیکاز سوی براث[15] تلقیح شد. فلاسک‌ها به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد روی همزن چرخان با ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر فلاسک به علاوه ۳ میلی‌لیتر آب مقطر به فلاسک‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری که حاوی ۴۰ میلی‌لیتر محیط تریپتیکاز سوی براث به علاوه غلظت‌های ۰، ۲/۵، ۶۲۵ و ۵۰۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان بودند، تلقیح شد. فلاسک‌های بدون تلقیح به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. همه فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی در ۲۷ درجه سانتی‌گراد روی همزن چرخان با ۱۰۰ دور بر دقیقه انکوبه شدند. یک میلی‌لیتر از هر فلاسک پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت جمع‌آوری

و در g × ۷۱۶۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند. محلول رویی جمع‌آوری و سطح اندول موجود در آن به روش رنگ‌سنجی اندازه‌گیری شد. مخلوط حجمی ۱ به ۲ نمونه و معرف سالکوسکی[۱۶] به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس مخلوط واکنش در g× ۷۱۶۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد تا سلول‌های باکتریایی رسوب یابند. توسعه رنگ در محلول رویی در ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت اندول-۳-استیک اسید با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد (۹).

در سنجش اکسین در تلقیح توأم با *C. uda* ATCC 491، ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون جدایه اندوفیت یا *Azospirillum* و ۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون *C. uda* ATCC 491 با هم مخلوط شدند، در حالی که در تلقیح منفرد ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون جدایه باکتریایی و ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و در نمونه‌های *C. uda* ATCC 491، ۳ میلی‌لیتر سوسپانسیون *C. uda* ATCC 491 و ۱ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند. در آزمایش تلقیح توأم فقط از غلظت ۵۰۰۰ ماکرو گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد.

روش کروماتوگرافی با کارایی بالا[۱۷]: برای انجام این آزمایش فقط از جدایه A3 و از بالاترین غلظت تریپتوفان (۵۰۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. در این آزمایش از دو شاهد استفاده شد، طوری که شاهد اول محیط تریپتیکاز سوی براث و تریپتوفان و شاهد دوم فقط محیط تریپتیکاز سوی براث بود. پس از تلقیح باکتری و در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نمونه‌ها در g× ۷۱۶۰ به مدت ۵ دقیقه در ۴ دمای درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و محلول رویی جمع‌آوری شد. دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا استفاده شده از شرکت کناور[۱۸] (آلمان) (Uv-K2600 detector, pump K100) بود. IAA با استفاده از اتیل استات عصاره‌گیری و در شرایط خلاء و سرما تغلیظ و مقدار ۱ میلی‌لیتر از آن با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر شد. مقدار ۲۰ ماکرولیتر از آن به داخل ستون دستگاه (C18, reverse-phase) بارگزاری شد. فاز متحرک شامل متانول-آب-استونیتریل (به نسبت ۶۵-۳۰-۵) و همچنین، طول موج استفاده شده ۲۵۰ نانومتر و میزان جریان[۱۹] نیز ۰/۸ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. محلول استاندارد شامل اندول-۳-استیک اسید بود (۱۰).

سنجش کموتاکسی

ابتدا باکتری‌ها در محیط جامد سنتزی مالات کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۷۶ ساعت قرار گرفتند. سپس یک لوپ کامل از این کشت‌های ۲۴ تا ۷۶ به فلاسک‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط سنتزی مالات مایع تلقیح و فلاسک‌های مذکور بر حسب سویه‌ها در دمای ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد روی همزن چرخان با ۱۰۰ دور بر دقیقه قرار گرفتند. وقتی کشت‌ها به فاز لگاریتمی (جذب نوری بین ۰/۲ تا ۰/۴ در طول موج ۵۷۸ نانومتر) رسیدند، به مدت ۱۰ دقیقه در g× ۱۵۰۰ سانتریفوژ و ۳ بار با محیط کموتاکسی (بافر فسفات ۶۰ میلی‌مولار با اسیدیته ۶/۸ و سدیم اتیلن دی آمین تترا استات ۰/۱ میلی‌مولار) شستشو شدند و پس تعداد سلول‌ها به 5×10^{8} سلول در هر میلی‌لیتر رسانده شد. سنجش کموتاکسی بر اساس روش آلدر[۲۰] انجام شد. محیط پایه شامل: محیط سنتزی مالات نیمه‌جامد (۰/۲ درصد آگار) بدون مالات، هیدروکسید پتاسیم و عصاره مخمر بود که با سوسپانسیون باکتریایی مخلوط شد. پلیت‌ها با ۲۰ ماکرولیتر از تراوشات در قسمت مرکز تلقیح شدند و

سپس به منظور تشکیل حلقه باکتریایی، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۷ ساعت قرار گرفتند (۳ و ۴).

برای سنجش کموتاکسی، ۳۰ عدد بذر از ۳ رقم برنج شامل: هاشمی، خزر و طارم و همچنین، گندم رقم شیرازی انتخاب و با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت ۵ دقیقه استریل سطحی شده و چند بار با آب مقطر استریل شستشو شدند و سپس داخل پلیت حاوی ۵ میلی‌لیتر آب مقطر قرار داده شدند. از تراوشات ریشه‌های ۳ و ۷ روزه، ۲۰ ماکرولیتر در مرکز پلیت‌های حاوی جدایه‌های اندوفیت مختلف و ۳ سویه *Cellulomonas* قرار گرفت و تشکیل حلقه باکتریایی پس از ۴۸ ساعت بررسی شد. اجزای محیط سنتزی مالات عبارتند از: DL-مالیک اسید ۵ گرم، هیدروکسید پتاسیم ۴/۵ گرم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۶ گرم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۰/۴ گرم، سولفات منیزیم ۰/۲ گرم، کلرید سدیم ۰/۱ گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۰۱ گرم، مولیبدات سدیم ۰/۰۰۲ گرم، اتیلن دی آمین تترااستات فریک (۰/۶۶ درصد وزن/حجم در آب) ۱۰ میلی‌لیتر، بیوتین ۰/۰۱ گرم، کلرید آمونیوم ۰/۵ گرم، عصاره مخمر)(۳).

تلقیح باکتریایی گیاهچه‌های برنج و گندم

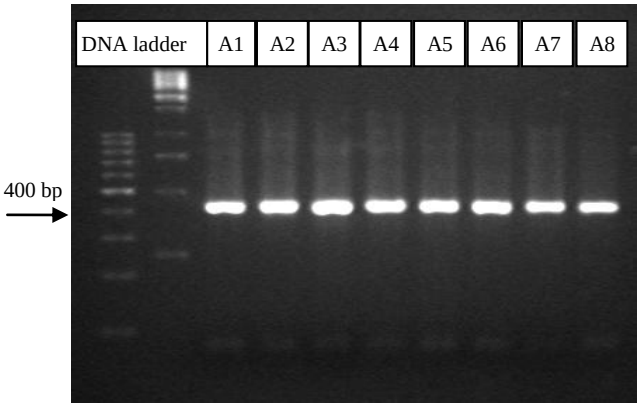
به منظور بررسی تاثیر برهمکنش از دو باکتری دارای فعالیت سلولازی (جدایه‌های A5 و A6) و از دو باکتری فاقد فعالیت سلولازی (جدایه‌های A2 و A3) استفاده و برهمکنش آن‌ها با *C. uda* ATCC 491 بررسی و برخی از شاخص‌ها نظیر تعداد باکتری در ریشه و وزن تر، تعداد و طول ریشه اندازه‌گیری شد.

۸۰ بذر سالم گندم و ۸۰ بذر سالم برنج انتخاب و با هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی شدند (۱۱) و سپس بذرها استریل شده در تیمارهای سوسپانسیون‌های باکتریایی به مدت ۲ دقیقه قرار گرفتند. تعداد باکتری‌ها $۱/۵\times۱۰^{۷}$ واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر[۲۱] و تعداد *Cellulomonas*، $۱/۵\times۱۰^{۸}$ واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر بود. تیمارهای سوسپانسیون‌های باکتریایی منفرد شامل: ۲ میلی‌لیتر جدایه مورد آزمایش و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و تیمارهای توأم شامل: ۲ میلی‌لیتر جدایه مورد آزمایش و ۲ میلی‌لیتر *Cellulomonas* بود. شاهد آزمایش شامل بذرهایی بودند که در بافر فسفات استریل قرار گرفتند (۱۲). بذور تلقیح‌شده روی کاغذ صافی آغشته به محیط فاقد ازت غنی شده با نیترات پتاسیم (۰/۰۲۵ درصد) به مدت ۴ روز در تاریکی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد داخل پلیت قرار گرفتند تا جوانه بزنند. بذرهای جوانه‌زده داخل اپندورف‌هایی که ته آن بریده شده بود قرار گرفتند و سپس این اپندورف‌ها داخل لوله‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط فاقد ازت قرار داده شدند. سپس لوله‌ها داخل اطاقک رشد با دوره نوری ۱۴ ساعت نور و ۱۰ ساعت تاریکی و به ترتیب در دمای ۲۷ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از گذشت ۷ روز گیاهچه‌ها از داخل لوله برداشته شده و شاخص‌های کمی شامل وزن تر، طول ریشه و تعداد ریشه اندازه‌گیری شد (۱۲). مقدار ۰/۰۲ گرم از ریشه مربوط به هر تکرار وزن و استریل سطحی و پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، در ۱ میلی‌لیتر آب مقطر هموژنیزه گردید و از آن سری رقت‌های $۱۰^{-۱}$، $۱۰^{-۲}$ و $۱۰^{-۳}$ تهیه و از هر رقت مقدار ۲۰۰ ماکرولیتر به داخل پلیت حاوی محیط فاقد ازت منتقل و کلونی‌های اندوفیت شمارش شد.

نتایج

جداسازی و شناسایی آزوسپیریلوم‌های اندوفیت

جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تکثیر ژن ۱۶S rDNA با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز شناسایی شدند (شکل ۱). تمام هفت جدایه گرم منفی، دارای فعالیت کاتالاز، احیاکننده نیترات بوده و تشکیل پلیکل در محیط فاقد ازت نزدیک به سطح داده و همچنین، تثبیت ازت را تحت شرایط میکروآئروفیلیک وقتی که مالات، سیترات و L-رامنوز به عنوان تنها منبع کربن استفاده می‌شد انجام می‌دادند. در شناسایی مولکولی، باند مشابه ۴۰۰ جفت باز برای تمام جدایه مشاهده شد. نتایج تایید نمود که تمام باکتری‌های استفاده شده در این مطالعه بر اساس ۱۶S rDNA، *Azospirillum* هستند.



شکل ۱- الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۵ درصد مربوط به تکثیر قطعه ۴۰۰ جفت باز از ۱۶S rDNA در جدایه‌های اندوفیت و سویه‌های استاندارد

سنجش کمپلکس آنزیمی سلولاز

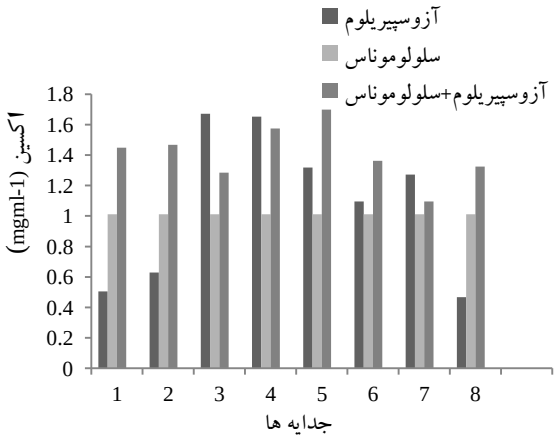
در بین جدایه *Azospirillum* که از ریشه‌های برنج و گندم جداسازی شده بودند، دو جدایه A6 و A5 به ترتیب از گندم و برنج به منظور مقایسه فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی انتخاب شدند. علت انتخاب رشد بیشتر این دو جدایه در محیط‌های سلولز، کربوکسی متیل سلولز و سالیسین آگار بود. هیچکدام از جدایه‌ها دارای فعالیت پکتیناز نبودند، اما سویه جدا شده از برنج دارای فعالیت کربوکسی متیل سلولازی بیشتری بود.

جدایه A6، به منظور بررسی فعالیت آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی روی محیط‌های کربوکسی متیل سلولز، سلولز و سالیسین مایع رشد داده شدند. حداکثر فعالیت کربوکسی متیل سلولاز، ۱/۳۲ واحد بر میلی‌لیتر طی ۵ روز رشد در محیط کربوکسی متیل سلولز مایع بود اما وقتی در محیط سلولز مایع رشد نمودند فعالیت آنزیم به ۱/۸۸ واحد بر میلی‌لیتر رسید. فعالیت سلوبیاز برای هر دو جدایه در تمام محیط کم بود. فعالیت FPase در محیط کربوکسی متیل سلولز مایع کم بود، اما فعالیت این آنزیم در محیط‌های سلولز و کاغذ فیلتر مایع ۰/۸ واحد بر میلی‌لیتر بود. در مقایسه با جدایه A6، جدایه A5 دارای فعالیت کربوکسی متیل سلولاز ۱۳/۷۷درصد بیشتر در محیط کاغذ فیلتر، کربوکسی متیل سلولز و سلولز مایع بوده، اما دارای فعالیت سلوبیاز و FPase بالایی در هر یک از محیط‌های مورد آزمایش نبود. حداکثر فعالیت کربوکسی متیل سلولاز در *C. uda* ATCC 491، ۱/۸ واحد بر میلی‌لیتر و در روز سوم بود. بنابراین، مشخص شد به طور کلی اعضای جنس *Azospirillum* جدا شده از برنج دارای فعالیت کربوکسی متیل سلولاز بیشتری بوده و این فعالیت بیشتر ممکن است برای برهمکنش با ریشه برنج حائز اهمیت باشد.

سنجش اکسین

به طور کلی اعضای جنس *Azospirillum* جدا شده از ارقام برنج اکسین بیشتری را نسبت به جدایه‌های گندم تولید می‌کردند. در سنجش کمی با استفاده از

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، جدایه A3 در محیط‌های حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان، بیشترین مقدار اکسین را به مقدار ۰/۹۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پس از ۷۲ ساعت تولید نمود. همچنین *C. uda* ATCC 491 در محیط حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان مقدار ۱/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اکسین تولید نمود. مقدار اکسین تولید شده طی تلقیح توأم جدایه‌های A3 و A5 با *Cellulomonas* به ترتیب ۱/۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۱/۶۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. همان‌طوری که در شکل ۲ مشاهده می‌شود برای اکثر جدایه‌ها، تلقیح توأم با *C. uda* ATCC 491 تولید اکسین را تحریک می‌کند. در تلقیح توأم نسبت به تلقیح منفرد، تولید اکسین برای جدایه‌های A2، A5 و A6 (به ترتیب ۱۳۳/۶۸، ۲۸/۸۲ و ۲۴/۳۲ درصد) افزایش پیدا کرد، در حالی‌که برای جدایه A3 (۲۴/۷۵ درصد) کاهش پیدا کرد. در این مطالعه راندمان تولید اکسین در تلقیح‌های منفرد برای جدایه A3، ۳۳ درصد بوده و تلیقح توأم، تولید اکسین را توسط برخی جدایه‌ها افزایش داد اما برای جدایه A3 کاهش مشاهده شد.



شکل ۲- نمودار تولید اکسین در تلقیح منفرد جدایه‌های *Azospirillum* و همچنین، توأم با *C. uda* ATCC 491 در غلظت ۵۰۰۰ ماکروگرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان پس از گذشت ۷۲ ساعت

کموتاکسی

در بررسی کموتاکسی به ریشه ارقام برنج مشخص شد که دو جدایه دارای کموتاکسی به طرف تراوشات ریشه‌های سه روزه نبوده، اما دارای کموتاکسی به طرف تراوشات ریشه هفت روزه بودند. میزان کموتاکسی جدایه‌ها به تراوشات ریشه سه و هفت روزه متفاوت بود. برخی جدایه‌ها به تراوشات ریشه سه روزه و برخی دیگر به تراوشات ریشه هفت روزه کموتاکسی قویتری نشان دادند. در اکثر موارد، هر چند باکتری جدا شده کموتاکسی قوی را نسبت به تراوشات میزبان خود داشت، اما لزوماً این کموتاکسی قوی تر از سایر جدایه‌ها (از ارقام دیگر) نبود. کموتاکسی متقابل بین جدایه‌های ارقام گندم و تراوشات ریشه برنج و همچنین، جدایه‌های ارقام برنج و تراوشات ریشه گندم مشاهده شد. جدایه‌های A2، A3، A4 و A5 و همچنین، *C. uda* ATCC 491 دارای کموتاکسی به طرف تراوشات ریشه‌های ارقام هاشمی (برنج) و گندم (شیرازی) بوده و جدایه‌های A5 و A6 دارای قویترین کموتاکسی به ترتیب به سمت تراوشات سه و هفت روزه برنج وسه روزه گندم بودند؛ در حالی‌که قویترین کموتاکسی برای جدایه‌های A2 و A3 به ترتیب به سمت تراوشات ریشه سه و هفت گندم و برنج مشاهده شد.

تلقیح باکتریایی گیاهچه‌های برنج و گندم

نتایج مقایسه بین میانگین‌ها بر اساس دانکن (نرم افزار SAS) در ارتباط با برنج نشان می‌دهد که تیمارها در سطح $\alpha <$ ۰/۰۱ در وزن تر اختلاف معنی‌دار نداشته ولی در تعداد و طول ریشه با هم اختلاف معنی‌دار دارند (جدول ۱). میانگین وزن تر در تیمارهای توأم جدایه‌ها با عدم فعالیت سلولازی و *Cellulomonas* نسبت به سایر تیمارها بیشتر است.

همچنین، نتایج مقایسه بین میانگین‌ها بر اساس دانکن در ارتباط با گندم نشان می‌دهد که تیمارها در سطح $\alpha <$ ۰/۰۱ در وزن تر و تعداد ریشه اختلاف معنی‌دار نداشته ولی در طول ریشه با هم اختلاف معنی‌دار دارند (جدول ۲) هر چند تیمارها در وزن تر با هم اختلاف معنی‌دار ندارند، ولی میانگین وزن تر در تیمارهای توأم جدایه‌ها با عدم فعالیت سلولازی و *Cellulomonas* نسبت به سایر تیمارها بیشتر است. همچنین، میانگین تعداد ریشه در تیمارهای باکتریایی با عدم فعالیت سلولازی بیشتر است.

نتایج نشان داد که *C. uda* ATCC 491 کلونیزاسیون A3 و A2 را روی برنج (جدول ۲) و نیز A5 و A6 را روی ریشه گندم تحریک می‌نماید.

جدول ۱- مقاییسه درصد کلونیزاسیون روی ریشه برنج (۰/۰۲ گرم، رقم هاشمی) در تلقیح منفرد و توأم با *Cellulomonas* (+: فعالیت سلولازی، -: عدم فعالیت سلولازی و +C: توأم با *C. uda* (ATCC 491

تیمارها	مایع تلقیح اولیه (واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر)	باکتری‌های کلونیزه شده (واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر)	میزان کلونیزاسیون (درصد)
A_5 (+)	۷/۵×۱۰^{۶}	۳۸/۶۰×۱۰^{۴}	۵/۱۴
A_6 (+)	۷/۵×۱۰^{۶}	۸۲/۹۰×۱۰^{۴}	۱۱/۰۵
A_2 (-)	۷/۵×۱۰^{۶}	۴/۴۰۰×۱۰^{۴}	۰/۵۸
A_3(–)	۷/۵×۱۰^{۶}	۳۷/۸۰×۱۰^{۴}	۵/۰۴
A_5 (+) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۴۴۶/۵×۱۰^{۴}	۵۹/۵۳
A_6 (+) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۰/۷۳۰×۱۰^{۴}	۰/۰۹
A_2 (-) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۳۶۲۸×۱۰^{۴}	>۱۰۰
A_3 (-) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۴۵۷۸×۱۰^{۴}	>۱۰۰

جدول ۲- مقایسه درصد کلونیزاسیون روی ریشه گندم (۰/۰۲ گرم، رقم شیرازی) در تلقیح منفرد و توأم با *Cellulomonas* (+: فعالیت سلولازی، -: عدم فعالیت سلولازی و C +: توأم با *C. uda* (ATCC 491.

تیمارها	مایع تلقیح اولیه (واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر)	باکتری‌های کلونیزه شده (واحد تشکیل دهنده کلونی بر میلی‌لیتر)	میزان کلونیزاسیون (درصد)
(+) A_5	۷/۵×۱۰^{۶}	۱۱۴۲×۱۰^{۴}	>۱۰۰
(+) A_6	۷/۵×۱۰^{۶}	۱۶۷۲۰×۱۰^{۴}	>۱۰۰
(–) A_2	۷/۵×۱۰^{۶}	۳۵۵۶×۱۰^{۴}	>۱۰۰
(–) A_3	۷/۵×۱۰^{۶}	۲۷۵۷×۱۰^{۴}	>۱۰۰
A_5 (+) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۴۸۳۷۰۰×۱۰^{۴}	>۱۰۰
A_6 (+) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۱۸۲۵۰×۱۰^{۴}	>۱۰۰
A_2 (-) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۳۴×۱۰۴	۴/۵۳
A_3 (-) + C	۷/۵×۱۰^{۶}	۱۹۴×۱۰۴	۲۵/۸۶

بحث و نتیجه‌گیری

کلونیزاسیون باکتری‌های ریشه یک فاکتور کلیدی در برهمکنش بین باکتری-گیاه است (۱۳ و ۱۴). فاکتورهای کلونیزاسیون در *Azospirillum* مطالعه شده است. مکان اصلی کلونیزاسیون اعضای جنس *Azospirillum* دیواره سلولی ریشه‌ها است که اساساً از سلولز تشکیل شده و در یک بستری پلی‌ساکاریدی بی‌شکل نظیر: همی‌سلولز، پکتین، برخی گلیکان‌ها و پروتئین‌ها فرو رفته‌اند. در مطالعات انجام شده توسط پژوهشگران مختلف، نشان داده شده که اعضای جنس *Azospirillum* ممکن است از طریق تجزیه آنزیمی تیغه میانی دیواره سلولی وارد فضای بین سلولی اپیدرم ریشه شوند (۲، ۱۵ و ۱۶). به جز *Azospirillum irakense*، هیچ کدام از گونه‌های *Azospirillum* نمی‌توانند روی پکتین به عنوان جزو اصلی دیواره سلولی اولیه و تیغه میانی به عنوان تنها منبع کربن رشد کنند (۱۷ و ۱۸) اما، در سال ۲۰۰۱ نشان داده شد که *Azospirillum lipoferum* جدا شده از برنج نیز دارای فعالیت پکتیناز است (۱۹). پلی گالاکتورونیک اسید و پکتین نیز توسط *Azospirillum brasilense* در محیط مایع و جامد

استفاده می‌شود. فعالیت پلی گالاکتورونیک اسید الامیناز (پکتیک لیاز) نیز در کشت این سویه یافت می‌شود، اما این سویه نمی‌تواند هیچ گونه پلی‌ساکارید دیواره سلولی گیاهان را استفاده کند. توانایی گونه‌های *Azospirillum* در تجزیه پکتین می‌تواند در نفوذ این باکتری‌ها در تیغه میانی ریشه علفی‌ها کمک کند (۲۰). احتمال دیگری که وجود دارد این است که آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلی ساکاریدها در اعضای جنس *Azospirillum*، منابع کربن قابل استفاده‌ای را برای سایر باکتری‌ها در مسیر فعالیت هیدرولیتیکی آن‌ها طی مراحل هجوم به ریشه گیاهان فراهم آورند. هالسال و گودچیلد[۲۲] نشان دادند که اعضای جنس *Azospirillum* به تنهایی قادر به استفاده از کاه یا سلولز به عنوان سوبسترا برای رشد و منبع انرژی برای فعالیت نیتروژناز نبوده، اما به دنبال فعالیت سلولولتیک *Cellulomonas* می‌توانند از اولیگوساکاریدهای حاصله برای رشد و تثبیت ازت استفاده کنند. از این رو مطالعات نشان می‌دهد که برخی از جدایه‌های *Azospirillum* دارای فعالیت سلولازی و پکتینازی بوده و برخی دیگر دارای این توانایی نمی‌باشند (۲۱). در این تحقیق هیچ کدام از جدایه‌ها توانایی تولید آنزیم پکتیناز را نداشتند. با توجه به خشبی و سخت‌تر بودن دیواره سلولی در برنج نسبت به گندم و همان طور که در این تحقیق نشان داده شد، تصور می‌شود فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی در جدایه‌های برنج از جدایه‌های گندم بیشتر باشد. با توجه به سلولزی و لیگنینی بودن دیواره سلولی، به نظر می‌رسد تولید برخی از آنزیم‌های سلولازی در کلونیزاسیون اولیه این جدایه‌ها دخالت داشته باشند.

در ارتباط با تولید اکسین توسط جدایه‌ها به تنهایی و در کشت توأم، کاسانا و همکاران[۲۳] با مطالعه تلقیح توأم *Azospirillum brasilense* AZ39 و *Bradyrhizobium japonicum* E109 در مقایسه با تلقیح منفرد هر یک از آن‌ها، گزارش نمودند که این دو سویه به علت تولید فیتوهورومون‌ها و از آن جمله IAA، باعث افزایش در تعداد گرهک و همچنین، افزایش در طول ریشه، وزن خشک ریشه، طول جوانه و وزن خشک دانه در گیاه ذرت ۱۴ روزه می‌شوند. مقدار IAA تولید شده توسط *Azospirillum* ۱۳/۱۶±۰/۳۳ ماکروگرم بر میلی‌لیتر و *Bradyrhizobium* ۶/۶۲±۰/۳۷ ماکروگرم بر میلی‌لیتر (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) بود (۲۲). اگامبردایورا و همکاران[۲۴]، اثر *Rhizobium galga* به تنهایی و توأم با سویه‌های *Pseudomonas* کلونیزه شونده به ریشه را در گیاه fodder galegae در سطوح کم نیتروژن بررسی کردند. هشت هفته پس از تلقیح توأم این باکتری با *Pseudomonas trivialis* 3Re2 یا *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20، افزایش در ماده خشک ریشه و گیاهچه در مقایسه با تلقیح منفرد *Rhizobium galga* مشاهده شد. هر دو سویه *Pseudomonas* در محیط کشت IAA تولید نمودند، اما *Rhizobium galga* فاقد این توانایی نبود. همچنین، *Pseudomonas trivialis* 3Re2 با تولید سلولاز به طور معنی‌داری تعداد گرهک و مقدار ازت را در تلقیح توأم افزایش داد. از این رو این سویه باعث بهبود برهمکنش *Rhizobium* – لگوم شده و به عنوان باکتری کمک کننده *Rhizobium* عمل کرد. به نظر می‌رسد تولید IAA و یا سلولاز در این برهمکنش نقش داشته باشد (۲۳). بنابراین، تصور می‌شود بازده تولید اکسین در جدایه‌های مطالعه شده در این بررسی، حد واسط بازده تولید اکسین توسط جدایه‌های *Azospirillum* در مطالعات دیگران باشد، اما

از مقدار اکسین بسیاری از باکتری‌های دیگر بیشتر است. به غیر از جدایه A1 سایر جدایه‌ها توانایی تولید اکسین را در محیط فاقد تریپتوفان داشتند. مقدار تولید اکسین در اکثر موارد با افزایش غلظت تریپتوفان افزایش پیدا می‌کرد. به طور کلی جدایه‌های برنج نسبت به جدایه‌های گندم اکسین بیشتری تولید کردند. در آزمایش‌های تلقیح توأم، استفاده از تلقیح توأم *Azospirillum* و *Cellulomonas* در تولید اکسین راندمان بیشتری نسبت به خود اعضای جنس *Azospirillum* به تنهایی داشت.

برای اثبات تأثیر اکسین روی ریشه از محلول عبوری از فیلتر (فیلترات) کشت جدایه A3 استفاده شد. هر چند تحلیل آماری هیچ اختلاف معنی‌داری را بین تیمارها برای تعداد و همچنین، وزن خشک ریشه نشان نداد، اما در غلظت‌های ۴ و ۹ درصد تعداد و وزن خشک ریشه بیشتر حاصل شد. یکی از دلایل احتمالی کاهش تولید اکسین در تلقیح توأم در مقایسه با مجموع تولید اکسین در تلقیح منفرد، اثر مهاری اکسین زیاد روی مسیرهای بیوسنتزی خود در باکتری‌هاست.

در ارتباط با نقش کموتاکسی در کلونیزاسیون، مطالعات نشان می‌دهد که *Azospirillum* و *Cellulomonas* به بسیاری از ترکیبات و تراوشات ریشه گیاهان کموتاکسی دارند. رینولد و همکاران[۲۵] گزارش کردند که کموتاکسی در جنس *Azospirillum* اختصاصی سویه است. واکنش سویه‌ها به برخی از گیاهان C_4 مثل ذرت و علف کالار مشابه بوده و متفاوت از کموتاکسی جدایه‌ها به سمت گیاه C_3 گندم است. همچنین، آن‌ها بیان کردند که پاسخ‌های کموتاکتیک مختلف به اسیدهای آلی با ترشح این اسیدها از ریشه‌های گیاه میزبان مرتبط است. چندین گیاه C_3 و C_4 الگوهای ترشحی متفاوتی از هم نشان می‌دهند. مالات که به عنوان اسید آلی غالب ترشح شده از ریشه کالار است، در مقادیر بیشتر در ریشه‌های ذرت نیز یافت می‌شود. در مقابل اگزالات در تراوشات علف کالار یافت نشده اما به عنوان اسید آلی غالب در تراوشات ریشه‌های برنج و گندم است. مالات در مقادیر کمتر یافت شده و یا به هیچ وجه در تراوشات ریشه این گیاهان یافت نمی‌شود. در نتیجه مالات به عنوان یک ماده جاذب قوی برای جدایه‌های حاصل از کالار و ذرت بوده و جدایه حاصل از گندم فقط به طور ضعیف جذب آن می‌شود (۳).

الکساندره و زولین[۲۶] کموتاکسی *Azospirillum brasilence* را به سمت ترکیبات تیپیک تراوشات ریشه گیاهان مطالعه کردند. آن‌ها کموتاکسی نسبت به بسیاری از ترکیبات آلی نشان دادند. مؤثرترین ماده جاذب مالات، سوکسینات، فروکتوز و ترکیبات دیگر بودند که به عنوان سوبسترا برای *Azospirillum brasilence* محسوب می‌شوند. پاسخ کموتاکتیک برای اکثر ترکیبات القاپذیر، اما در مورد مالات و سوکسینات دائمی بوده است. پاسخ گرایشی طی فرآیند تثبیت ازت الزاماً مشابه حضور ازت تثبیت‌شده در محیط است. در بین ترکیبات آلی نیز ماده دافع شناسایی نشد (۲۴). در این مطالعه نشان داد که *Azospirillum* و *Cellulomonas* به دلیل داشتن کموتاکسی متحرک هستند. الگوی کموتاکسی در بین جدایه‌های *Azospirillum* متفاوت بوده و زمان رشد ریشه، مقدار و شاید نوع تراوشات در زمان‌های مختلف رشد ریشه در این الگو تاثیر بگذارد. همچنین، کموتاکسی متقابل بین جدایه‌های برنج و تراوشات گندم و همچنین جدایه‌های گندم و تراوشات برنج این ایده را

عنوان می‌نماید که ممکن است مواد جاذب مشابهی برای *Azospirillum* جدا شده از ریشه‌های برنج و گندم وجود داشته باشد. بنابراین، در چنین مواردی شاید بتوان از یک *Azospirillum* برای دو گیاه استفاده نمود.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جدایه‌های *Azospirillum* به تنهایی با تولید مقادیر کمابیش بالایی از اکسین باعث توسعه سیستم ریشه‌ای شده که این سبب افزایش مکان‌های کلونیزاسیون بیشتری برای خود آن‌ها می‌شود. تلقیح توأم در مقایسه با تلقیح منفرد با تولید اکسین بیشتری همراه است. به عبارتی این برهمکنش باعث افزایش بیشتری در توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه شده که این نیز به نوبه خود سبب جذب آب و مواد معدنی بیشتری از ریشه شده و همچنین، تعداد مکان‌های کلونیزاسیون را در ریشه برای باکتری‌های مفیدی نظیر *Azospirillum* افزایش می‌دهد و در نهایت با افزایش شاخص‌های کمی و کیفی گیاه همراه خواهد بود. به عبارتی *Cellulomonas* به عنوان یک کمک‌کننده برای *Azospirillum* از نظر تولید اکسین محسوب می‌شود.

References

(1) Bashan Y, Holguin G. *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances. *Can J Microbiol* 1997; 43(2): 103-21.

(2) Tien TM, Diem HG, Gaskins MH, Hubbell DH. Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can J Microbiol* 1981; 27(4): 426-31.

(3) Reinhold B, Hurek T, Fendrik I. Strain-specific chemotaxis of *Azospirillum* spp. *J Bacteriol* 1985; 162(1): 190-5.

(4) Adler J. Chemotaxis in bacteria. *Science* 1966; 153(3737): 708-16.

(5) Martin-Didonet CCG, Chubatsu LS, Souza EM, Kleina M, Rego FGM, Rigo LU, et al. Genome structure of the genus *Azospirillum*. *J. Bacteriol* 2000; 182(14): 4113-6.

(6) Gliesche CG, Menzel M, Fesefeldt A. A rapid method for creating species-specific gene probes for methylotrophic bacteria. *J Microbiol Meth* 1997; 28(1): 25-34.

(7) Mandel M, Weber J. Exoglucanase activity by microorganisms. *Adv Chem* 1969(23); 95: 391-414.

(8) Soares M, Da Silva R, Gomes E. Screening of bacterial strains form pectinolytic activity: Characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Braz J Microbiol* 1999; 30(4): 299-303.

(9) Bent E, Tuzun S, Chanway C, Enebak S. Alternation in plant growth and in root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. *Can J Microbiol* 2001; 47(9): 793-800.

(10) El-Khawas H, Adachi K. Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol Fert Soils* 1999; 28: 377–81.

(11) Ogut M, Akdag C, Duzdemir O, Sakin MA. Single and double inoculation with *Azospirillum*/*Trichoderma*: The effects on dry bean and wheat. *Biol Fertil Soils* 2005; 41(4): 262-72.

(12) Bashan Y, Holguin G. Factors affecting adsorbtion of *Azospirillum brasilense* Cd to root hairs as compared with root surface of wheat. *Can J Microbiol* 1989; 35(10): 936-44.

(13) Okon J. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol* 1985; 3(9): 223-8.

(14) Bashan Y. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brusilense* and *Pseudomonas fluuorescens* towards wheat roots in the soil. *J Gen Microbiol* 1986; 132(12): 3407-14.

(15) Umali-Garcia M, Hubbell D, Gaskins MH, Dazzo FB. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl Environ Microbiol* 1980; 39(1): 219-26.

(16) Okon Y, Kapulnik Y. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil* 1986; 90(1-3): 3-16.

(17) Faure D, Desair J, Keijers V, Bekri MA, Proost P, Henrissat B, et al. Growth of *Azospirillum irakense* KBC1 on the aryl L-glucoside salicin requires either salA or salB. *J Bacteriol* 1999; 181(10): 3003-9.

(18) Bekri MA, Desair J, Keijers V, Proost P, Leeuwen MS, Vanderleyden J, et al. *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J Bacteriol* 1999; 181(8): 2440-7.

(19) Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki H, Ye B, Hamada T, et al. Endophytic colonization and in plants nitrogen fixation by a Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species. Appl Environ Microbiol 2001; 67(11): 5285-93.

(20) Myers ML, Hubbel DH. Plant cell wall carbohydrates as substrates for *Azospirillum brasiliense*. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53(12): 2745-8.

(21) Halsall DM, Goodchild DJ. Nitrogen fixation associated with development and localization of mixed populations of *Cellulomonas* sp. and *Azospirillum brasilense* grown on cellulose or wheat straw. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51(4): 849-54.

(22) Cassana F, Perriga D, Sgroya V, Masciarellia Penna C, Luna V. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *Eur J Soil Biol* 2009; 45(1): 28-35.

(23) Egamberdieva D, Berg G, Lindstrom K, Rasanen LA. Co-inoculation of *Pseudomonas* spp. with *Rhizobium* improves growth and symbiotic performance of fodder galega (*Galegaorientalis* Lam.). *Eur J Soil Biol* 2010(3-4); 46: 269-72.

(24) Alexandre G, Zhulin IB. Chemotaxis in soil diazotrophs: Survival and adaptive response. In: Elmerich C, Newton WE (eds). Associative and endophytic nitrogen-fixing bacteria and cyanobacterial associations. The Netherlands: Springer; 2007. p. 72-84.

---

[1]. Plant growth promoting rhizobacteria
[2]. Mucilage
[3]. Cortical
[4]. Interaction
[5]. Co-inoculation
[6]. Nitrogen free medium (NFB)
[7]. Pellicle
[8]. Sodium dodecyl sulfate (SDS)
[9]. Polymerase chain reaction (PCR)
[10]. http://www.ncbi.nem.nih.gov
[11]. Bio Rad
[12]. Carboxy methyl cellulose (CMC)
[13]. Filter paper
[14]. Dinitrosalicylic acid (DNS)
[15]. Trypticase soy broth (TSB)
[16]. Salkowski reagent
[17]. High performance liquid chromatography (HPLC)
[18]. Knauer
[19]. Flow rate
[20]. Alder
[21]. Colony forming unit (CFU/ml)
[22]. HasallDM, Goodchild DJ
[23]. Cassana F et al
[24]. Egamberdieva D
[25]. Reinhold B et al
[26]. Alexandre G and Zhulin IB

Improvement of endophytic *Azospirillum* colonization by co-inoculation with *Cellulomonas Uda* ATCC 491

Mohammad Javad Mehdipour Moghaddam *
Assistant Professor of Microbiology, University of Guilan, Rasht, Iran, mj_mehdipour@guilan.ac.ir
Giti Emtiazi
Professor of Microbiology, University of Isfahan, Iran, emtiazi@yahoo.com
Majid Bouzari
Associate Professor of Virology, University of Isfahan, Iran, bouzari@sci.ui.ac.ir

Abstract

Introduction: Most of the plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) such as *Azopirillum* if accompanied with strong cellulase producing bacteria such as *Cellulomonas*, their colonization may be increased and their host plants growth improved.

Materials and methods: Six endophytic Azospirilla which isolated from three rice and three wheat cultivars and also one strain from commercial biofertilizer (Green Biotech Co.), identified by biochemical tests and 16S rDNA analysis and were studied on the basis of cellulase, pectinase and auxin production and also their chemotaxis toward rice and wheat cultivars exudates was investigated. Two cellulase positive (A_5 and A_6) and two negative (A_2 and A_3) strains were selected and their interaction with *C. uda* ATCC 491 on auxin production and colonization on roots were compared.

Results: This study showed that none of the strains had pectinase activity, but the strain isolated from rice had more Carboxy methyl cellulase (CMCase) activity. Selected isolates and *C. uda* ATCC 491 showed chemotaxis toward roots exudates. In most of the isolates, rate of auxin production increased by coculture with *C. uda* ATCC 491. Also, it was determined that *C. uda* ATCC 491 promoted the colonization of *Azospirillum* without or with cellulase activity on rice and wheat roots, respectively.

Discussion and conclusion: Co-inoculation *Azospirillum* with *C. uda* ATCC 491 improves plant root system due to stimulation or additive effect of auxin production and cellulase activity, followed by more uptakes of water and minerals by roots. Also, it raises the number of colonization niches for useful bacteria such as *Azospirillum* and finally quantitative and qualitative plant parameters.

Key words: *Azospirillum*, Cellulase, Chemotaxis, Auxin, Colonization, Co-inoculation, *Cellulomonas*

* Corresponding author
Received: July 21, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013