مقایسه فعالیت آنزیمهای فیتاز و سلولاز درآزوسپیریلوم‌های اندوفیت برنج و گندم

محمدجواد مهدی‌پور مقدم[۱]، گیتی امتیازی*[۱،] و زیور صالحی[۲]

[۱] **اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی**

[۲] **رشت، دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی**

تاریخ دریافت: ۸۸/۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۹/۱۶

چکیده

شش باکتری تثبیت‌کننده ازت که از ریشه‌های برنج و گندم و همچنین یک سویه که از نوعی کود زیستی جداسازی شده بودند، با استفاده از تکثیر ژن 16S rDNA به عنوان *Azospirillum* شناسایی شدند. در بین سویه‌های *Azospirillum* جداشده از ریشه‌های برنج و گندم، یک جدایه از ریشه گندم (رقم گلستان) و یک جدایه از ریشه برنج (رقم طارم) به دلیل فعالیت بیشتر در محیطهای سلولز، کربوکسی متیل سلولز (CMC)، سالیسین، پکتین، NBRIP و فیتین، به منظور مقایسه فعالیت آنزیمهای تجزیه‌کننده دیواره سلولی گزینش گردیدند. *Azospirillum* جداسازی شده از برنج به طور معنی‌داری دارای فعالیت CMCase و فیتاز بیشتری نسبت به جدایه گندم (به ترتیب ۳۱/۷۷ و ۴۶/۹۹ درصد بیشتر) بود، اما فعالیت آنزیم فیلتر غشایی (FPase) در هر دو سویه تقریباً مشابه بود. علت کلونیزاسیون جدایه طارم با فعالیت بیشتر سلولازی و فیتازی ممکن است محتوای فیتین بیشتر و دیواره سلولی سلولزی‌تر این رقم در مقایسه با رقم گلستان باشد.

واژه‌های کلیدی: تثبیت ازت، *Azospirillum*، سلولاز، پکتیناز، فیتاز.

* **نویسنده مسئول**، تلفن: ۰۹۱۱۳۳۶۸۴۷۷، پست الکترونیکی: emtiazi@yahoo.com

مقدمه

برخلاف اکثر مقالات در دهه‌های۸۰-۱۹۶۰ که توجه خود را روی باکتریهای ریزوسفری به عنوان تثبیت‌کنندگان احتمالی ازت معطوف نموده‌اند، اکثر مطالعات اخیر روی باکتریهای داخل ریشه یعنی "دی‌ازوتروف‌های اندوفیت" به عنوان تثبیت‌کنندگان ازت تأکید می‌نمایند (۵). در سال ۱۹۹۸، James و Olivares (۱۵) به طور خلاصه شواهدی را مرور نمودند که بر اساس آنها دی‌ازوتروف‌های اندوفیت تثبیت‌کنندگان واقعی ازت در گیاهان بوده و ترکیبات ازت تثبیت‌شده را به میزبانهای خود انتقال می‌دهند. مدت زیادی است که باکتریهای جنس *Azospirillum* (زیر رده α از پروتئوباکتریها) به عنوان ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه (PGPR) شناخته شده‌اند (۲۲، ۲۳ و ۲۹). باکتریهای جنس *Azospirillum* دارای پتانسیل تحریک رشد و توسعه گیاهان از طریق تثبیت ازت، اثرات هورمونی، بهبود توسعه ریشه (۲ و ۲۹) و افزایش خروج پروتون در ریشه می‌باشند. این باکتریها از ریشه بسیاری از گیاهان علفی و غلات در اقلیمهای گرمسیری و معتدل سراسر جهان جداسازی شده‌اند. به طور کلی باکتریهای *Azospirillum* به عنوان باکتریهای ریزوسفری در نظر گرفته می‌شوند، اما تفاوتهای اختصاصی در حد سویه در ارتباط با نحوه کلونیزاسیون ریشه در آنها مشاهده می‌گردد. در اکثر موارد آنها در سطح ریشه کلونیزه شده و فقط تعدادی از این سویه‌ها گیاهان را آلوده می‌کنند (۵، ۱۴ و ۲۵). برخی از سویه‌های *Azospirillum* دارای مکانیسم‌های اختصاصی جهت برهمکنش با ریشه‌ها و حتی کلونیزاسیون در داخل ریشه هستند و برخی دیگر در لایه مخاطی یا سلولهای

Archive of SID
www.SID.ir

آسیب دیده ناحیه پوست کلونیزه می‌شوند. استفاده از پروبهای الیگونوکلئوتیدی نشاندارشده با فلورسنت برای rRNA همراه با scanning confocal microscopy تأیید نمود که *A. brasilense* Sp245 وارد ناحیه ای از سلولهای مویی ریشه شده که ظاهراً دارای دیواره سلولی سالم بوده‌اند، در حالی که سویه Sp7 اساساً به منطقه مویی ریشه در ریزوسفر، در همان رقم گندم برزیلی محدود می‌شود (۱). مبنای فیزیولوژیک هجوم سویه Sp245 مشخص نیست. از طرفی دیگر گونه‌های *Azospirillum* ممکن است از طریق تارهای مویی زخمی و تخریب‌شده ریشه و همچنین بافتهای قشری آسیب دیده در محل انشعابات جانبی ریشه، وارد ریشه شوند. همیاری ریشه گیاه- *Azospirillum* تنها زمانی می‌تواند موفقیت‌آمیز باشد که باکتری بتواند در خاک بقا یافته و به جمعیت قابل توجهی روی سیستم ریشه میزبان برسد.

از آنجا که پکتین جز اصلی تشکیل‌دهنده دیواره سلولی اولیه و تیغه میانی است و فعالیت کم سلولیتیکی و پکتینولیتیکی در کشتهای *Azospirillum* مشاهده شده است، باکتریها ممکن است از طریق تجزیه آنزیمی تیغه میانی دیواره سلولی وارد فضای بین سلولی قشر ریشه شوند (۲۴، ۳۰ و ۳۱). به جز *Azospirillum irakens*، هیچ کدام از گونه‌های *Azospirillum* نمی‌توانند روی پکتین به عنوان تنها منبع کربن رشد کنند، اما در سال۲۰۰۱، Elbeltagi و همکاران (۶) نشان دادند که *Azospirillum lipoferum* جدا شده از برنج دارای فعالیت پکتیناز می‌باشد (۸،۳).

فیتیک‌اسیدها (نمک میو- اینوزیتول هگزافسفات) و مشتقات آنها ممکن است ۵۰ درصد از کل فسفر آلی خاکها را تشکیل دهند (۴ و ۳۳). همچنین فیتیک‌اسید ذخیره اصلی فسفر را در بسیاری از بذور و گرده‌ها تشکیل می‌دهد (۱۸). اینوزیتول‌های اکسیده‌شده به عنوان اجزای غیرسلولزی دیواره سلولی محسوب می‌شوند (۱۶). همچنین نشان داده شده است که اینوزیتول‌های متیله‌شده در محافظت از فشار اسمزی در گیاهان نمک‌دوست دخالت دارند (۱۳). گیاهان از طریق هیدرولیز باندهای استریC-O-P به کمک آنزیمهای فسفاتاز که یکی از آنها فیتاز می‌باشد، از فیتیک‌اسید استفاده می‌نمایند. این آنزیمها به طور معمول در خاک وجود داشته و منشأ آنها میکروارگانیسم‌ها و ریشه گیاهان می‌باشند. فیتازها اساساً در ارتباط با دیواره سلول گیاهی و همچنین موسیلاژ مناطق رأسی ریشه می‌باشند (۷ و ۳۳). فیتاز یک آنزیم مهم جهت قابل استفاده نمودن ذخایر فسفری برای گیاهچه‌های در حال رشد و تندش گرده می‌باشد (۳۲). به نظر می‌رسد باکتریهای *Azospirillum* می‌توانند به سلولهای ریشه از طریق آنزیمهای تجزیه‌کننده دیواره سلولی شامل کمپلکس سلولاز، پکتیناز و فیتاز هجوم بیاورند. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتریهای *Azospirillum* از ریشه‌های ارقام برنج و گندم و بررسی مقایسه‌ای فعالیت آنزیمهای تجزیه‌کننده دیواره سلولی نظیر کمپلکس سلولاز، پکتیناز و فیتاز در سویه‌های جدا شده می باشد.

مواد و روشها

جداسازی باکتریها: نمونه‌های ریشه تازه از سه رقم گندم (گلستان، شیرازی، سفیدمحلی) و از سه رقم برنج (طارم، خزر، هاشمی) در استان گیلان فراهم شدند. نمونه‌های ریشه به منظور جداکردن ذرات خاک متصل به سطح ریشه به مدت ۲۰ دقیقه با آب شیر 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 میلی‌متری بریده شدند. قطعات بعد از فشرده‌شدن با پنس استریل، به محیط نیمه‌جامد NFb انتقال داده شدند. اجزای این محیط عبارتند از: اسیدمالیک ۵ گرم، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۰/۵گرم، سولفات منیزیم ۰/۲گرم، کلرید سدیم ۰/۱گرم، کلرید کلسیم ۰/۰۲گرم، محلول عناصر کمیاب ۲

Archive of SID

www.SID.ir

میلی لیتر، محلول الکلی بروموتیمول بلو ۲ میلی لیتر(۵ درصد)، اتیلن دی آمین ترا استات ۴ میلی لیتر، محلول ویتامین ۱ میلی لیتر، هیدروکسید پتاسیم ۴ گرم، آگار ۱/۷۵ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر (محلول سود برای تنظیم pH تا ۶/۸). اجزای محلول عناصر کمیاب عبارتند از: مولیبدات سدیم ۰/۲ گرم، سولفات منگنز ۰/۲۳۵گرم، اسید بوریک ۰/۲۸گرم، سولفات مس ۰/۰۰۸گرم، سولفات روی ۰/۰۲۴ گرم و آب مقطر ۲۰۰ میلی‌لیتر. محلول ویتامین شامل: بیوتین۰/۰۱ گرم، پیرودوکسین ۰/۰۲ گرم و آب مقطر ۱۰۰ میلی‌لیتر می‌باشد (۱۱). وقتی باکتریهای *Azospirillum* در محیط نیمه جامد تکثیر شوند، یک دیسک رشدی تشکیل می‌گردد که با گذشت زمان تا نزدیک سطح محیط مهاجرت می نماید و در اصطلاح به آن پلیکل گفته می‌شود.

استخراج DNA و تکثیر ژن 16S rDNA با استفاده از PCR: DNA ژنومی از کشتهای خالص با استفاده از پروتئیناز K و سدیم دودسیل سولفات (SDS) به کمک روش فنل- کلروفرم استخراج گردید (۱۰). سپس بمنظور تکثیر ژن 16S rDNA با استفاده از PCR، از پرایمر رفت 5'-AGA GGG GCC CGC GTC CGA TTA GGT AGT T-3' و پرایمر برگشتی 5'-CCC GAC AGT ATC AAA TGC AGT TCC CAG GTT-3' استفاده شد. طول محصول PCR ۴۰۰ جفت‌باز می‌باشد. هر ۲۵ ماکرولیتر محلول واکنش PCR شامل پرایمرها هر کدام ۲ ماکرولیتر (۱۰ ماکرو مولار)، DNA الگو ۲ ماکرولیتر، dNTPs (dATP، dCTP، dGTP و dTTP) ۰/۵ ماکرولیتر (۱۰ میلی مولار)، DNA *Taq Pol* ۰/۵ ماکرولیتر (۰/۲۵ واحد آنزیمی در هر میلی لیتر) (از ژن فن‌آورن، ایران)، بافر PCR 10X ۲/۵ ماکرولیتر، کلرید منیزیم ۰/۵ ماکرولیتر (۵۰ میلی‌مولار) و آب مقطر استریل ۱۵ ماکرولیتر بود. مراحل PCR در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA) انجام گرفت. 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. هر یک از محصول واکنش PCR به مقدار ۵ ماکرولیتر روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد انتقال داده شد. اندازه قطعات DNA در مقایسه با مارکر استاندارد ۱۰۰ جفت باز (DNA ladder) تخمین زده شد.

سنجش کمپلکس سلولاز: سویه‌ها به محیط مایع سلولز، CMC، FP و سالیسین انتقال یافتند. اجزای محیط مایع سلولز بر حسب گرم عبارتند از: سلولز ۱۰، کلرید آهن III ۰/۰۰۴، سولفات آمونیوم ۱، کلرید سدیم ۰/۶، فسفات هیدروژن دی پتاسیم ۰/۵، سولفات منیزیم ۰/۵، فسفات دی هیدروژن پتاسیم ۰/۵، کلرید کلسیم ۰/۰۰۰۲ و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر (pH برابر ۵ الی ۷). محیطهای مایع CMC، FP و سالیسین مشابه محیط مایع سلولز هستند، اما در محیط CMC و سالیسین به جای ۱۰ گرم سلولز، به ترتیب ۱۰ گرم CMC و ۱۰ گرم سالیسین و در محیط FP، ۱۰ گرم کاغذ واتمن شماره یک (تکه های۶*۱ سانتیمتر) استفاده می شود. محیط سلولز به عنوان محیط پایه در نظر گرفته شد و با تغییر منابع کربن، فعالیت کمپلکس آنزیمی سلولاز شامل CMCase، FPase و سلوبیاز در آن منابع بررسی گردید. یک میلی‌لیتر از جدایه‌های باکتریایی (جذب نوری برابر ۰/۵) به فلاسکهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی۱۰۰ میلی‌لیتر محیطهای سلولز، CMC، FP و سالیسین تلقیح و فعالیت آنزیمها به مدت ۵ الی ۶ روز سنجش گردید (۱۷).

یک میلی‌لیتر از مایع رویی از محیطهای سلولز، CMC و FP به لوله‌های آزمایش حاوی ۰/۰۵ گرم CMC (برای سنجش CMCase) یا ۰/۰۵ گرم کاغذ واتمن شماره یک (تکه های۶*۱ سانتی‌متر) (برای سنجش FPase) و یا ۰/۰۵ گرم سالیسین (برای سنجش سلوبیاز) و ۱ میلی‌لیتر بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH برابر ۴/۸ انتقال داده شد و لوله‌ها به مدت ۱ ساعت در۵۰ درجه سانتی‌گراد اینکوبه

Archive of SID
www.SID.ir

شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر محلول دی نیترو سالیسیلیک اسید (DNS) به لوله‌های آزمایش اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شدند. در نهایت ۱ میلی‌لیتر تارتارات سدیم پتاسیم (نمک راشل) و ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به لوله‌ها اضافه و گلوکز آزاد شده از طریق جذب نوری در ۵۷۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۷).

جدول۱- آزمونهای بیوشیمیایی مورد استفاده برای شناسایی باکتریهای جداشده از ارقام گندم و برنج

Characteristic	**A_1***	**A_2**	**A_3**	**A_4**	**A_5**	**A_6**	**A_7**	**A_8**
Growth with NaCl 3%	-	-	+	-	-	-	-	-
Pigment in BMS agar	Pink	-	-	-	-	-	-	-
NO_3^- reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
Sole carbon sources:								
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	-	+	+	+	-	+	+	+
Mannitol	-	+	+	+	-	+	+	+
Sucrose	-	-	+	+	-	+	+	+
Myo-inositol	+	-	+	+			+	
D-sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Rhamnnose	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	+	+	+	+	+	-
D-Mannose	-	+	+	+	-	+	+	+
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-
SIM medium:								
Sulfide	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	a	b	b	b	a
Alkalization in Nfb medium	-	+	+	+	+	+	+	+
Acidification in Peptone-Glucose	-	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+

BMS agar: Malic acid agar +PDA، a: تشکیل لایه سطحی، b: تشکیل لایه سطحی + انتشار

*A_1: *A. brasilense* SP7 (ATCC)، A_2: *A. Lipoferum* (از کود زیستی)، A_3: جدایه رقم هاشمی، A_4: جدایه خزر، A_5: جدایه طارم، A_6: جدایه گلستان، A_7: جدایه شیرازی و A_8: جدایه سفید محلی

سنجش پکتیناز (پلی گالاکتوروناز): به منظور شناسایی جدایه های تولید کننده پکتیناز، از محیط حاوی۱۰ گرم پکتین مرکبات (با ۶۷ درصد متیلاسیون)، 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 ۰/۰۰۱۴گرم، کلرید کبالت ۰/۰۰۲ گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر)، آگار ۲۰ گرم و آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر (pH برابر ۶) استفاده گردید (۲۸). مقدار مشخص از سویه‌ها به داخل محیط پکتین- آگار فرو برده شد (puncture) و کشتها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی‌گراد اینکوبه شدند. بعد از این که کلنیها به قطر ۳ میلی‌متر رسیدند، محلول یدید پتاسیم- یدین (یدین ۱ گرم، یدید پتاسیم ۵ گرم و آب مقطر۳۳۰ میلی‌لیتر) برای آشکار ساختن منطقه هیدرولیز شده اضافه گردید. برای سنجش فعالیت پکتیناز از محیط مذکور به صورت مایع (بدون آگار) استفاده شد و فعالیت پکتیناز با اندازه‌گیری گروههای احیاءکننده آزاد

Archive of SID

www.SID.ir

شده با استفاده از معرف DNS مورد سنجش قرار گرفت. مخلوط واکنش شامل ۰/۸ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پکتین مرکبات (با ۶۷ درصد متیلاسیون) در بافر فسفات- سیترات ۰/۲ مولار با pH برابر ۶ و ۰/۲ میلی‌لیتر مایع رویی کشت، در ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اینکوبه شدند. یک واحد فعالیت آنزیمی به صورت ۱ ماکرومول پلی گالاکتورونیک اسید آزاد شده در هر دقیقه تعریف می‌شود.

سنجش فیتاز: یک میلی‌لیتر از جدایه‌های باکتریایی (با جذب نوری ۰/۵) به فلاسکهای ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیطهای مایع NBRIP و فیتین تلقیح و فعالیت آنزیم به مدت ۶ الی ۷ روز اندازه‌گیری شد. سنجش فیتاز با اندازه‌گیری مقدار فسفات معدنی آزاد شده انجام می‌گیرد. مخلوط واکنش شامل ۰/۸ میلی‌لیتر بافر استات (۰/۲ مولار با pH برابر۵/۵) حاوی فیتات سدیم ۱ میلی مولار و همچنین ۰/۲ میلی‌لیتر از مایع رویی هر دو محیط است. بعد از اینکوبه شدن به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، واکنش با اضافه نمودن ۱ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف گردید. یک میلی‌لیتر از هر نمونه به منظور آزاد شدن فسفات معدنی مورد سنجش قرار گرفت (۲۶). یک واحد آنزیمی به صورت مقدار آنزیم آزاد کننده ۱ نانومول فسفات معدنی طی ۱ دقیقه تعریف می‌شود. اجزای محیط NBRIP بر حسب گرم در یک لیتر آب مقطر عبارتند از: گلوکز ۱۰، فسفات کلسیم ۵، کلرید منیزیم ۵، سولفات منیزیوم ۰/۲۵، کلرید پتاسیم ۰/۲، سولفات آمونیوم ۰/۱ (pH برابر ۷). محیط فیتین حاوی اجزایی مشابه محیط NBRIP است، با این تفاوت که به جای فسفات کلسیم همان مقدار فیتین وجود دارد.

ارزیابی رشد باکتریایی همزمان با سنجش فیتاز: رشد باکتریها از زمان تلقیح باکتریها به محیط NBRIP به مدت ۶ الی ۷ روز بررسی گردید. برای تعیین منحنی رشد باکتریها، کدورت محیط اندازه‌گیری شد. در محیط NBRIP، تری کلسیم فسفات به صورت پودر نامحلول وجود داشته و منجر به اشتباه هنگام قرائت جذب می‌شود. از این رو برای ۱ میلی‌لیتر محیط، ۱ میلی‌لیتر HCl یک نرمال در زمانهای مختلف به منظور حل کردن فسفر نامحلول در محیط اضافه می‌گردد. کدورت باقیمانده ناشی از رشد باکتریها در ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (۲۷).

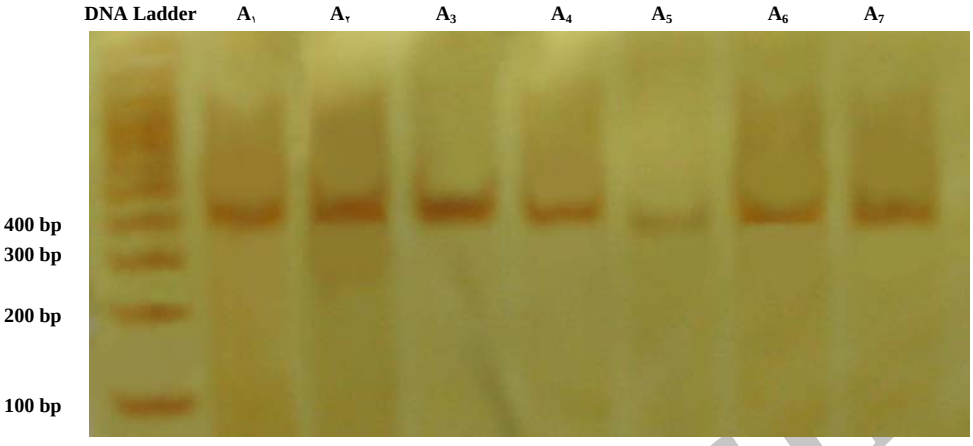
نتایج

جداسازی و شناسایی *Azospirillum* های اندوفیت: شش سویه *Azospirillum* مختلف از ریشه‌های برنج و گندم و یک سویه دیگر از نوعی کود زیستی جداسازی گردید. سویه‌ها با استفاده از آزمونهای بیوشیمیایی (جدول ۱) و تکثیر ژن 16S rDNA به وسیله PCR (شکل ۱) شناسایی شدند. همان طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است، تمام ۸ جدایه می‌توانند نیترات را احیاء نموده و دارای کاتالاز می‌باشند. همه جدایه‌ها تحت شرایط میکروآئروفیلیک وقتی که مالات، سیترات و L – رامنوز به عنوان تنها منبع کربن استفاده شدند، ازت را تثبیت نمودند. همه جدایه‌ها در منطقه نزدیک به سطح در محیط نیمه‌جامد NFb، پلیکل تشکیل دادند. در شناسایی مولکولی، باند ۴۰۰ جفت باز مشابه برای تمام جدایه مشاهده گردید. نتایج تأیید کرد که تمام باکتریهای جداسازی شده در این مطالعه بر طبق الگوی 16S rDNA، *Azospirillum* می‌باشند.

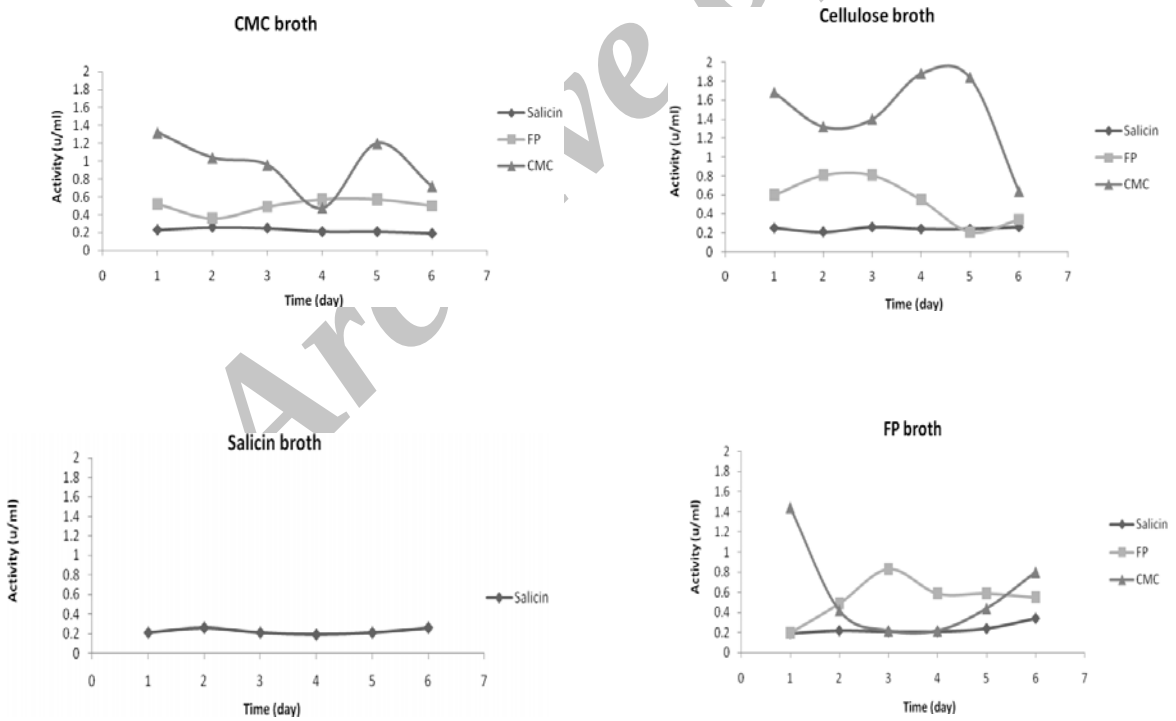
فعالیتهای آنزیمی: آنزیمهایی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند شامل CMCase، FPase، سلوبیاز، پکتیناز و فیتاز بودند. در ابتدا تمام سویه‌ها برای فعالیتهای سلولاز، پکتیناز و فیتاز به ترتیب روی محیطهای سلولز، CMC، سالیسین، پکتین، NBRIP و فیتین مورد آزمایش قرار گرفتند. در بین سویه‌های *Azospirillum* جدا شده از ریشه‌های برنج و گندم، یک جدایه از ریشه گندم (رقم گلستان) و یک جدایه از ریشه برنج (رقم طارم) به دلیل فعالیت بیشتر در محیطهای سلولز، CMC، سالیسین، پکتین، NBRIP و فیتین، به منظور مقایسه فعالیت آنزیمهای تجزیه‌کننده دیواره سلولی گزینش گردیدند. به طور جالب

Archive of SID
www.SID.ir

توجهی هیچ کدام از سویه‌ها دارای فعالیت پکتیناز نبودند، محیط CMC داشت.
اما جدایه برنج فعالیت CMCase و فیتاز بیشتری روی

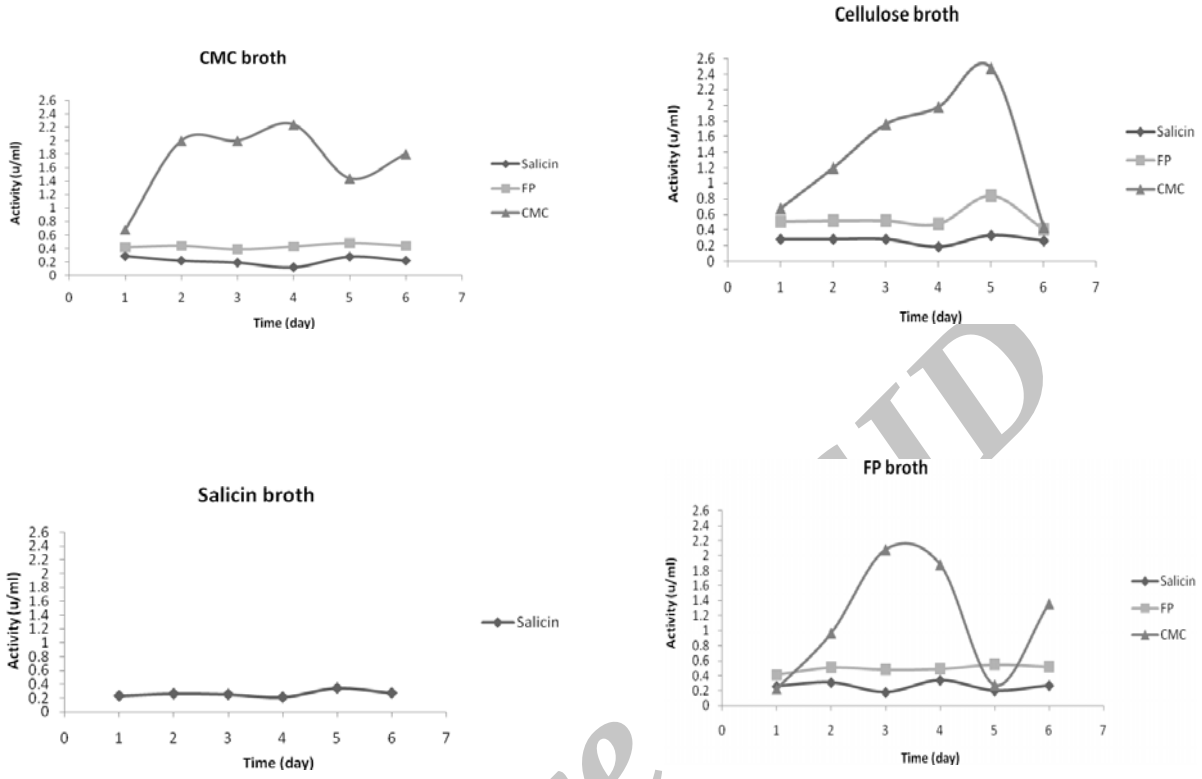


شکل ۱- الکتروفورز ژل پلی اکریل‌آمید قطعه تکثیرشده 16S rDNA از جدایه های *Azospirillum* مربرط به ارقام برنج و گندم. باند ۴۰۰ جفت باز، قطعه DNA تکثیر شده را نشان می‌دهد. از سویه *A. brasilense* Sp7 (ATCC) به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است (A1).

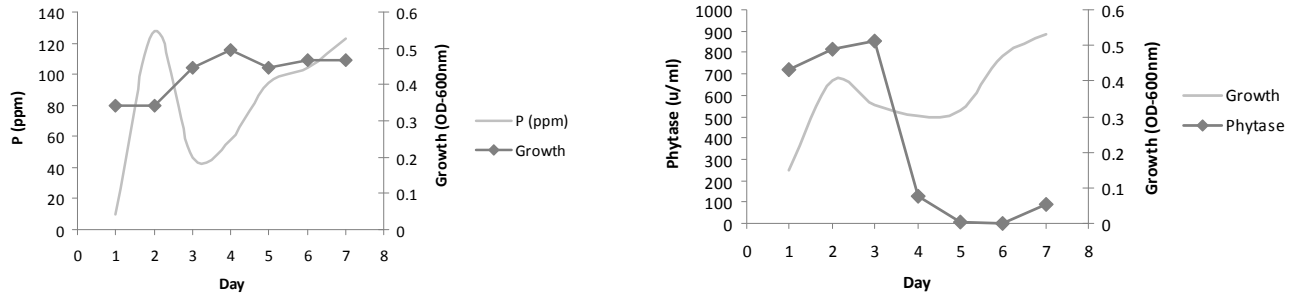


شکل ۲- فعالیت کمپلکس آنزیمی سلولاز در سویه *Azospirillum* جدا شده از گندم رقم گلستان. سه سوبسترا شامل CMC، FP و سالیسین به عصاره فیلتر شده محیطهای مختلف اضافه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ روز اینکوبه شدند.

www.SID.ir



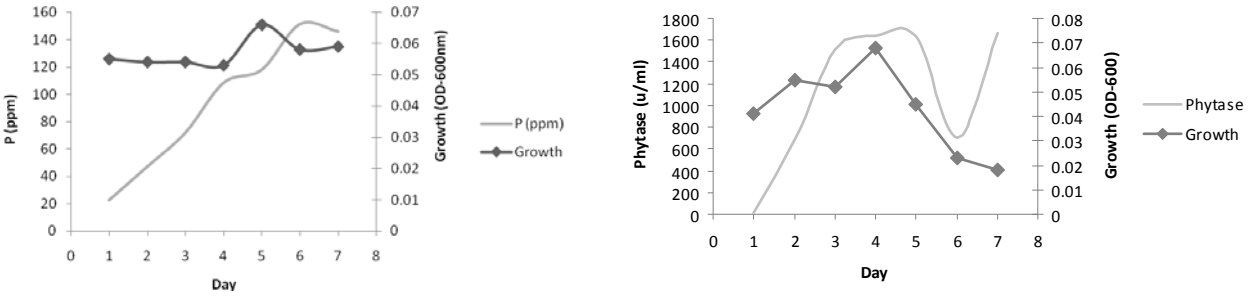
شکل ۳- فعالیت کمپلکس آنزیمی سلولاز در سویه *Azospirillum* جدا شده از برنج رقم طارم. سه سوبسترا شامل CMC، FP و سالیسین به عصاره فیلتر شده محیطهای مختلف اضافه و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ روز اینکوبه شدند.



A B

شکل ۴- فعالیت آنزیم فیتاز در سویه *Azospirillum* جدا شده از گندم رقم گلستان در حضور تری‌کلسیم فسفات (A) و فیتین (B) به عنوان تنها منبع فسفات.

www.SID.ir



A B

شکل ۵- فعالیت آنزیم فیتاز در سویه *Azospirillum* جدا شده از برنج رقم طارم در حضور تری‌کلسیم فسفات (A) و فیتین (B) به عنوان تنها منبع فسفات.

سویه *Azospirillum* جدا شده از رقم گلستان (گندم) که روی محیطهای CMC، سلولز و سالیسین- آگار رشد نمود، برای بررسی آنزیمهای تجزیه‌کننده دیواره سلولی مورد مطالعه قرار گرفت. همان طورکه در شکل ۲ نشان داده شد، حداکثر فعالیت CMCase طی ۵ روز رشد در محیط مایع CMC، ۱/۳۲ واحد بر میلی‌لیتر بود، اما وقتی در محیط مایع سلولز رشد نمود، فعالیت آن به ۱/۸۸ واحد بر میلی‌لیتر رسید. فعالیت سلوبیاز در تمام محیطها برای هر دو سویه جدا شده از ارقام طارم و گلستان پایین بود. فعالیت FPase در محیط مایع CMC کم بود. با این وجود تقریباً FPase فعالیت ۰/۸ واحد بر میلی‌لیتر را در محیطهای مایع سلولز و FP نشان داد. فعالیت سلولاز سویه *Azospirillum* جدا شده از طارم در شکل ۳ نشان داده شده است. در مقایسه با جدایه گلستان، جدایه طارم دارای ۳۱/۷۷ درصد فعالیت CMCase بیشتر در محیطهای مایع FP، CMC و سلولز بود، اما دارای فعالیت سلوبیاز و FPase بالایی در هیچ یک از محیطهای مذکور نبود.

فعالیت فیتاز در سویه جدا شده از گلستان در شکل ۴ نشان داده شده است. فعالیت فیتاز در جدایه گلستان طی سه روز ۸۸۴ واحد بر میلی‌لیتر بوده و بعد از ۵ روز از زمان تلقیح به صفر رسید، اما مقدار تری‌کلسیم فسفات نامحلول آزاد شده طی ۷ روز اینکوباسیون ppm ۱۲۷/۶۴ بود. جدایه طارم دارای ۳۱/۷۷ درصد فعالیت فیتازی بیشتر (۱۶۶۷/۶ واحد بر میلی‌لیتر) بود (شکل ۵).

بحث

دیواره سلولی گیاهان اساساً شامل سلولز بوده که در یک بستر پلی‌ساکاریدی بی‌شکل از همی‌سلولزها، پکتین و برخی گلیکول‌ها و همچنین پروتئینها فرورفته است (۲۱). مدتها است که ثابت شده است گیاه برنج *(Oryza sativa)* یک گیاه تجمع‌کننده سیلیکات بوده و به طور فعال مونوسیلیسیک اسید را از طریق ریشه جذب نموده و بصورت دی‌اکسید سیلیکون به شکل هیدراته ذخیره می‌نماید و در ساقه، برگ و پوسته بذر پلی‌مریزه می‌کند (۱۲). همچنین اینوزیتول‌های اکسید شده به عنوان اجزای غیرسلولزی دیواره سلولی به کار گرفته می‌شوند. از آنجایی که پکتین جز اصلی دیواره سلولی اولیه و تیغه میانی بوده و فعالیت کم سلولیتیکی و پکتینولیتیکی در کشتهای *Azospirillum* مشاهده شده است، لذا باکتریها ممکن است از طریق تجزیه آنزیمی تیغه میانی دیواره سلولی، وارد

Archive of SID
www.SID.ir

فضای بین سلولی قشر ریشه شوند (۲۴، ۳۰ و ۳۱). در سال ۱۹۹۹، Bekri و همکاران (۳) نشان دادند که به جز *Azospirillum irakens*، هیچ کدام از گونه‌های *Azospirillum* نمی‌توانند روی پکتین به عنوان تنها منبع کربن رشد کنند، اما در سال۲۰۰۱، Elbeltagi و همکاران (۶) نشان دادند که *Azospirillum lipoferum* جدا شده از برنج دارای فعالیت پکتیناز می‌باشد. هیچ مدرک بدیهی از تولید سلولاز توسط *Azospirillum* وجود ندارد و همچنین گزارشات متناقضی در ارتباط با فعالیت پکتینازی *Azospirillum brasilense* وجود دارد. بسیاری از باکتریها و قارچها آنزیم فیتاز تولید می نمایند، ولی گزارشی مبنی بر تولید این آنزیم توسط آزوسپیریلوم وجود ندارد. اگر چه این احتمال وجود دارد که *Azospirillum* مجموعه آنزیمی کامل مورد نیاز برای آلودگی را تولید نمی‌کند، اما گیاهان را برای تولید این آنزیمها احتمالاً از طریق اثرات هورمونی تحریک می‌کند. در سال ۱۹۸۶، Gafny و همکاران (۹) گزارش کردند که اتصال *Azospirillum brasilense* به ترتیب به ریشه‌های ارزن و ذرت توسط مواد شبه لکتینی که در اگزودای ریشه آنها وجود دارد، تحریک می‌شود. پیشنهاد شده است که لکتین ریشه در اتصال *Azospirillum brasilense* و *Azospirillum lipoferum* به آگلوتینین جوانه گندم نقش دارد. در سال ۲۰۰۷، Mostajeran و همکاران (۱۹) نشان دادند که دیواره سلول گیاهی در برهمکنش بین *Azospirillum* و گیاه مهم است. آنها همچنین نقش آنزیمهای تجزیه کننده پلی‌ساکارید را در فرآیند آلودگی ریشه توسط *Azospirillum* محتمل دانستند.

در این مطالعه هیچ یک از سویه‌ها دارای فعالیت پکتینازی نبودند و همچنین برای اولین بار نشان داده شد که آزوسپیریلوم‌ها دارای فعالیت فیتازی هستند. در بین جدایه‌های *Azospirillum* از ریشه‌های برنج و گندم، سویه‌های جدا شده از گندم (رقم گلستان) و برنج (رقم طارم) به دلیل فعالیت بیشتر در محیطهای سلولز، CMC، سالیسین، پکتین، NBRIP و فیتین، به منظور مقایسه فعالیت آنزیمهای تجزیه کننده دیواره سلولی گزینش گردیدند. سویه *Azospirillum* جدا شده از برنج به طور معنی‌داری دارای فعالیت CMCase و فیتاز بیشتری نسبت به سویه گندم (به ترتیب ۳۱/۷۷ و ۴۶/۹۹ درصد بیشتر) بود، اما فعالیت FPase در هر دو سویه تقریباً مشابه بود. علت کلونیزاسیون جدایه طارم با فعالیت بیشتر سلولازی و فیتازی ممکن است، محتوای فیتین بیشتر و دیواره سلولی سلولزی‌تر این رقم در مقایسه با رقم گلستان باشد. از این رو این سویه که دارای برخی از آنزیمهای تجزیه کننده دیواره سلولی می‌باشد می‌تواند کلونیزاسیون خود را روی دیواره سلول میزبان تسهیل نموده و سبب تثبیت کارآی ازت شود. همچنین فیتاز تولید شده توسط هر دو جدایه می‌تواند هم میزان فسفر محلول را افزایش داده و هم در مرحله ورود مؤثر باشد.

منابع

1. Assmus B, Hutzler P, Kirchhof G, Amann R, Lawrence JR, Hartmann A (1995) In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol*. 61: 1013-1019.
2. Bashan YO, Holguin GI (1997) *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol*. 43: 103-121.
3. Bekri MA, Desair J, Keijers V, Proost P, Searle-Van Leeuwen M, Vanderleyden J (1999) *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J. Bacteriol*. 181: 2440-2447.
4. Dalal RC (1978) Organic phosphorus. *Adv. Agro*. 29: 83–117.
5. Doebereiner J, Baldani V, Reis VM (1995) Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: Fendrik I, Del Gallo M, Vanderleyden J, De Zamaroczy M (Eds.), *Azospirillum VI and Related Microorganisms*. Springer, Berlin, pp. 3-14.

Archive of SID
www.SID.ir

6. Elbeltagy A, Nishioka K, Sato T, Suzuki Ye B, Hamada T, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K (2001) Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5285-5293.

7. Eltrop L (1993) Role of ectomycorrhiza in the mineral nutrition of Norway spruce (*Picea abies* L.). Ph.D.Thesis, University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

8. Faure D, Desair J, Keijers V, Bekri MA, Proost P, Henrissat (1999) Growth of *Azospirillum irakense* KBC1 on the aryl L-glucoside salicin requires either salA or salB. *J. Bacteriol*. 181: 3003-3009.

9. Gafny R, Okon Y, Kapulnik Y, Fischer M (1986) Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem*. 18: 69-75.

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

11. Gunarto L, Adachi K, Senboku T (1999) Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. *Biol. Fertil. Soils*. 28 :129–135.

12. Inglesby MK, Wood DF, Gray GM (2003) The cell wall components of *Oryza sativa*. *Bioproduct Chem. Engin. Res.* Alexandra, Louisiana, Abstract.

13. Ishitani M, Majumder AL, Bornhouser A, Michalowski CB, Jensen RG, Bohnert HJ (1996) Coordinate transcriptional induction of *myo*-inositol metabolism during environmental stress. *Plant J*. 9: 537–548

14. James EK (2000) Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Res*. 65: 197-209.

15. James EK, Olivares FL (1998) Infection and colonization of sugar cane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Crit. Rev. Plant Sci*. 17: 77-119.

16. Loewus FA, Loewus MW (1983). *Myo*-inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 34**:** 137–161

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

18. Mega JA (1982) Phytate: its chemistry, occurrence, food interactions, nutritional significance and methods of analysis. *J. Agri. Food Chem*. 30: 1–9.

19. Mostajeran A, Amooaghaie R, Emtiazi G (2007) The participation of the cell wall hydrolytic enzymes in the initial colonization of *Azospirillum brasilense* on wheat roots. *Plant Soil*. 291: 239–248.

20. Myers ML, Hubbell DH (1987) Plant cell wall carbohydrates as substrates for *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol*. 53: 2745–2748.

21. Okon Y (1994) *Azospirillum*/plant associations, pp. 175. CRC Press, Boca Raton, FL.

22. Okon Y, Vanderleyden J (1997) Root-associated *Azospirillum* species can stimulate plants. *ASM News*. 63: 366-370.

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

24. Patriquin DG, Doebereiner J, Jain DK (1983) Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol*. 29: 900-915.

25. Quan C, Zhang L, Wang Y, Ohta Y (2001) Production of phytase in a low phosphate medium by a novel yeast *candida krusei*. *J. Biosci. Bioeni.* 2: 154-160.

26. Rodrigues H, Gonzalez T, Selman G (2000) Expression of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola* in two rhizobacterial strains. *J. Biotec*. 84: 155-161.

27. Soares M, Da Silva R, Gomes E (1999) Screening of bacterial strains form pectinolytic activity: characterization of the polygalacturonase produced by *Bacillus* sp. *Rev. Microbiol*. 30: 299-303.

28. Steenhoudt O, Vanderleyden J (2000) *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev*. 24: 487-506.

29. Tien TM, Diem HG, Gaskins MH, Hubbell DH (1981) Polygalacturonic acid transeliminase production by *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol*. 27: 426-431.

30. Umali-Garcia M, Hubbell DH, Gaskins MH, Dazzo FB (1980) Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol*. 39: 219-226.

Archive of SID

www.SID.ir

31. Walker KA (1974) Change in phytic acid, phytase during early development of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*. 116: 91–98.

32. Yadav BK, Tarafdar JC (2002) Phytase activity in the rhizosphere of crops, trees and grasses under arid environment. *J. Arid Environ*. 58: 285–293

33. Yoshida KT, Wada T, Koyama H, Mizobuchi-Fukuoka R, Naito S (1999) Temporal and spatial patterns of accumulation of the transcript of myo-inositol-1-phosphate synthase and phytin-containing particles during seed development in rice. *Plant Physiol*. 119: 65–72.

A comparison of phytase and cellulase activity in wheat and rice endophytic Azospirilla

Mehdipour-Moghaddam M. J.[1], Emtiazi G.[1] and Salehi Z.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of IRAN

[2] Biology Dept., Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, I.R. of IRAN

Abstract

Six nitrogen-fixing bacteria which were isolated from root of cultivated rice and wheat and also one strain from a kind of biofertilizer, identified as *Azospirillum* with PCR amplification of 16S rDNA gene. Among the *Azospirillum* isolates from rice and wheat roots, one isolate from wheat (Golestan cultivar) and another from rice (Tarom cultivar) were selected for comparison of their cell wall degrading enzymes activities, because of more enzyme activity in cellulose, CMC (Carboxymethylcellulose), salicin, pectin, NBRIP and phytin media. *Azospirillum* strain was isolated from rice had CMCase and phytase activities significantly more than one isolated from wheat, 31.77% and 46.99% respectively, but the FPase activity of both strains were nearly similar. The reason for Tarom colonization by the strain with higher activity of cellulase and phytase may be related to more celluletic cell wall and phytin content of this cultivar in comparison with Golestan.

Keywords: Nitrogen fixation, CMCase, *Azospirillum*, Pectinase, Phytase

Archive of SID

www.SID.ir