

جداسازی و شناسایی باکتری‌های آزوسپیریلوم از ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت و تعیین برخی خصوصیات محرک رشدی آنها

محمود شهابی، ناصر پنجه‌که¹، هادی اسدی رحمانی و محمد سالاری

دانشجوی دکتری رشته‌ی بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل؛ mahmoodshahabi@gmail.com

دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل؛ naserpanjekeh@gmail.com

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور؛ asadi_1999@yahoo.com

دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل؛ Salari21m@yahoo.com

دریافت: 97/9/18 و پذیرش: 98/7/3

چکیده

باکتری *Azospirillum* یکی از مهمترین ریزوباکتریایی محرک رشد گیاهان (PGPR) است. آنها در ریزوسفر بسیاری از گیاهان زراعی وجود دارند. در این تحقیق از مزارع گندم و ذرت استان اصفهان نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌های خاک و ریشه در محیط کشت NFB (Nitrogen-Free Bromothymol blue) کشت گردید. پس از رشد جدایه‌ها، نمونه‌های دارای هاله‌ی شفاف به محیط کشت‌های اختصاصی و نیمه اختصاصی نظیر NFB و RC (Rojo Congo=Red) جامد منتقل و جدایه‌ها براساس مرفولوژی کلنی‌ها بر روی آنها انتخاب و خالص‌سازی گردید. پس از انجام آزمون‌های گرم، کاتالاز، اکسیداز و هوازی-بی‌هوازی، تأیید و تشخیص جدایه‌های *Azospirillum* توسط آزمایش‌های مولکولی با استفاده از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با آغازگرهای اختصاصی Az16S-A و Azo494-F/Azo756-R و توالی‌یابی ژن *16S rRNA* انجام شد. خصوصیات محرک رشد گیاهان (PGP) در جدایه‌های باکتری *Azospirillum* با بررسی حضور ژن‌های *NifD* و *NifH* از آنزیم نیتروژناز توسط آغازگرهای PoIF/PoIR و FdB260/FdB261 و خصوصیات محلول‌سازی فسفات، تولید کیتیناز، تولید HCN، تولید سیدروفور و تولید ایندول استیک اسید بوسیله‌ی آزمون‌های اختصاصی تعیین گردید. تکثیر قطعات 646، 263، 360 و 390 جفت بازی توسط آغازگرهای Az16S-A، Azo494-F/Azo756-R، PoIF/PoIR و FdB260/FdB261 به ترتیب وجود باکتری‌های آزوسپیریلوم و حضور ژن‌های *NifD* و *NifH* در آنها را تأیید نمود. آزمون‌های اختصاصی همچنین توانایی تولید ایندول استیک اسید با میانگین 15 میلی‌گرم در لیتر، انحلال فسفات نامحلول با میانگین 18/8 میلی‌گرم در لیتر و تولید سیدروفور را در بین جدایه‌ها آشکار نمود و نشان داد که بعضی از جدایه‌ها دارای خصوصیات PGP متعدد بوده و برخی دیگر دارای یک خصوصیت یا فاقد آنها می‌باشند. در نهایت توالی‌یابی ژن *16S rRNA* تعدادی از جدایه‌ها، وجود حداقل سه گونه‌ی *Azospirillum brasilense*، *A. lipoferum* و *A. zea* را در ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت مشخص نمود. این مطالعه برای استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان مایه‌ی تلقیح در کشاورزی پایدار و ارگانیک می‌تواند مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آزوسپیریلوم، سیدروفور، کیتیناز، ژن *16S rRNA*

¹ نویسنده مسئول، آدرس: زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

مقدمه

افزایش جمعیت فشار زیادی بر روی زمین‌های کشاورزی جهت برداشت محصول بیشتر اعمال می‌کند که به نوبه‌ی خود باعث افزایش مصرف کودهای شیمیایی می‌گردد. این عوامل شیمیایی گران بوده و باعث بروز مشکلات محیطی می‌شوند، به همین دلیل اخیراً علاقه به مطالعه در زمینه‌ی کشاورزی پایدار و دوستدار محیط زیست افزایش یافته است (کارلیداگ و همکاران، 2007).

ریزجانداران نقش حیاتی در کشاورزی دارند به طوری که تبادل مواد غذایی گیاه را بهبود بخشیده و استفاده از کودهای شیمیایی را کاهش می‌دهند. تعاملات میکروپ گیاه سودمند در ریزوسفر می‌تواند حاصلخیزی خاک را تحت تأثیر قرار دهد (داستاگر و همکاران، 2011). کاربرد چنین میکروپ‌هایی به عنوان کود زیستی ممکن است به کاهش استفاده از کودهای اضافی که می‌تواند باعث تغییر در فیزیولوژی خاک شود کمک کند (سریل، 2012).

واژه‌ی PGPR، ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، اولین بار توسط جوزف کلو اپر در اواخر سال 1970 استفاده شده و در نوشته‌های علمی به کار برده شد (وسی، 2003). این باکتری‌ها سبب افزایش رشد گیاه و کاهش حساسیت به بیماری‌های ایجاد شده توسط پاتوژن‌های گیاهی می‌گردند (کلو اپر و همکاران، 2004). باکتری‌های PGPR در محیط کشت‌های مختلف جهت افزایش رشد، جوانه‌زنی بذرها و افزایش محصولات کشاورزی به کار رفته و تعدادی از آن‌ها به صورت تجاری درآمده‌اند (دی و همکاران، 2004؛ هومن و همکاران، 2008؛ مینورسکی، 2008). تحریک رشد گیاهان توسط تعدادی از سویه‌های متعلق به چندین جنس مانند *Azospirillum*، *Pseudomonas*، *Burkholderia*، *Bacillus*، *Azotobacter* و *Acetobacter* گزارش شده است (احمد و همکاران، 2008). در ریزوسفر تنها یک تا دو درصد از باکتری‌ها رشد گیاه را افزایش می‌دهند (بهات و ویاس، 2014). باکتری‌های محرک رشد گیاه منبع بالقوه طبیعی بوده که ریشه‌های گیاه را کلنیزه و رشد محصول و گیاه را به صورت مستقیم و غیر مستقیم تحریک می‌کنند (افضل و بانو، 2008). افزایش غیر مستقیم رشد گیاه به واسطه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها و سیدروفورهای تولید شده توسط باکتری‌های PGPR می‌باشد که تأثیرات زیان‌آور ریزجانداران پاتوژن گیاهی را کاهش یا حذف می‌نمایند (بهات و ویاس، 2014). در صورتی که افزایش مستقیم رشد توسط باکتری‌های PGPR شامل تولید متابولیت‌هایی مانند فیتوهورمون‌ها و تثبیت ازت (ساهاران و نهرا، 2011)،

اکسین‌ها (علی و همکاران، 2010)، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها و همچنین از طریق محلول‌سازی مواد معدنی (ال-حداد و همکاران، 2010) می‌باشد. پاسخ فوری به تلقیح با این باکتری‌ها در ریزوسفر درمیان باکتری‌ها، گونه‌های گیاهی، نوع خاک، تراکم و غلظت مایه‌ی تلقیح و شرایط محیطی متفاوت است (محبوبا و همکاران، 2013).

جنس *Azospirillum* یکی از باکتری‌های PGPR مهم می‌باشد. اعضاء این جنس گرم منفی، هوازی، میله‌ای شکل و متعلق به زیررده‌ی آلفا پروتئوباکتیریا می‌باشند. گونه‌های مختلف *Azospirillum* بیشتر از خاک‌های ریزوسفری و ریشه‌های گیاهان مختلف گرداگرد جهان جدا شده‌اند (شیم و همکاران، 2011). تعدادی از استرین‌های این جنس به عنوان PGPR گزارش شده‌اند که می‌توانند رشد و میزان محصول را افزایش دهند (محبوبا و همکاران، 2013).

از ویژگی‌های مفید این باکتری می‌توان به تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه و در نتیجه بهبود جذب آب و عناصر غذایی (ساهاران و نهرا، 2011)، افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول، تولید سیدروفور (پریگ و همکاران، 2007)، تولید ویتامین (سایکیا و همکاران، 2010)، کنترل عوامل بیماری‌زا (باشان و دی-باشان، 2010)، رابطه سینرژیستی با سایر باکتری‌های مفید خاکزی، تولید نیتريت (باشان و همکاران، 2004)، تولید محصولات صنعتی، زیست‌پالایی فاضلاب‌ها و تجزیه‌ی بقایای سمی (دی-باشان و همکاران، 2004) اشاره نمود.

جداسازی این باکتری از گیاهان به روش‌های آزمایشگاهی بستگی داشته و نیازمند استفاده از محیط کشت‌های انتخابی و آزمون‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی می‌باشد (محبوبا و همکاران، 2013). توالی-یابی جدید و تکنولوژی انگشت نگاری DNA، کشف و شناسایی میکروپ‌های مورد نظر در فرآیند جداسازی در محیط کشت‌های انتخابی را تسهیل کرده و از این رو این آزمون‌ها کاهش می‌یابد (استد و همکاران، 2000). استفاده از روش‌های مولکولی براساس PCR جهت کشف، شناسایی و کمی‌سازی ریزجانداران می‌تواند توسط یک محیط کشت اختصاصی و روش‌های بیوشیمیایی تکمیل گردد (محبوبا و همکاران، 2013). جهت بررسی حضور جمعیت‌های تثبیت کننده‌ی نیتروژن در محیط نیز تجزیه و تحلیل ژن‌های کدکننده‌ی آنزیم نیتروژناز مانند *nifH* و *nifD* انجام می‌گیرد. به علت اختلافات فیلوژنی زیاد در میان تثبیت کنندگان ازت، توالی این ژن‌ها به صورت قابل ملاحظه‌ای از هم دور شده و انشعاب یافته‌اند (زهر و

شناسایی باکتری‌های *Azospirillum* توسط آغازگرهای اختصاصی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) جهت تعیین جدایه‌های جنس *Azospirillum* استفاده شد. بدین منظور ابتدا DNA الگو از جدایه‌های باکتریایی مطابق با روش دشتی و همکاران (2009) استخراج گردید و به میکروتیوپ‌های 1/5 میلی-لیتری حاوی 400 میکرولیتر آب مقطر سترون، چند لوپ از کشت تازه‌ی هر جدایه اضافه و به مدت 10 دقیقه جوشانده شد و بلافاصله به مدت پنج دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس به مدت سه دقیقه در دور 1100g سانتریفیوژ و فاز رویی به‌عنوان DNA الگو استفاده شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (Az16S-A 5'-GCG GTA ATA CGA AGG 3' و A2324f، A25r، 5'-CTT GTC ACC GGC AGT 3' و GGG CK-3' (TCC ACC AG-3' و Azo494-F/Azo756-R) و (Azo494-F، 5'-GGC CYG WTY AGT CAG RAG 3' و TG-3' Azo756-R، 5'-AAG TGC ATG CAC CCC 3' RRC GTC TAG C-3') طراحی شده براساس توالی‌های ژن 16S rRNA همراه 2 μL از DNA الگو در حجم 25 میکرولیتری، مطابق با روش‌های لین و همکاران (2011) و شیم-هاتوری و همکاران (2011) انجام گرفت. به منظور بررسی قطعات تکثیر شده، ژل آگارز 1/2 درصد تهیه و محصولات PCR به همراه مارکر 100 bp (تهیه شده از شرکت سیناکلون) در چاهک‌های آن بارگذاری و به مدت 90 دقیقه با ولتاژ 100 ولت الکتروفورز شد. پس از آن با استفاده از رنگ اسید نوکلئیک SimplySafe (شرکت EURx) رنگ‌آمیزی صورت گرفت (به میزان پنج میکرولیتر در 100ml محلول آگارز) و با استفاده از دستگاه ژل داک (Uvitec Transilluminator) از آن عکسبرداری شد. سپس وزن مولکولی قطعات تکثیرشده به صورت چشمی با استفاده از مارکر 100 bp (تهیه شده از شرکت سیناکلون) اندازه-گیری و با قطعات تکثیرشده‌ی جدایه‌های شاهد مثبت استاندارد مقایسه گردید.

بررسی برخی از خصوصیات محرک رشد گیاهان (PGP) در جدایه‌های *Azospirillum*

بررسی حضور ژن‌های *nif* مؤثر در فرآیند تثبیت نیتروژن، در جدایه‌های باکتری *Azospirillum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

جهت بررسی تثبیت نیتروژن و حضور آنزیم نیتروژناز در جدایه‌ها و گونه‌های باکتری *Azospirillum* واکنش PCR براساس روش‌های پلی و همکاران (2001) و

همکاران، (1989)، و حتی توالی DNA کدکننده‌ی نواحی حفاظت شده پروتئین نیز ممکن است به علت وجود چندین کدون برای اغلب اسیدآمینه‌ها تغییر کند. طراحی آغازگرهای عمومی *nifH* و *nifD* یک درجه‌ی زیادی از چند شکلی (بودن) توالی DNA (DNA sequence degeneracy) را نیاز دارد و ممکن است منجر به کاهش اختصاصیت آغازگرها در طول تکثیر PCR گردد. هرچند استفاده از پروتکل‌های تکثیری پیشرفته‌تر می‌تواند مطالعه‌ی پیچیدگی ریزجانداران تثبیت کننده ازت در یک اکوسیستم معین را نسبتاً آسان نماید (محبوباً و همکاران، 2013).

با توجه به اهمیت باکتری‌های جنس *Azospirillum* در کشاورزی پایدار تحقیق حاضر با هدف جداسازی، شناسایی مولکولی، بررسی حضور آنزیم نیتروژناز و ارزیابی خصوصیات محرک رشدی جدایه‌های مختلف این جنس در ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی مقدماتی جدایه‌های *Azospirillum* 115 نمونه‌ی ریزوسفیری از خاک و ریشه‌ی گیاهان گندم و ذرت به عمق 30-5 سانتی‌متری به صورت تصادفی از مزارع 20 شهر استان اصفهان برداشته شد و در دمای 4 °C تا زمان جداسازی نگهداری گردید. جداسازی از خاک و ریشه‌ی گیاهان به ترتیب به روش‌های کانیموژی و پانیرسلوم (2010) و اکبری و همکاران (2007) انجام گرفت. پس از رشد باکتری در لوله‌های آزمایش محتوی محیط کشت نیمه جامد NFB، لوله‌هایی که در عمق یک تا پنج میلی‌متری از سطح محیط کشت دارای یک پرده یا هاله‌ی شفاف بودند، برای ادامه‌ی آزمایش انتخاب و در محیط کشت‌های NFB جامد و RC (Rojo Congo=Red Congo) به صورت خطی کشت و پس از تشکیل کلنی‌های تیب باکتری آروسپیریوم (کلنی-های سفید و کوچک در زمینه‌ای آبی رنگ، حاصل از تغییر pH در ناحیه‌ی رشد کرده‌ی کلنی، در محیط NFB جامد و کلنی‌های قرمز با حاشیه نامنظم و قوام خشک و چروکیده در محیط RC) بر روی این محیط کشت‌ها، خالص‌سازی شدند. جهت شناسایی مقدماتی جدایه‌ها نیز منظور آزمون‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز و رشد هوازی-بی هوازی با استفاده از روش شاد و همکاران (2001) انجام گرفت.

گردید و هفت روز پس از قرار گرفتن در دمای 28°C جدایه‌هایی که ناحیه‌ی شفاف در اطراف کلنی‌ها ایجاد کردند به عنوان مثبت در نظر گرفته شد. سپس غربالگری جدایه‌های *Azospirillum* براساس شاخص انحلال فسفات انجام گرفت. این شاخص از نسبت مجموع قطر کلنی و هاله به قطر کلنی برطبق روش احمد و همکاران (2014) محاسبه گردید. به دنبال آن تخمین کمی انحلال فسفر طبق روش استاندارد (مهتا و نوتیال، 2001) با تلقیح یک میلی لیتر از محلول باکتریایی با غلظت CFU ml^{-1} $10^{7.1}$ در 50 میلی لیتر از محیط سترون NBRIP broth (National Botanical Research Institute Phosphate) [حاوی کلرید منیزیم 5 گرم، سولفات منیزیم هفت آبه 0/25 گرم، کلرید پتاسیم 0/2 گرم، سولفات آمونیوم 0/2 گرم، تری کلسیم فسفات 5 گرم و گلوکز 10 گرم در لیتر] موجود در ارلن‌های 100 میلی لیتری و قرارگیری آن‌ها در دمای 28°C با دوران 100 دور در دقیقه در سه تکرار به صورت مجزا انجام گرفت. بعد از سه روز سوسپانسیون سلولی باکتری‌ها در 10000 دور در دقیقه بمدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شده و محتوای فسفر مایع رویی به صورت اسپکتروفوتومتری با روش اسکورییک اسید در طول موج 882 nm محاسبه و با منحنی KH_2PO_4 استاندارد کالیبره گردید (مورفی و رایلی، 1962).

تولید سیدروفور

توانایی تولید سیدروفور توسط محیط کروم آزرل اس آگار (CAS) تعیین گردید. به صورت مختصر 10 میکرولیتر از جدایه‌های باکتری *Azospirillum* با غلظت 10^7CFU ml^{-1} با سه تکرار در مرکز ظروف پتری محتوی محیط CAS قرار داده شده و سپس به مدت هفت روز در دمای $25-26^{\circ}\text{C}$ قرار گرفت. تولید سیدروفور براساس تغییر در رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی تعیین شده و قطر کلنی و هاله اندازه‌گیری گردید (نایک و همکاران، 2008).

تولید HCN

جهت تعیین کیفی تولید سیانید هیدروژن مطابق با روش بهات و ویاس (2014)، جدایه‌های باکتری *Azospirillum* بر روی محیط کشت NA حاوی 4/4 گرم گلیسین (glycine) در سه تکرار کشت داده شد و تولید سیانید 96-48 ساعت پس از تلقیح با استفاده از یک کاغذ صافی اشباع شده با اسید پیکریک/کربنات سدیم قرار گرفته در سرپوش ظرف پتری مشخص گردید. درب ظروف پتری قبل از قرارگیری در دمای 28°C به صورت کامل توسط پارافیلیم بسته و تغییر رنگ از زرد به نارنجی، قرمز، قهوه‌ای و یا مایل به قرمز قهوه‌ای به عنوان شاخصی

استلنزفوس و همکاران (1997) با آغازگرهای اختصاصی (PoIF/PoIR, TGC GAY CCS AAR GCB GAC) PoIF/PoIR و (PoIR, ATS GCC ATC ATY TCR CCG GA و TC FdB260, TCR TTI GCI ATR) FdB260/FdB261 FdB261, TGG GGI CCI RTI AAR و TGR TGN CC GAY ATG) به ترتیب برای ژن‌های *NifD* و *NifH* همراه $2 \mu\text{L}$ از DNA الگو در حجم 25 میکرولیتری انجام شد.

به منظور بررسی قطعات تکثیر شده نیز الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز 1/2 درصد انجام و پس از رنگ آمیزی توسط دستگاه ژل داگ (Uvitec Transilluminator) از آن عکسبرداری گردید. وزن مولکولی قطعات تکثیرشده به صورت چشمی با استفاده از مارکر تعیین و با قطعات تکثیرشده‌ی جدایه‌های شاهد مثبت استاندارد مقایسه شد.

تولید ایندول استیک اسید (IAA)

تحلیل کمی ایندول استیک اسید با استفاده از روش احمد و همکاران (2008) در غلظت صفر تربیتوفان انجام شد. جدایه‌های باکتری به صورت جداگانه در سه تکرار درون ارلن‌های حاوی 25 ml محیط (Tryptic Soy Broth) کشت گردید و در دمای 30°C بر روی گرداننده دوار با سرعت 90 rpm به مدت 48 ساعت قرار گرفت. پس از رشد جدایه‌ها، محیط کشت‌ها به مدت 25 دقیقه در 5000 rpm سانتریفیوژ شد. دو میلی لیتر از مایع رویی بدست آمده با چهار میلی لیتر از معرف Salkowski (25 میلی لیتر آب مقطر، 150 میلی لیتر اسیدسولفوریک 98 درصد و 7/5 میلی لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0/5 مولار) مخلوط شده و به مدت 25 دقیقه در دمای اتاق در جای تاریک قرار گرفت. پیدایش رنگ صورتی تولید ایندول استیک اسید را نشان داد. سپس مقدار چگالی نوری (Optical Density) محلول در طول موج 530 نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت غلظت‌های IAA (0، 5، 10، 15، 20 و 25 میلی گرم در لیتر) تهیه و با معرف Salkowski مانند بالا مخلوط شد. شدت رنگ صورتی ایجاد شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و پس از رسم نمودار استاندارد با غلظت‌های IAA تولید شده توسط جدایه‌های باکتریایی مقایسه گردید (اکبری و همکاران، 2007).

محلول‌سازی فسفات‌های نامحلول

جهت تعیین کیفی فعالیت انحلال فسفات مطابق با روش نایک و همکاران (2008)، 10 میکرولیتر از جدایه‌های باکتری *Azospirillum* با غلظت CFU ml^{-1} $10^{7.1}$ بر روی محیط کشت Pikovskaya's agar کشت

از توانایی ضعیف، متوسط و یا به شدت سیانوژنیک در نظر شد.

تولید کیتیناز

آماده سازی کیتین کلئیدی مطابق با روش مهانی و همکاران (2012) با اندکی تغییر انجام گرفت. آزمون تولید کیتیناز در محیط کشت NA محتوی کیتین کلئیدی براساس روش بهات و ویاس (2014) انجام گردید. جدایه‌های باکتریایی با غلظت 10^7 CFU ml⁻¹ بر روی محیط‌های کشت جامد حاوی آگار به صورت نقطه‌ای در سه تکرار کشت شده و به مدت هفت روز در دمای C 30° قرار داده شدند. توانایی تولید کیتیناز جدایه‌های باکتریایی، به‌وسیله ایجاد یک هاله‌ی شفاف در اطراف کلنی‌های باکتریایی تعیین گردید.

فعالیت ضد قارچی

جهت سنجش فعالیت ضدقارچی از قارچ *Fusarium graminearum* استفاده شد که عامل بیماری بلایت سنبله (Head Blight) بوده و در مواردی نیز باعث پوسیدگی ریشه و طوقه و بلایت گیاهیچه می‌گردد. براساس روش مهانی و ال-کنانی (2012) پس از کشت مجدد این قارچ در محیط کشت PDA، با چوب پنبه سوراخ کن یک دیسک از قارچ به قطر 0/9 cm به مرکز یک محیط کشت جدید اضافه گردید و 10^7 CFU ml⁻¹ با سه تکرار در چهار طرف دیسک قارچی به‌فاصله‌ی 2/5 cm به‌صورت نقطه‌ای کشت شد. پس از هوا خشک شدن محلول جدایه‌های باکتریایی در زیر هود آزمایشگاهی، تشتک‌های پتری به مدت 10-15 روز در دمای C 28° قبل از اندازه‌گیری ناحیه‌ی بازدارنده‌ی رشد هیفی نگهداری گردید. فعالیت ضد قارچی با تشکیل یک ناحیه‌ی بازدارنده از رشد میسلیم قارچی براساس نشئت در آگار متابولیت‌های باکتریایی خارج سلولی مشاهده گردید.

تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA

جهت شناسایی مولکولی گونه‌های *Azospirillum* جدایه‌های 1، 2، 21، 24، 29، 33 و 40 براساس خصوصیات محرک رشدی آن‌ها انتخاب شد. ماده‌ی ژنتیکی جدایه‌ها توسط کیت استخراج DNA سیناپیور (سیناکلون-ایران) بر طبق دستورالعمل سازنده برای باکتری‌های گرم منفی استخراج و در دمای C 20°- نگهداری گردید. تکثیر ژن 16S rRNA توسط آغازگرهای

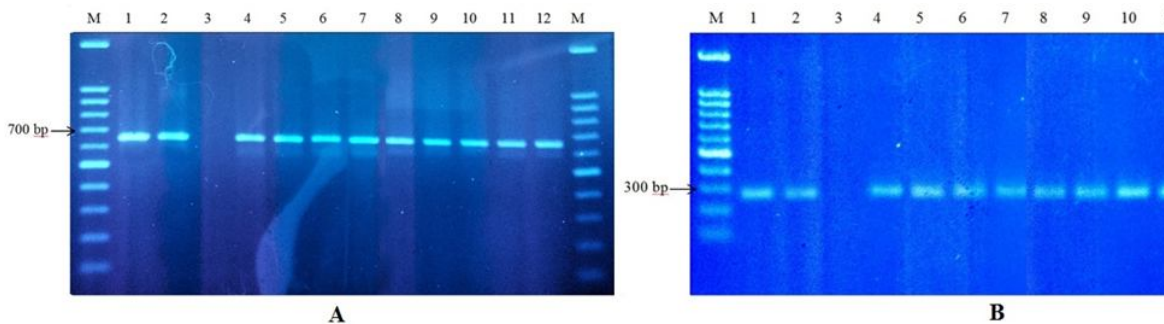
عمومی (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-) 27F و (3' / 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 1492R بر طبق روش مزینانی و اصغرزاده (2014) در حجم 50 میکرولیتر انجام گرفت. جهت اطمینان از تکثیر ژن مورد نظر، محصولات PCR بر روی ژل آگاروز 1/2 درصد الکتروفورز و باند حدود 1500 جفت بازی مشاهده شد. جهت توالی‌یابی، محصولات ژن 16S rRNA تکثیر شده توسط PCR به شرکت بایونیر (Bioneer) کره جنوبی ارسال گردید. سپس توالی‌های رفت و برگشت بدست آمده توسط نرم افزار Vector NTI Advance™ 10 (لو و موریاما، 2004) اصلاح و توالی‌های کانینگ (Contig) ایجاد شد. در نهایت این توالی‌های کانینگ با دیگر توالی‌های موجود در سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) مقایسه و بلاست گردید. در این مقایسه، نزدیک‌ترین توالی‌های مرتبط با استرین‌های تیپ مشابه با توالی‌های جدایه‌ها مورد جستجو قرار گرفت.

نتایج

جداسازی و شناسایی مقدماتی جدایه‌های *Azospirillum* از 115 نمونه‌ی خاک و ریشه‌ی گیاهان گندم و ذرت تعداد 43 جدایه براساس مرفولوژی کلنی‌ها بر روی محیط کشت‌های NFB و RC جامد انتخاب گردید. از تعداد کل جدایه‌ها، 24 جدایه متعلق به گیاه گندم و 19 جدایه‌ی دیگر متعلق به گیاه ذرت بود. لازم به ذکر است تمامی این جدایه‌ها گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت و هوازی بودند.

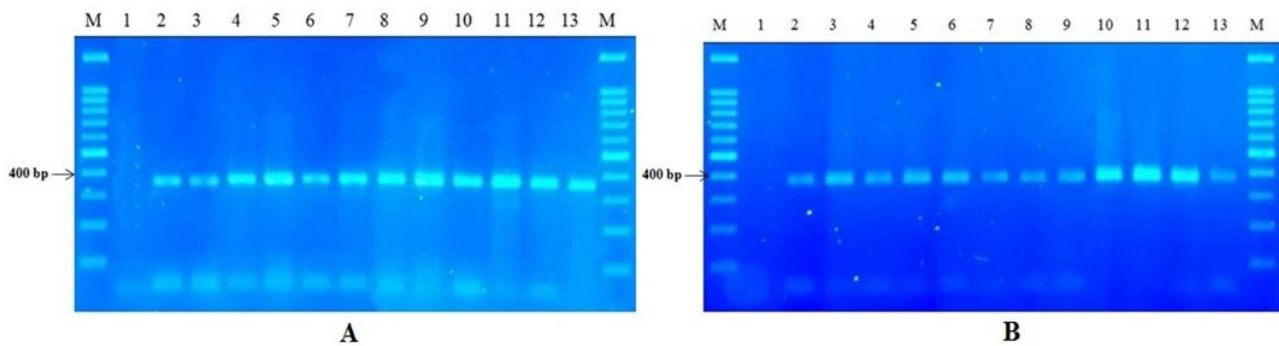
تشخیص باکتری‌های *Azospirillum* توسط آغازگرهای اختصاصی

انجام واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Az16S-A و Azo494-F/Azo756-R باعث تکثیر باندهای 646 و 263 جفت بازی به‌ترتیب در تمام جدایه‌های *Azospirillum* جدا شده گردید. همچنین در این واکنش از دو جدایه‌ی استاندارد *A. brasilense* A. و *lipoferum* (گرفته شده از بخش بیولوژی موسسه‌ی خاک و آب) به عنوان کنترل مثبت و جنس *Rhizobium* به عنوان کنترل منفی استفاده گردید که آغازگرهای اختصاص فوق قادر به تکثیر باند در جنس *Rhizobium* نبودند (شکل 1).



شکل 1- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR در جدایه‌های آزوسپیریلوم با استفاده از آغازگرهای Az16S-A (شکل A با 646 جفت باز) و Azo494-F/Azo756-R (شکل B با 263 جفت باز)

M- مارکر 100 bp (شرکت سیناکلون)، 1 و 2- جدایه‌های استاندارد *Azospirillum brasilense* و *A. lipoferum* تهیه شده از موسسه خاک و آب، بخش بیولوژی (کنترل مثبت)، 3- باکتری *Rhizobium sp.* (کنترل منفی)، 4 تا 12- جدایه‌های *Azospirillum* (جداشده از گندم و ذرت)



شکل 2- نقوش الکتروفورزی محصولات PCR ژن‌های *nifH* (شکل A با 360 جفت باز) و *nifD* (شکل B با 390 جفت باز) تکثیر شده با آغازگرهای *FdB260/FdB26* و *PolF/PolR* به ترتیب
M- مارکر 100 bp (شرکت سیناکلون)، 1- باکتری *Xanthomonas sp.* (کنترل منفی)، 2 و 3- باکتری‌های *Rhizobium sp.* و *Azotobacter sp.* (کنترل مثبت)، 4 تا 13- جدایه‌های *Azospirillum* (جداشده از گندم و ذرت)

تولید ایندول استیک اسید

در این آزمون تمام جدایه‌ها در غلظت صفر تریپتوفان قادر به تولید ایندول استیک اسید بوده و رنگ صورتی به درجات مختلف در لوله‌های آزمایش پدیدار گردید. نتایج نشان داد که میزان تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها در غلظت صفر تریپتوفان بین حدود 2/69 تا 22/8 میلی-گرم در لیتر متغیر می‌باشد. در بین جدایه‌های *Azospirillum* نیز جدایه‌های شماره 14، 15 و 16 بیشترین مقدار ایندول استیک اسید و جدایه‌های 33، 38 و 29 کمترین میزان ایندول استیک اسید را بعد از 48 ساعت تولید نمودند (جدول 1). میانگین تولید IAA نیز در جدایه‌ها برابر با حدود 15 میلی‌گرم در لیتر بود.

بررسی حضور ژن‌های *nif*، مؤثر در فرآیند تثبیت نیتروژن، در جدایه‌های باکتری *Azospirillum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

تمام جدایه‌ها قادر به تکثیر باندهای 360 و 390 جفت بازی به ترتیب با آغازگرهای *PolF/PolR* و *FdB260/FdB261* برطبق مارکر (نشانگر) DNA بودند. همچنین در این آزمون تکثیر ژنوم دو باکتری کنترل مثبت *Rhizobium* و *Azotobacter* باندهای فوق را ایجاد کرده درحالی‌که در تکثیر ژنوم باکتری *Xanthomonas* باندهای فوق مشاهده نگردید (شکل 2).

محلول‌سازی فسفات‌های نامحلول

نتایج آزمون تعیین کیفی انحلال فسفات نشان داد که تمام جدایه‌ها قادر به رشد بر روی محیط Pikovskaya's agar بودند ولی تنها جدایه‌های 23، 24، 25، 26، 28، 29، 33، 36، 38، 39 و 43 توانستند ناحیه‌ی شفاف در اطراف کلنی‌های خود ایجاد کنند، و بیشترین شاخص انحلال فسفات متعلق به جدایه‌های 24 و 38 بود (جدول 1). در آزمون تعیین کیفی انحلال فسفات نیز تعدادی از جدایه‌های رشد کرده بر روی محیط Pikovskaya's agar توانستند فسفات معدنی را در محیط مایع NBRIP broth محلول کنند. اندازه‌گیری محتوای فسفات محلول نشان داد که میزان انحلال فسفر در بین جدایه‌های *Azospirillum* از 2/04 تا 44/5 میلی‌گرم در لیتر متغیر بوده و جدایه‌ی 33 دارای بیشترین انحلال فسفات و جدایه‌ی دو دارای کمترین مقدار انحلال فسفات بودند. همچنین جدایه‌های 3، 4، 7، 8، 9، 12، 14، 15، 16، 19، 20، 22، 27، 31، 32، 34، 35، 37، 40 و 41 توانایی انحلال فسفات را نداشته و از این نظر منفی تلقی شدند (جدول 1). در این تحقیق در اثر فعالیت انحلال فسفات جدایه‌ها، pH محیط‌های کشت کاهش یافت. این کاهش توسط جدایه‌ی 33 از 7 به 5/6 صورت گرفت و فعالترین جدایه در این آزمون بود.

ارتباط بین انحلال فسفات و کاهش pH در شکل 3 نشان داده شده است.

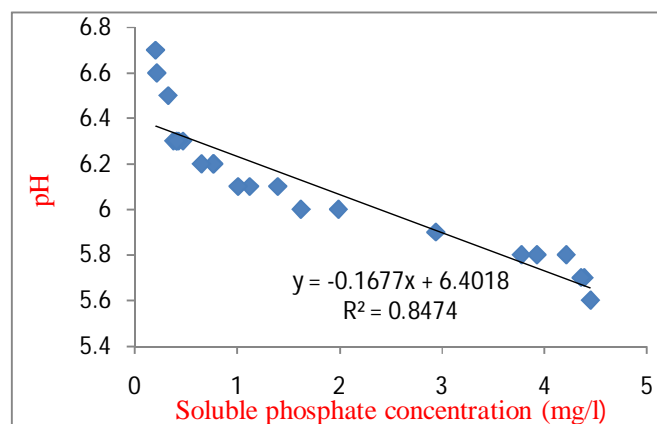
تولید سیدروفور

نتایج این مطالعه نشان داد که 12 جدایه‌ی 9، 22، 24، 25، 26، 27، 29، 33، 38، 39، 41، 43 از باکتری‌های *Azospirillum* قادر به تولید هاله‌ی نارنجی رنگ در اطراف کلنی‌های خود بوده که نشان‌دهنده‌ی توانایی آنها در تولید سیدروفور می‌باشد. در این آزمون نسبت قطر هاله به قطر کلنی در جدایه‌ها متغیر بوده و بیشترین توانایی تولید سیدروفور (بیشترین نسبت ناحیه‌ی قطر هاله) پس از هفت روز متعلق به جدایه‌ی 24 با نسبت 2/25 بود. جدایه‌های 9، 22، 25، 26، 27، 39 و 41 دارای هاله‌ی خیلی نازک و ضعیف بودند (جدول 1).

آزمون‌های تولید HCN، فعالیت آنزیم کیتیناز و فعالیت

ضد قارچی

نتایج این آزمون‌ها نشان داد که هیچکدام از جدایه‌های باکتری *Azospirillum* قادر به تولید HCN، تولید کیتیناز و فعالیت ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی نبودند و تمام جدایه‌ها به عنوان منفی شناسایی شدند.



شکل 3- ارتباط بین غلظت فسفات محلول و کاهش pH محیط کشت

جدول 1- تولید ایندول استیک اسید، سیدروفور و فعالیت‌های انحلال فسفات معدنی در بین جدایه‌های *Azospirillum*

شماره‌ی جدایه‌های آزوسپیریولوم	تولید IAA (میلی‌گرم در لیتر)	تولید سیدروفور (نسبت قطر هاله به قطر کلنی)	انحلال فسفات معدنی	
			شاخص انحلال (SI)	غلظت فسفات محلول (میلی‌گرم در لیتر)
pH محیط کشت				
1	12/4	-	-	9/40
2	17/3	-	-	4/08
3	19/1	-	-	0/000
4	21/2	-	-	0/000
5	20/2	-	-	22/6
6	18/9	-	-	8/58
7	21/4	-	-	0/000
8	20/8	-	-	0/000
9	20/6	هاله‌ی ضعیف	-	0/000
10	20/3	-	-	8/22
11	19/0	-	-	15/5
12	21/1	-	-	0/000
13	21/2	-	-	6/5
14	21/9	-	-	0/000
15	22/2	-	-	0/000
16	22/8	-	-	0/000
17	21/2	-	-	20
18	7/24	-	-	15/4
19	18/7	-	-	0/000
20	16/9	-	-	0/000
21	15/9	-	-	4/3
22	21/3	هاله‌ی ضعیف	-	0/000
23	8/6	-	1/12	39/8
24	6/45	2/25	1/88	78/6
25	7/55	هاله‌ی ضعیف	1/14	58/8
26	4/52	هاله‌ی ضعیف	1/4	87/8
27	11/1	هاله‌ی ضعیف	-	0/000
28	4/83	-	1/14	32/4
29	3/49	1/89	1/285	84/2
30	12/9	-	-	7/60
31	16/0	-	-	0/000
32	13/5	-	-	0/000
33	2/7	1/187	1/307	89
34	12/9	-	-	0/000
35	19/8	-	-	0/000
36	5/08	-	1/157	13
37	19/3	-	-	0/000
38	3/21	1/43	1/88	75/4
39	4/34	هاله‌ی ضعیف	1/41	69/2
40	14/3	-	-	0/000
41	20/6	هاله‌ی ضعیف	-	0/000
42	15/2	-	-	8/14
43	16/0	1/55	1/25	28/2
میانگین	15/0		1/36	18/8

تکثیر و توالی‌یابی ژن 16S rRNA

A. brasilense استرین AZ72 و جدایه 24 با توالی باکتری *A. lipoferum* استرین B2، 99 درصد شباهت داشتند. همچنین جدایه‌های 29 و 33 به ترتیب با 97 و 99 درصد، به توالی باکتری *A. zeae* استرین Gr2 شبیه بودند (جدول 2). در نهایت توالی‌های ژن 16S rRNA تازه بدست آمده در بانک ژن با شماره دسترسی‌های MH130054 تا MH13360 ثبت گردید.

تطابق توالی 16S rRNA جدایه‌های مورد نظر با سایر توالی‌های 16S rRNA موجود در بانک ژنی NCBI، شباهت توالی 99 درصدی جدایه‌ی 1 را با باکتری *A. lipoferum* استرین 5 نشان داد. توالی‌های دو جدایه 21 و 40، شباهت توالی 99 درصدی با *A. brasilense* استرین NF11 داشت. توالی جدایه 2 نیز با توالی باکتری

جدول 2- درصد شباهت توالی 16S rRNA جدایه‌های مورد نظر با سایر توالی‌های 16S rRNA موجود در بانک ژنی NCBI

شماره	جدایه‌ها	گونه‌های نماینده	درصد شباهت (بلاست)
1	Az ₁	<i>A. lipoferum</i> استرین 5	99
2	Az ₂	<i>A. brasilense</i> استرین AZ72	99
3	Az ₂₁	<i>A. brasilense</i> استرین NF11	99
4	Az ₂₄	<i>A. lipoferum</i> استرین B2	99
5	Az ₂₉	<i>A. zeae</i> استرین Gr2	97
6	Az ₃₃	<i>A. zeae</i> استرین Gr2	99
7	Az ₄₀	<i>A. brasilense</i> استرین NF11	99

بحث

در بین باکتری‌های مختلف، گونه‌های مختلف *Azospirillum* به‌عنوان باکتری‌های PGPR مهم، مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (باشان و همکاران، 2004). تشخیص PCR جدایه‌های *Azospirillum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی جهت کاهش استفاده از محیط کشت‌ها و آزمون‌ها و متعاقباً جهت تسریع جداسازی باکتری‌های *Azospirillum* همزمان با کاهش تمایل انتخاب (selection bias) مطرح می‌شود. در آزمون PCR تمام جدایه‌ها و باکتری‌های کنترل مثبت قادر به تکثیر باندهای 646 و 263 به ترتیب با آغازگرهای Az16S-A و Azo494-F/Azo756-R بودند، در صورتیکه باکتری *Rhizobium* به‌عنوان باکتری‌های کنترل منفی نتوانستند باندهای مذکور را تکثیر نمایند. شیم-هاتوری و همکاران (2011) و لین و همکاران (2011) با استفاده از این آغازگرهای اختصاصی باکتری‌های *Azospirillum* را از سایر باکتری‌های تثبیت‌کننده‌ی ازت مانند ریزوبیوم تشخیص داده و نشان دادند روی هم‌رفته اختصاصیت و حساسیت آغازگرهای فوق برای شناسایی باکتری‌های *Azospirillum* بسیار مناسب می‌باشد.

اکولوژیکی جمعیت‌های *Azospirillum* بکار رود (مک گیلووی و همکاران، 2002). این مطالعه یک روش PCR اختصاصی سریع و ساده را با استفاده از آغازگرهای Azo494-F/Azo756-R و Az16S-A جهت تسریع در تشخیص و شناسایی جدایه‌های *Azospirillum* در میان جمعیت‌های باکتری‌های ریزوسفر ایجاد نمود.

گونه‌های *Azospirillum* قادر به تبدیل نیتروژن اتمسفری به آمونیوم تحت شرایط کم هوایی (Microaerobic) در سطوح کم نیتروژن از طریق فعالیت کمپلکس نیتروژناز می‌باشند. این آنزیم از دو جزء تشکیل شده است: پروتئین دی نیتروژناز (پروتئین MoFe، NifDK) که حاوی یک کوفاکتور آهن-مولیبدن بوده و محل احیاء نیتروژن مولکولی (N₂) می‌باشد، پروتئین دی نیتروژناز ردوکتاز (پروتئین NifH، Fe) که الکترون‌ها را از یک دهنده الکترون به پروتئین نیتروژناز انتقال می‌دهد (استین‌هدت و واندرلیدن، 2000). به منظور شناسایی ژن-های *nifD* و *nifH* با سرعت و حساسیت و اختصاصیت بالا، پلی و همکاران (2001) و استلترفوس و همکاران (1997) به ترتیب آغازگرهای اختصاصی PolF/PolR و FdB260/FdB261 را طراحی و استفاده نمودند. آن‌ها در مطالعات خود با استفاده از این آغازگرها توانستند حضور آنزیم نیتروژناز در باکتری‌ها و تثبیت نیتروژن توسط آن‌ها را مشخص نمایند. در این تحقیق با توجه به توانایی رشد و ایجاد هاله‌ی شفاف جدایه‌ها در بالای لوله‌ی آزمایش محتوی محیط نیمه‌جامد NFB و همچنین تکثیر باندهای

روش PCR توسعه یافته احتمالاً می‌تواند به عنوان یک ابزار مفید برای جداسازی انواع باکتری‌های *Azospirillum* بومی از نمونه‌های کشاورزی به منظور کشف گونه‌های جدید PGPR و تجزیه و تحلیل تنوع و

360 و 390 جفت بازی به‌وسیله‌ی آغازگرها، حضور آنزیم نیتروژناز و توانایی بالقوه تثبیت نیتروژن در این جدایه‌ها آشکار گردید. در این آزمون تکثیر باندهای مورد نظر در جنس *Xanthomonas* به عنوان کنترل منفی مشاهده نشد، که نشان‌دهنده‌ی اختصاصیت آغازگرهای فوق جهت تشخیص ژن‌های *nifD* و *nifH* در باکتری‌های تثبیت کننده‌ی ازت بود.

براساس مطالعات مقدماتی غربالگری تجزیه‌ی کمی تولید IAA، تمام جدایه‌های آزوسپیریولوم قادر به تولید IAA بوده و جدایه‌های 14، 15 و 16 بیشترین و جدایه‌های 33، 38 و 29 کمترین میزان IAA را تولید کردند و میانگین تولید آن در بین جدایه‌ها 15/0 mg/l بود (جدول 1). گزارش شده که تولید IAA توسط باکتری‌ها در بین جدایه‌ها و گونه‌های مختلف می‌تواند تغییر کند و همچنین تحت تأثیر شرایط کشت، مرحله‌ی رشد و در دسترس بودن سوبسترا قرار می‌گیرد (اسری‌دوی و ویرامالایا، 2007). مطالعات پیشین نیز تولید IAA در جدایه‌های *Azospirillum* را تأیید می‌کند (اکبری و همکاران، 2007؛ پریگ و همکاران، 2007). اگرچه توانایی ذاتی باکتری‌ها جهت تولید IAA در ریزوسفر بستگی به در دسترس بودن پیش‌ماده‌ها و جذب IAA میکروبی توسط گیاه دارد (احمد و همکاران، 2008).

فسفر به عنوان یک عنصر غذایی پرمصرف ضروری در نظر گرفته می‌شود و بخش اعظم آن در کودهای شیمیایی با تبدیل به نمک‌های کلسیم و منیزیم در خاک غیرمحلول شده و از دسترس گیاهان خارج می‌گردد. ریزجانداران خاک در تبدیل شکل‌های غیرمحلول فسفر به شکل‌های محلول نقش دارند و بنابراین دسترسی بعدی فسفر برای ریشه‌ی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (ریچاردسون و همکاران، 2001). در این تحقیق تعداد 11 جدایه از باکتری *Azospirillum* قادر به ایجاد ناحیه‌ی شفاف در اطراف کلنی خود بر روی محیط *Pikovskaya's agar* بودند و بیشترین شاخص انحلال مربوط به جدایه 24 و کمترین آن مربوط به جدایه‌های 23، 25 و 28 بود. همچنین حدود 53 درصد از جدایه‌ها قادر به حل کردن فسفات معدنی در محیط *NBRIP broth* بودند که مقدار متوسط حل کردن فسفات در این جدایه‌ها برابر 18/8 mg/l بود. در این مطالعه بعضی از جدایه‌ها در محیط جامد قادر به ایجاد هاله‌ی مشخص نبوده و یا هاله ضعیفی داشتند، ولی در محیط کشت مایع توانستند فسفات معدنی نامحلول را محلول‌سازی نمایند (جدول 1) که نشان‌دهنده‌ی عدم ارتباط بین SI بر روی محیط کشت حاوی آگار و انحلال

فسفات در محیط کشت‌های مایع می‌باشد. مطالعات پیشین نیز صحت این نتایج را تأیید می‌کند (مهتا و نوتیال، 2001). فعالیت انحلال فسفات در جدایه‌های آزوسپیریولوم بر طبق مطالعات پیشین بود که نشان می‌داد اعضای جنس *Azospirillum* نیز دارای فعالیت انحلال فسفات می‌باشند (محبوب و همکاران، 2013؛ ساهو و همکاران، 2017). گمان می‌گردد جمعیت میکروبی حل‌کننده فسفات نامحلول در خاک از طریق آزادسازی متابولیت‌های میکروبی اسیدهای آلی نقش خود را ایفا می‌کنند. اگرچه علاوه بر تولید اسید مکانیسم‌های دیگر می‌تواند باعث حل شدن فسفات گردد (نوتیال و همکاران، 2003). کاهش pH محیط‌کشت‌های مایع در طول انحلال فسفات معدنی مشاهده گردید که بر تولید میکروبی اسیدهای آلی توسط جدایه‌های *Azospirillum* اشاره داشت (چن و همکاران، 2006). کاهش pH محیط کشت از 7 تا 5/6 اندازه‌گیری و ارتباط بین کاهش pH محیط کشت و فعالیت انحلال تعیین شد (شکل 3). اگرچه انحلال فسفات الزاماً مرتبط با اسیدیته محیط‌کشت نیست، ولی اطلاعات حاضر در این تحقیق وجود ارتباط (رابطه) بین آن‌ها را نشان داد.

یکی دیگر از خصوصیات مهم محرک رشد که ممکن است رشد گیاه را به صورت غیر مستقیم تحت تأثیر قرار دهد، تولید سیدروفورها می‌باشد (احمد و همکاران، 2008). آن‌ها همچنین مستقیماً رشد گیاه را با افزایش در دسترس بودن برخی مواد معدنی مانند فسفر تحریک می‌کنند (داستاگر و همکاران، 2011). سیدروفورها به یون آهن موجود (Fe^{3+}) در ریزوسفر متصل می‌شوند و از طریق این فرآیند، آهن برای گیاهان در دسترس شده ولی برای پاتوژن‌های گیاهی غیرقابل دسترس می‌گردد. بنابراین در همان زمان سیدروفور از گیاه در برابر پاتوژن‌ها محافظت می‌نماید (پاشاپور و همکاران، 2016). در این مطالعه 12 جدایه قادر به تولید سیدروفور بوده (حدود 28%) و فعالیت‌های محرک رشد متعدد را نشان دادند. پتانسیل جدایه‌های *Azospirillum* جهت تولید سیدروفورها در شرایط آزمایشگاهی توسط مانی وانان و تولکاپیان (2013) و پدرازا (2015) گزارش گردیده است.

در تحقیق کنونی هیچ‌کدام از جدایه‌های باکتری *Azospirillum* قادر به تولید HCN نبودند. براساس بررسی‌های قبلی این ویژگی به طور عمده در بین استرین-های سودوموناس توصیف شده (پاشاپور و همکاران، 2016) و در جدایه‌های *Azospirillum* متغیر می‌باشد (مهناز و همکاران، 2010). چندین مطالعه نیز بر حضور آنزیم‌های هیدرولیتیک مانند کیتیناز در برخی جدایه‌های

و دی-باشان، 2010؛ حیات و همکاران، 2010). ثابت شده است که عملکردهای PGP گونه‌های مختلف *Azospirillum* محرک رشد گیاه، عمومی و جامع نیست بلکه به شدت اختصاصی‌ترین بوده و به صورت کمی و کیفی تغییر می‌کند (باشان و دی-باشان، 2010؛ حیات و همکاران، 2010؛ پریگ، 2007). این جدایه‌ها می‌توانند بیشتر از دو یا سه خصوصیت PGP را نشان دهند، که ممکن است رشد گیاه را به صورت مستقیم یا غیرمستقیم یا به صورت سینرژیستی افزایش دهد (یاسمین و همکاران، 2007). مشابه یافته‌های ما در مورد فعالیت‌های PGP متعدد در میان جدایه‌های آزوسپیریلوم توسط افراد دیگر گزارش شده است (محبوب و همکاران، 2013؛ مهناز و همکاران، 2010؛ ساهو و همکاران، 2017).

نتیجه‌گیری

تحقیق حاضر حداقل وجود سه گونه‌ی A. *zeari* و *A. lipoferum brasilense* در استان اصفهان نشان داد. این جدایه‌های مختلف آزوسپیریلوم دارای خصوصیات محرک رشدی متفاوت بودند، و آن‌ها توانایی‌های بالقوه‌ای در تثبیت ازت، انحلال فسفات، تولید سیدروفور و ایندول استیک اسید از خود نشان دادند. مطالعه‌ی انجام شده در مورد گونه‌های *Azospirillum* و خصوصیات محرک رشدی مختلف آن‌ها جهت طراحی راه‌حل‌هایی برای استفاده از این باکتری‌ها به‌عنوان مایه‌ی تلقیح در کشاورزی پایدار و ارگانیک مفید خواهد بود.

Azospirillum دلالت دارد (مهبانی و ال‌کاتاتی، 2012؛ ردیف و حسن، 2014)، ولی در این مطالعه هیچ‌کدام از جدایه‌ها قادر به تولید کیتیناز نبودند. همچنین مطالعات پیشین نشان داده است که جدایه‌های *Azospirillum* دارای فعالیت‌های ضد قارچی در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه-ای هستند (لوپز-ریس و همکاران، 2017؛ تورتورا و همکاران، 2011). در این تحقیق هیچ کدام از جدایه‌ها قادر به جلوگیری از رشد قارچ *Fusarium graminearum* در محیط کشت نبوده که احتمالاً به دلیل عدم تولید HCN و ترشح آنزیم کیتیناز توسط جدایه‌ها بود. با این حال، گزارش‌هایی در مورد عدم همبستگی بین آنتی بیوز در شرایط آزمایشگاهی و کنترل زیستی وجود دارد (پندی و همکاران، 2001).

براساس مطالعات باشان و همکاران (2004)، آییاز و همکاران (2016) و ایلیاس و همکاران (2010) گونه‌های *A. brasilense*، *A. lipoferum* و *A. zeari* در ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت موجود بوده و توالی‌یابی ژن 16S rRNA در این تحقیق نیز حضور این گونه‌ها را در ریزوسفر گیاهان گندم و ذرت در اصفهان تأیید نمود، و این اولین گزارش از حضور باکتری *A. zeari* در ریزوسفر گیاه ذرت در اصفهان و احتمالاً در ایران است. فعالیت‌های PGP جدایه‌های شناخته شده‌ی باکتریایی در بین جدایه‌های امتحان شده بسیار متغیر بوده و همه‌ی جدایه‌های مطالعه شده تمام فعالیت‌های PGP را نداشتند که نشان‌دهنده‌ی آن است که همه باکتری‌های PGPR ممکن است به اندازه یکسان مؤثر نبوده و عملکردهای چندتایی را جهت تحریک رشد گیاه نداشته باشند (باشان

References

1. Afzal, A. and Bano, A., 2008. *Rhizobium* and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). International Journal of Agriculture and Biology 10(1):85-88.
2. Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M.S., 2008. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiological Research 163(2):173-181.
3. Ahmed, E.A., Hassan, E.A., El Tobgy, K.M.K. and Ramadan, E.M., 2014. Evaluation of rhizobacteria of some medicinal plants for plant growth promotion and biological control. Annals of Agricultural Sciences 59(2):273-280.
4. Akbari, G.A., Arab, S.M., Alikhani, H.A., Allakdadi, I. and Arzanesh, M.H., 2007. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. and the IAA of superior strains effects on wheat roots. World Journal of Agricultural Sciences 3(4):523-529.
5. Ali, B., Sabri, A.N. and Hasnain, S., 2010. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology 26(8):1379-1384.
6. Ayyaz, K., Zaheer, A., Rasul, G. and Mirza, M.S., 2016. Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. Brazilian Journal of Microbiology 47(3):542-550.

7. Bashan, Y. and De-Bashan, L.E., 2010. How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth—a critical assessment. In *Advances in agronomy* (Vol. 108:77-136). Academic Press.
8. Bashan, Y., Holguin, G. and De-Bashan, L.E., 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50(8):521-577.
9. Bhatt, P.V. and Vyas, B.R.M., 2014. Screening and characterization of plant growth and health promoting rhizobacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3(6):139-155.
10. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. and Young, C.C., 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology* 34(1):33-41.
11. Dashti, A.A., Jadaon, M.M., Abdulsamad, A.M. and Dashti, H.M., 2009. Heat treatment of bacteria: A simple method of DNA extraction for molecular techniques. *Kuwait Medical Journal* 41(2):117-122.
12. Dastager, S.G., Deepa, C.K. and Pandey, A., 2011. Potential plant growth-promoting activity of *Serratia nematodiphila* NII-0928 on black pepper (*Piper nigrum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27(2):259-265.
13. de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Morey, T. and Bashan, Y., 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research* 38(2):466-474.
14. Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. and Chauhan, S.M., 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research* 159(4):371-394.
15. El-Hadad, M.E., Mustafa, M.I., Selim, S.M., Mahgoob, A.E.A. and El-Tayeb, T.S., 2010. In vitro evaluation of some bacterial isolates from Ethiopia and South Africa. *Biological Control* 45:72-84.
16. Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R. and Ahmed, I., 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60(4):579-598.
17. Herman, M.A.B., Nault, B.A. and Smart, C.D., 2008. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection* 27(6):996-1002.
18. Ilyas, N. and Bano, A., 2010. *Azospirillum* strains isolated from roots and rhizosphere soil of wheat (*Triticum aestivum* L.) grown under different soil moisture conditions. *Biology and Fertility of Soils* 46(4):393-406.
19. Kanimozhi, K. and Panneerselvam, A., 2010. Studies on isolation and nitrogen fixation ability of *Azospirillum* spp. isolated from Thanjavur district. *Der Chemica Sinica* 1(3):138-145.
20. Karlidag, H., Esitken, A., Turan, M. and Sahin, F., 2007. Effects of root inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrient element contents of leaves of apple. *Scientia Horticulturae* 114(1):16-20.
21. Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94(11):1259-1266.
22. Lin, S.Y., Shen, F.T. and Young, C.C., 2011. Rapid detection and identification of the free-living nitrogen fixing genus *Azospirillum* by 16S rRNA-gene-targeted genus-specific primers. *Antonie van Leeuwenhoek* 99(4):837-844.
23. López-Reyes, L., Carcaño-Montiel, M.G., Lilia, T.L., Medina-de la Rosa, G. and Armando, T.H.R., 2017. Antifungal and growth-promoting activity of *Azospirillum brasilense* in *Zea mays* L. ssp. mexicana. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50(13-14):727-743.

24. Lu, G. and Moriyama, E.N., 2004. Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Briefings in Bioinformatics* 5(4):378-388.
25. Mahbouba, B., Nadir, B., Nadia, Y. and Abdelhamid, D., 2013. Phenotypic and molecular characterization of plant growth promoting Rhizobacteria isolated from the rhizosphere of wheat (*Triticum durum* Desf.) in Algeria. *African Journal of Microbiology Research* 7(23):2893-2904.
26. Manivannan, M. and Tholkappian, P., 2013. Prevalence of *Azospirillum* isolates in tomato rhizosphere soils of coastal areas of Cuddalore District, Tamil Nadu. *International Journal of Recent Scientific Research* 4:1610-1613.
27. Mazinani, Z. and Asgharzadeh, A., 2014. Genetic diversity of *Azotobacter* strains isolated from soils by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Cytology and Genetics* 48(5):293-301.
28. Mcgilloway, R.L., Weaver, R.W., Ming, D.W. and Pillai, S.D., 2002. A PCR-MPN based quantitative approach to enumerate nitrifying bacteria in zeoponic substrates. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 10(1), pp.49-58.
29. Mehanni, M.M. and El-Katatny, M.H., 2012. Evaluation of the antifungal activity of some *Azospirillum* strains for their possible role as biocontrol agents. *Egypt. J. Bot.* 2nd International conference, 29-30 April, Minia Univ 79 – 97.
30. Mehnaz, S., Baig, D.N. and Lazarovits, G., 2010. Genetic and phenotypic diversity of plant growth promoting rhizobacteria isolated from sugarcane plants growing in Pakistan. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20(12):1614-1623.
31. Mehta, S. and Nautiyal, C.S., 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology* 43(1):51-56.
32. Minorsky, P.V., 2008. On the inside. *Plant Physiology* 146(4):323-324.
33. Murphy, J.A.M.E.S. and Riley, J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* 27:31-36.
34. Naik, P.R., Raman, G., Narayanan, K.B. and Sakthivel, N., 2008. Assessment of genetic and functional diversity of phosphate solubilizing *fluorescent pseudomonads* isolated from rhizospheric soil. *BMC Microbiology* 8(1):230.
35. Nautiyal, C.S., Mehta, S. and Pushpangadan, P., Council of Scientific and Industrial Research (CSIR), 2003. Composition for qualitative screening of phosphate solubilizing microorganisms and a qualitative method for screening microorganisms. United States Patent 6:638,730.
36. Pandey, A., Palni, L.M.S. and Hebbar, K.P., 2001. Suppression of damping-off in maize seedlings by *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research* 156(2):191-194.
37. Pashapour, S., Besharati, H., Rezazade, M., Alimadadi, A. and Ebrahimi, N., 2016. Activity screening of plant growth promoting rhizobacteria isolated from alfalfa rhizosphere. *Biological Journal of Microorganism* 4(16):65-76.
38. Pedraza, R.O., 2015. Siderophores production by *Azospirillum*: biological importance, assessing methods and biocontrol activity. In *Handbook for Azospirillum* (251-262). Springer, Cham.
39. Perrig, D., Boiero, M.L., Masciarelli, O.A., Penna, C., Ruiz, O.A., Cassán, F.D. and Luna, M.V., 2007. Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 75(5):1143-1150.
40. Pikovskaya, R.I., 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17:362-370.
41. Poly, F., Monrozier, L.J. and Bally, R., 2001. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology* 152(1):95-103.

42. Radif, H.M. and Hassan, S.S., 2014. Detection of hydrolytic enzymes produced by *Azospirillum brasiliense* isolated from root soil. *World Journal of Experimental Biosciences* 2(2):36-40.
43. Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E., O'hara, C.P. and Simpson, R.J., 2001. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. *Plant and Soil* 229(1):47-56.
44. Saharan, B.S. and Nehra, V., 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sciences and Medical Research* 21(1):30.
45. Sahoo, R.K., Ansari, M.W., Pradhan, M., Dangar, T.K., Mohanty, S. and Tuteja, N., 2014. Phenotypic and molecular characterization of native *Azospirillum* strains from rice fields to improve crop productivity. *Protoplasma* 251(4):943-953.
46. Sahu, P.K., Gupta, A., Sharma, L. and Bakade, R., 2017. Mechanisms of *Azospirillum* in Plant Growth Promotion. *Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences* 4(9):338-343.
47. Saikia, S.P., Dutta, S.P., Goswami, A., Bhau, B.S. and Kanjilal, P.B., 2010. Role of *Azospirillum* in the Improvement of Legumes. In *Microbes for Legume Improvement* (389-408). Springer, Vienna.
48. Serpil, S., 2012. An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development* 3(1):77-80.
49. Shime-Hattori, A., Kobayashi, S., Ikeda, S., Asano, R., Shime, H. and Shinano, T., 2011. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus *Azospirillum* within populations of rhizosphere bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 111(4):915-924.
50. Sridevi, M. and Veera Mallaiiah, K., 2007. Bioproduction of indole acetic acid by *Rhizobium* strains isolated from root nodules of green manure crop, *Sesbania sesban* (L.) Merr. *Iranian Journal of Biotechnology* 5(3):178-182.
51. Stead, D.E., Elphinstone, J.G., Weller, S., Smith, N. and Hennessy, J., 2000. Modern methods for characterising, identifying and detecting bacteria associated with plants. *Acta Horticulturae* 530:45-59.
52. Steenhoudt, O. and Vanderleyden, J., 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24(4):487-506.
53. Stoltzfus, J.R., So, R.M.P.P., Malarvithi, P.P., Ladha, J.K. and De Bruijn, F.J., 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant and Soil*, 194(1-2), pp.25-36.
54. Tortora, M.L., Díaz-Ricci, J.C. and Pedraza, R.O., 2011. *Azospirillum brasiliense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* 193(4):275-286.
55. Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255(2):571-586.
56. Yasmin, F., Othman, R., Saad, M.S., and Sijam, K. 2007. Screening for beneficial properties of Rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. *Journal of Biotechnology* 6:49-52.
57. Zehr, J.P. and McREYNOLDS, L.A., 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the nifH gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Applied and Environmental Microbiology* 55(10):2522-2526.

Isolation and identification of *Azospirillum* bacteria of wheat and maize rhizosphere and determination of some plant growth promoting characteristics

M. Shahabi, N. Panjekeh¹, H. A. Rahmani and M. Salari

Ph. D. Student, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran;

E-mail: mahmoodshahabi@gmail.com

Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran;

E-mail: naserpanjekeh@gmail.com

Assistant professor, Soil and Water Research Institute of Iran;

E-mail: asadi_1999@yahoo.com

Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Zabol, Iran;

E-mail: Salari21m@yahoo.com

Received: December, 2018 & Accepted: Septembdr, 2019

Abstract

Azospirillum bacteria are one of the most important plant growth promoting rhizobacteria which exist in the rhizosphere of many crop plants. In this research, some soil and plant roots were collected from wheat and maize rhizosphere of the fields in Isfahan and were cultured in the tubes containing Nitrogen Free Bromothymol (NFB) medium. In order to isolate *Azospirillum* strains, the grown bacteria pellicles were streaked on NFB and Rojo Congo (RC) specific and semi-specific media. The bacteria were isolated and purified using morphological characteristics on the medium. After gram staining, catalase, oxidase and oxidative-fermentative tests, the detection and identification of *Azospirillum* isolates was done by molecular tests using PCR test with Az16S-A and Azo494-F/Azo756-R specific primers and 16S rRNA gene sequencing. Plant growth promoting characteristics (PGP) of *Azospirillum* isolates were determined by investigating the presence of NifH and NifD genes of nitrogenase enzyme by PolF/PolR and FdB260/FdB261 specific primers respectively. The properties of phosphate solubilization and production of chitinase, HCN, siderophores and indole acetic acid of isolates were performed by using specific tests. The replication of 646, 263, 360, and 390 bp fragments by Az16S-A, Azo494-F/Azo756-R, PolF/PolR and FdB260/FdB261 primers respectively, confirmed the presence of *Azospirillum* bacteria and the presence of NifH and NifD genes. Specific tests also revealed the ability of indole acetic acid production, insoluble phosphate solubilization with average value of 15 and 18.8 mg/l respectively and siderophore production in isolates. The results showed that some of the isolates possessed several PGP properties, while some of them had one or no characteristic. Finally, the sequencing of the 16S rRNA gene in some isolates determined and three species of *A. brasilense*, *A. lipoferum* and *A. zae* identified in rhizosphere of wheat and maize plants.

Keywords: *Azospirillum*, siderophore, Chitinase, 16S rRNA

¹ Corresponding author: Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural, University of Zabol, Iran