

Paper Type: Original Article



Endophytic Colonization of Rice Root with *Azospirillum irakense* and Its Effect on Some Growth and Biochemical Parameters

Seyedeh Zeynab Sharifsadat¹, Mahnaz Aghdasi^{*1} , Faezeh Ghanati², Mohammad Hossein Arzanesh³

¹Department of Biology-Plant Physiology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran;*(Professor: Corresponding author: Aghdasi1346@gmail.com).

²Department of Plant Biology, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

³Department of Soil and Water Research, Golestan's Agricultural and Natural Resources Research Center, Gorgan, Iran.

Citation:

Sharifsadat, S. Z., Aghdasi, M., Ghanati, F. & Arzanesh, M. H. (2024). Endophytic colonization of rice root with *Azospirillum irakense* and its effect on some growth and biochemical parameters. *The quarterly scientific journal of applied biology*, Volume 37 (Issue No. 1), PP. 87-101

Received: 2023.02.06

Accepted: 2023.04.15

Abstract

Introduction: *Azospirillum* is the nitrogen fixing microorganisms which improves the growth and development of cereals and other gramineae plants in association with their roots. The goal of present study was to investigate the effect of *Azospirillum irakense* inoculation in combinations with or without auxin (IAA) and/or gibberellin (GA3) treatment on the growth and biochemical parameters of rice (*Oryza sativa* cv. hashemi) seedlings, as well as observing the bacterial colonization process in the root cells.

Methods: The roots of 21-days-old rice seedlings were treated with different concentrations (0, 100, 200 ppm) of IAA or GA3 or a combination of both (200 ppm IAA+200 ppm GA3) for 4 weeks after inoculation with *Azospirillum*.

Results: The process of bacterial colonization involves the formation of a biofilm, disintegration of the wall, entry of bacteria into root parenchymal cells and development of isolated and scattered colonies. Dry and fresh weight of roots and aerial parts, total dry and fresh weight, and relative growth rate was significantly increased after inoculation with bacteria. The highest level of these parameters was obtained in the seedlings which inoculated with bacteria in combinations with IAA plus GA3 treatment. Meanwhile, the amount of hydrogen peroxide in the roots, soluble protein, soluble sugar and phosphorus was significantly increased in both roots and aerial parts of seedlings after inoculation with bacteria in combinations with IAA plus GA3 treatment, compared to the control.

Conclusion: According to the current results, the application of *Azospirillum irakense* in combinations with IAA and GA3 treatment is a powerful strategy to improve rice seedlings growth .

Keywords: Auxin, *Azospirillum*, Destruction of cell wall, Gibberellin, Growth indicators, Rice



کلونیزاسیون اندوفیتی ریشه برنج با *Azospirillum irakense* و اثر آن بر برخی شاخص

های رشد و بیوشیمیایی

سیده زینب شریف‌السادات^۱، مهناز اقدسی^{۲*}، فائزه فنائی^۲، محمد حسین ارزانش^۴

^۱دانش آموخته دکتری، گروه زیست‌شناسی- فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

^۲استاد، گروه زیست‌شناسی- فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران.

(*نویسنده مسئول: Aghdasi1346@gmail.com)

^۳استاد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

^۴استادیار، گروه تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۶

چکیده

مقدمه: آزوسپریلوم یکی از انواع میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی است که در همیاری با ریشه گیاهان تیره غلات و گرامینه‌های دیگر، رشد و نمو آن‌ها را تقویت می‌کند. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر باکتری آزوسپریلوم ایراکنز (*Azospirillum irakense*) به همراه تیمار هورمون‌های اکسین (IAA) و یا جیبرلین (GA3) بر برخی شاخص‌های رشد و بیوشیمیایی در گیاهچه‌های برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa cv.hashemi*) و مشاهده روند کلونیزاسیون باکتری در سلول‌های ریشه است.

روش‌ها: به این منظور ریشه گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج پس از تلقیح با آزوسپریلوم با غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ ppm IAA و GA3 به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر (۲۰۰ ppm IAA + ۲۰۰ ppm GA3) به مدت ۴ هفته تیمار شدند.

یافته‌ها: روند کلونیزاسیون باکتری شامل تشکیل زیست‌لایه، اضمحلال دیواره، ورود باکتری به داخل لایه ی پوست ریشه و تشکیل کلنی‌های منفرد و پراکنده است. وزن خشک و تر ریشه و اندام هوایی، وزن خشک و تر کل و سرعت رشد نسبی در نمونه‌های تلقیح‌شده که با هورمون‌ها نیز تیمار شده بودند، افزایش معنی‌داری یافت که این افزایش بخصوص در تیمار ترکیبی هورمون اکسین و جیبرلین قابل توجه بوده است. هم‌چنین نتایج نشان داد که محتوای پراکسید هیدروژن در ریشه، پروتئین و قند محلول و فسفر در اندام هوایی و ریشه گیاهچه‌های تیمارشده به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یافته است.

نتیجه‌گیری: باتوجه به نتایج حاضر، کاربرد باکتری *A. irakense* به همراه غلظت ترکیبی هورمون‌ها برای افزایش عملکرد و رشد گیاهچه‌های برنج موثر است.

کلیدواژه‌ها: آزوسپریلوم، اضمحلال دیواره سلولی، اکسین، برنج، جیبرلین، شاخص‌های رشد

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) یکی از مهم ترین و قدیمی ترین محصولات زراعی در دنیا به ویژه آسیا است که سطح وسیعی از زمین های قابل کشت جهان را به خود اختصاص داده و غذای بیش از نیمی از مردم دنیا را تشکیل می دهد [1]. سطح زیر کشت برنج در ایران تقریباً ۵۰۰ هزار هکتار برآورد شده است که بخش عمده آن در دو استان شمالی کشور یعنی مازندران و گیلان قرار دارد [2].

یکی از مهم ترین راه های افزایش عملکرد محصولات زراعی تغذیه مناسب گیاهان است. در سال های اخیر استفاده از تکنیک های جدید مانند تلقیح گیاهان زراعی با انواع باکتری های محرک رشد مانند باسیلوس (*Bacillus*)، سودوموناس (*Pseudomonas*)، آرتروباکتر (*Arthrobacter*)، نیتروزوموناس (*Nitrosomonas*)، ریزوبیوم (*Rhizobium*)، ازتوباکتر (*Azotobacter*) و آزوسپریلوم (*Azospirillum*) نتایج قابل توجهی را در بهبود رشد و نمو گیاهان نشان داده است [3].

آزوسپریلوم ها گروهی از باکتری های هتروتروف و غیرهوازی هستند که اغلب در اطراف ریشه گیاهان گرامینه دیده می شوند [4]. مطالعات انجام شده نشان داد که این باکتری نقش مهمی در تولید هورمون های گیاهی مانند اکسین، جیبرلین، سیتوکینین و اتیلن [5]، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن [6]، افزایش جذب آب و مواد غذایی [7]، افزایش تحرک و حلالیت عناصر غذایی به ویژه فسفر و کنترل زیستی عوامل بیماری زای گیاهی دارد [8]، [9]، [10]، [11]، [12]. نتایج تحقیقات White و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان داده که تلقیح گیاه برنج با *A. lipoferum* سبب افزایش طول ریشه و تولید تنظیم کننده های گیاهی می شود [11]. از طرفی دیگر تلقیح گندم با *A. lipoferum* تشکیل ریشه های جانبی و تارهای کشنده را تحت تأثیر قرار داده است [12].

باکتری ها طی فرآیندی به نام چرخه ریزوفاژی (تغذیه ی ریشه ای) بین فاز آزاد اطراف ریشه و فاز وابسته به گیاه جا به جا می شوند. در طی این چرخه، باکتری ها مواد مغذی را از محیط اطراف ریشه جذب کرده و سپس در محلی که ترکیبات قندی و پروتئینی از سطح ریشه ترشح می شود، اسقرار می یابند. باکتری ها با تغذیه ترشحات ریشه رشد کرده و زیست لایه (Biofilm) را تشکیل می دهند و پس از آن به درون سلول های گیاهی وارد می شوند. با ورود باکتری، سطح رادیکال های اکسیژن در گیاه تحت تنش زیستی بالا می رود. رادیکال های آزاد سبب تخریب برخی از باکتری ها شده و به این ترتیب مواد مغذی جذب شده توسط باکتری به درون سلول آزاد می شود. اما گروه دیگری از باکتری های که سالم باقی ماندند، کلنی تشکیل می دهند. در بین انواع باکتری های محرک رشد، گروهی که قابلیت کلونیزاسیون را دارا هستند اثر مثبتی را بر گیاه میزبان نشان می دهند [13]، [11]. به عنوان مثال نوستوک که کلونیزاسیون ضعیفی را در داخل سلول های ریشه گیاه برنج پدید می آورد، تغییر مثبت و معنی داری را بر رشد این گیاه ایجاد کرده و به همین علت محققان این باکتری را برای همزیستی با گیاه برنج مناسب تشخیص ندادند [14].

با وجود اثرات قابل توجه آزوسپریلوم بر رشد و نمو گیاهان، مکانیسم ورود آن ها به درون سلول های گیاهی چندان شناخته شده نبوده و در این خصوص فرضیه های متعددی گزارش شده است. برخی از محققان معتقدند که دیواره سلولی در نوک تار کشنده ریشه نقطه کلیدی برای ورود باکتری ها به داخل گیاه است [15]. گزارش دیگری نیز نشان داده که باکتری ها با ایجاد منفذ در دیواره سلولی به درون سلول راه می یابند [16]. گروه دیگری از پژوهشگران محل خروج ریشه های جانبی را نقطه ورود باکتری ها به درون گیاه می دانند [1]. اما برخی از محققان عامل ورود باکتری به درون گیاهان را شکافته شدن دیواره سلول های اپیدرمی گزارش کردند [17]. نظریه White و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ نشان می دهد که باکتری ها به طریق اندوسیتوز به درون سلول ریشه راه می یابند. ضمناً غلظت خاصی از اسیدهای چرب با زنجیر کوتاه (حاصل تخمیر ترشحات ریشه توسط باکتری ها) در ورود باکتری ها نقش دارند. اسیدهای چرب به صورت فعال توسط سلول ریشه جذب شده و در این فرآیند به عنوان عامل محرک ریزوفاژی در ورود باکتری به داخل سلول های ریشه موثر است [11].

هورمون های گیاهی متعددی در تشکیل و اصلاح دیواره سلولی شرکت می کنند که از مهم ترین آن ها می توان به ایندول استیک اسید (IAA) و جیبرلیک اسید (GA3) اشاره کرد. تعامل بین IAA و GA3 نشان می دهد که IAA با افزایش فعالیت آنزیم GA20 3-oxidase، و نیز با کاهش فعالیت GA20 2-oxidase، تولید GA را افزایش می دهد و از اینرو در خزش (creep) و توسعه پذیری دیواره سلولی نقش دارند. از طرف دیگر، این هورمون ها فعالیت آنزیم های لیتیک دیواره سلولی را افزایش می دهند که با شکافت

برخی از پیوندهای ضروری در ساختمان پلی ساکاریدها، موجب اضمحلال آن می شوند [11]. پژوهشگران در مطالعه ای گزارش کردند که کاربرد توام هورمون های IAA و GA3 سبب افزایش فعالیت گلیکوزیدازهای دیواره سلولی در سلول های میان گره گیاه *Merremia emarginata* می شود [18].

از آنجا که آزوسپریلوم ها یکی از بزرگترین و رایجترین گروه های باکتری اندوفیت در برقراری رابطه ی همزیستی هستند، این احتمال وجود دارد که گونه های *A. irakense* مستعد ایجاد ارتباط با گیاه برنج بوده و بتواند در افزایش رشد و عملکرد آن موثر باشد. تاکنون از *A. irakense* به عنوان همزیست در گیاهان زراعی استفاده نشده است. در تحقیق حاضر برای اولین بار، اثر تلقیح این گونه بر گیاه برنج مورد مطالعه قرار گرفته است. در این مطالعه روند ورود باکتری به داخل سلول گیاه و جایگاه استقرار و کلونیزاسیون آن و نیز اثر آن بر برخی شاخص های رشد و فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج تحقیق حاضر می تواند به معرفی یک گونه ی جدید سازگار و متناسب با گیاه برنج منجر شود. از طرفی دیگر با استفاده از داده های حاضر می توان فرمول مناسبی از ترکیب سوسپانسیون باکتری و هورمون گیاهی را به عنوان کود بیولوژیک برای افزایش رشد و عملکرد ارقام زراعی معرفی کرد.

مواد و روش ها

نمونه های گیاهی، تلقیح باکتریایی و تیمار هورمونی

باکتری *A. irakense* از آزمایشگاه بیولوژی خاک بخش تحقیقات خاک و آب مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان گلستان تهیه و کشت شدند. به این منظور، باکتری ها از یک کلنی منفرد از روی محیط اختصاصی RC جامد برداشت شده و برای خالص سازی در یک محیط کشت مایع Nfb، در انکوباتور (۳۰ درجه سانتی گراد) رشد داده شد. پس از ۴۸ ساعت، سلول های باکتری به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ (۵۰۰۰ ×g) شدند. محلول رویی حذف و توده ی باکتری با بافر فسفات نمکی دو بار شست و شو شده و مجدداً توده باکتری سانتریفوژ شد. سپس با افزودن بافر فسفات به توده باکتری جذب نوری محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱/۰۵ تنظیم شد. در این حال غلظت 10^9 cfu/mL است که با رقیق کردن پی در پی این محیط، غلظت 10^6 cfu/mL به دست آمد. برای اطمینان، رقت هایی از غلظت های فوق تهیه شد و بر روی محیط کشت RC کشت شدند. شمارش کلنی و ضرب تعداد آن در ضرب رقت، غلظت 10^6 cfu/mL را تایید کرد.

بذر برنج هاشمی (*O. sativa cv.hashemi*) از موسسه بین المللی تحقیقات برنج ایران (آمل) تهیه شد. سپس بذرها را با هیپوکلریت سدیم (NaOCl) ۳ درصد به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ ثانیه با اتانول ۹۶ درصد به خوبی ضدعفونی شدند. در ادامه بذرها ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو شده و سپس بر روی کاغذ صافی مرطوب در دمای ۲۹ درجه سانتی گراد قرار گرفتند تا جوانه زنی صورت گیرد. پس از انتقال گیاهچه های ۷ روزه به محیط کشت یوشیدا [19]، نمونه ها به اتاق کشت با درجه حرارت حداقل و حداکثر در شب و روز به ترتیب ۲۲ و ۳۳ درجه سانتی گراد با رطوبت نسبی ۷۱ درصد به مدت ۲ هفته انتقال یافتند.

ریشه ی گیاهچه های ۲۱ روزه برنج در محیط کشت یوشیدا با محلول سوسپانسیون باکتریایی حاوی غلظت ppm ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ اکسین (IAA) و جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا ترکیبی از هر دو (۲۰۰ ppm IAA + ۲۰۰ ppm GA3) تیمار شدند. محلول های سوسپانسیون باکتریایی (۱/۱۰، حجمی/حجمی) به محیط یوشیدا اضافه شد. پس از چهار هفته تیمار، گیاهچه ها برداشت شده و شاخص های رشد و بیوشیمیایی مورد مطالعه قرار گرفتند.

مشاهده میکروسکوپی

برای مشاهده روند کلونیزاسیون باکتری، رنگ آمیزی ساده آنیلین بلو (Aniline blue) انجام شد. ابتدا نمونه های ریشه به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر قرار گرفته و سپس با آنیلین بلو ۰/۰۵ غلظت به مدت ۳-۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از سه بار شست و شو با آب مقطر، نمونه ها با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتالی (BH2, Olympus, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰× مورد بررسی و عکس برداری شدند.

اندازه گیری وزن خشک و تر نمونه ها

برای تعیین وزن تر، نمونه ها با ترازو توزین شدند. برای تعیین وزن خشک، نمونه ها در آون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز خشک شده و مجدداً با ترازو توزین شدند.

اندازه گیری سرعت رشد نسبی

سرعت رشد نسبی گیاه بر اساس مقدار وزن خشک کل در روز و با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (۱).

$$RGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (T_2 - T_1) \quad (\text{معادله ۱})$$

که در آن PGR سرعت رشد نسبی، W_2 وزن خشک نهایی پس از اتمام تیمار، W_1 وزن خشک گیاه پس از یک روز تیمار و T نشان دهنده تعداد روزهای بعد از تیمار (T_1 و T_2 به ترتیب ۱ و ۲۸ روز بعد از تیمار) است.

استخراج و اندازه گیری قندهای محلول

اندازه گیری قند محلول به روش فنل اسید سولفوریک [20] انجام شد. به این منظور مقدار ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی را در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد ریخته و در یخچال نگهداری شد و پس از یک هفته از بخش رویی جهت سنجش قندهای محلول استفاده شد. سپس ۱ میلی لیتر فنل ۵ درصد به ۱۰۰ میکرولیتر محلول عصاره افزوده و خوب بهم زده شد. در گام بعدی ۵ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ به محلول اضافه شد. میزان جذب نور در طول موج ۴۸۵ نانومتر و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر Shimadzu مدل UV-1600 نانومتر خوانده شد. در نهایت داده ها بر اساس میلی گرم گلوکز بر گرم وزن خشک گیاه بیان شد.

استخراج و اندازه گیری پروتئین محلول

استخراج و اندازه گیری پروتئین های محلول با استفاده از روش برادفورد انجام شد [21]. جهت انجام عمل استخراج مقدار ۰/۱ گرم از نمونه گیاهی با ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۶/۸ هموزن شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در $13000 \times g$ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. روشناور به دست آمده برای اندازه گیری مقدار پروتئین های محلول مورد استفاده قرار گرفت. به منظور رسم نمودار استاندارد پروتئین های محلول، مقدار ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول مادر آلومین (۱۰ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر آب) را در لوله آزمایش ریخته و سپس توسط آب مقطر حجم آن ها به ۱۰۰ میکرولیتر رسید. به غلظت های بدست آمده ۵ میلی لیتر محلول برادفورد اضافه شد و بعد از ورتکس کردن و انکوبه شدن در تاریکی به مدت ۲۰ دقیقه، میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

استخراج و اندازه گیری مقدار فسفر

برای استخراج عنصر فسفر از روش هضم (با استفاده از اسید نیتریک ۶۵ درصد انجام شد) و اندازه گیری مقدار آن با استفاده از محلول آمونیوم وانادات انجام شد [22]. در نهایت مقدار فسفات بر اساس میلی گرم مقدار فسفر در گرم وزن خشک نمونه ها محاسبه شد.

برای تهیه محلول استاندارد یک میلی مولار فسفات، مقدار ۱/۳۶۰۹ گرم KH_2PO_4 در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. برای ایجاد محلول های ۰، ۱، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ میکرومولار فسفات، به ترتیب مقادیر ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول پایه ی فسفات به ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. در نهایت مقدار فسفات بر اساس میلی گرم مقدار فسفر در گرم وزن خشک نمونه ها محاسبه شد.

استخراج و اندازه گیری مقدار پراکسید هیدروژن

اندازه گیری پراکسید هیدروژن به روش سرگیو و همکاران صورت گرفت [23]. به این منظور، مقدار ۰/۰۵ گرم از نمونه ی تر گیاهی با ۱ میلی لیتر اسیدتری کلرواستیک ۰/۱ درصد عصاره گیری و محلول به دست آمده در $13000 \times g$ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. برای تعیین مقدار پراکسید هیدروژن، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از روشناور عصاره به ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار با pH ۷ اضافه شد. سپس یک میلی لیتر مخلوط پدید پتاسیم ۱ مولار در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی مولار به آن اضافه شد. پس از گذشت یک ساعت ترکیب رنگی تشکیل شده به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای رسم نمودار استاندارد پراکسید هیدروژن از محلول مادر ۱ میلی مولار پراکسید هیدروژن استفاده شد.

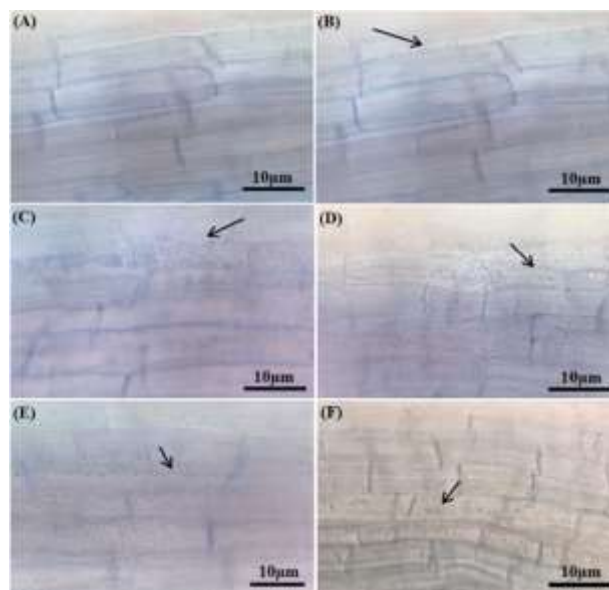
آنالیزهای آماری

آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel و SAS و از آزمون LSD برای ارزیابی تفاوت‌ها در $P \leq 0.05$ و $P \leq 0.01$ استفاده شد.

نتایج و بحث

مشاهدات میکروسکوپی

نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی جهت بررسی روند کلونیزاسیون نشان داد که ابتدا باکتری‌ها در سطح لایه ی اپیدرم ریشه مستقر شده و زیست لایه را تشکیل می دهند که می تواند مرحله آغازی برای ورود به سلول‌های ریشه باشد (شکل A ۱). در مرحله بعد، اضمحلال (فرسایش و شکافت) سلول‌های لایه ی اپیدرمی توسط باکتری‌ها مشاهده شد (شکل B و C ۱). پس از آن باکتری‌ها به درون سلول‌های ریشه راه یافتند (شکل D ۱). پس از عبور از لایه اپیدرم، باکتری‌ها به لایه پارانشیم نفوذ کرده و کلنی تشکیل دادند (شکل E ۱). در نهایت کلنی‌های کوچک و بزرگ و با آرایش منفرد و پراکنده از باکتری‌ها در سلول‌های ریشه مشاهده شد (شکل F ۱).

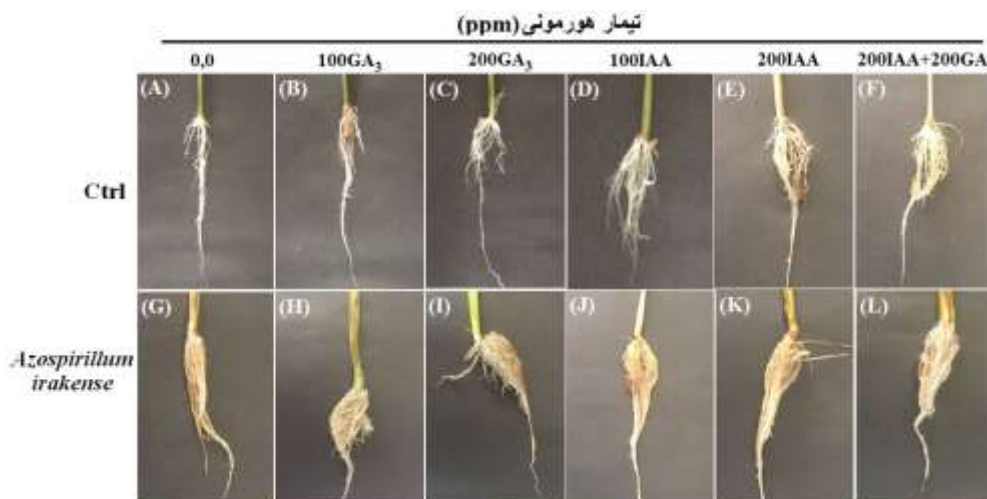


شکل ۱- روند کلونیزاسیون باکتری (*A. irakense*) در ریشه گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv. hashemi*). سلول‌های ریشه ی گیاهچه‌های برنج قبل از تلقیح با باکتری (A)، استقرار باکتری‌ها در سطح اپیدرم ریشه (B)، اضمحلال دیواره سلول‌های اپیدرم (C)، ورود باکتری به داخل سلول ریشه (D)، استقرار باکتری در لایه پارانشیم ریشه و شروع تشکیل کلنی (E)، کلنی‌های منفرد و پراکنده باکتری در داخل سلول‌های ریشه (F). (فلش‌های سیاه نشان‌دهنده کلنی‌های باکتری؛ رنگ آمیزی توسط آبی آنیلین؛ بزرگنمایی $\times 100$)

Figure 1- Colonization process of *A. irakense* in the roots of 21-days-old rice (*O. sativa cv. Hashemi*) seedlings. Root cells of rice seedlings before inoculation with bacteria (A). Establishment of bacteria on the surface of root epidermis (B). Destruction of the epidermal cell wall (C). Entry of bacteria into the root cell (D). Establishment of bacteria in the root dermal layer and the beginning of colony formation (E). Single and scattered colonies of bacteria inside root cells (F). (Black arrows indicate bacterial colonies; staining by aniline blue; magnification $\times 100$)

اثر آزوسپریلوم بر مورفولوژی ریشه

بررسی های انجام شده بر روی مورفولوژی ریشه ها نشان داد که تلقیح گیاهچه های با باکتری *A. irakense* سبب افزایش بیشتر تعداد ریشه ها در مقایسه با نمونه شاهد شده است. از طرفی دیگر تیمار گیاهچه ها با غلظت های مختلف هورمون اکسین و یا جیبرلین (در گیاهچه های تلقیح نشده) نیز سبب افزایش تعداد ریشه ها و رشد بیشتر آن ها در مقایسه با نمونه شاهد شده است. بیشترین افزایش رشد ریشه در نمونه های تلقیح شده با *A. irakense* به همراه تیمار ترکیبی دو هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شده است (شکل ۲).



شکل ۲- ریشه گیاهچه های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv. hashemi*) در تیمار با غلظت های مختلف اکسین (IAA) و جیبرلین (GA3) (A-F) و یا به همراه تلقیح با (*A. irakense*) (G-L) (غلظت در شکل در تیمار هر دو هورمون مشخص شد)

Figure 2- The roots of rice (*O. sativa cv. Hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) (A-F) and or in combinations with *A. irakense* inoculation (G-L)

اثر تلقیح باکتری و تیمار هورمون بر فاکتورهای رشد

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که اثر فاکتورهای تلقیح، نوع هورمون و غلظت هورمون و نیز اثر متقابل تلقیح × غلظت هورمون، اثر متقابل تلقیح × نوع هورمون، اثر متقابل نوع هورمون × غلظت هورمون، اثر متقابل تلقیح × غلظت هورمون × نوع هورمون بر تمامی فاکتورهای رشد مورد بررسی معنی دار است (جدول ۱).

بررسی اثر تلقیح باکتریایی بر روی فاکتورهای رشد نشان داد که تلقیح گیاهچه های برنج با باکتری *A. irakense* سبب افزایش معنی دار وزن خشک و تر ریشه، بخش هوایی و کل گیاهچه های برنج در مقایسه با نمونه های شاهد شده است. در بین گیاهچه هایی که با غلظت های مختلف هورمون اکسین و جیبرلین (به همراه تلقیح باکتریایی) تیمار شده بودند، تفاوت معنی داری بین نمونه های تیمار شده با جیبرلین در مقایسه با اکسین مشاهده شده است. این نتایج نشان داد که وزن خشک، وزن تر و وزن کل در گیاهچه های تیمار شده با جیبرلین بالاتر از گیاهچه های تیمار شده با اکسین بود. از طرفی دیگر بالاترین مقدار وزن خشک، وزن تر و وزن کل در گیاهچه هایی مشاهده شد که علاوه بر تلقیح باکتریایی تحت تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین نیز قرار گرفته بودند (جدول ۲).

همچنین نتایج حاضر نشان داد که در طی چهار هفته تیمار، رشد نسبی (بر حسب گرم وزن تر در روز) گیاهچه های تلقیح شده با *A. irakense* در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری یافته است. داده های حاضر نشان داد که تیمار گیاهچه ها با هورمون جیبرلین سبب افزایش معنی دار رشد نسبی گیاهچه ها در مقایسه با تیمار اکسین شده است. نتایج حاصل نشان داد که بالاترین رشد نسبی در گیاهچه های تلقیح شده با *A. irakense* در تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین مشاهده می شود (جدول ۲).

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اندازه‌گیری شاخص‌های رشد در گیاهچه‌های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv. hashemi*) در تیمار با غلظت‌های مختلف اکسین (IAA) و جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا به همراه تلقیح با *A. irakense*

Table 1- Analysis of variance of growth parameters in rice (*O. sativa cv. Hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) and or in combinations with *A. irakense* inoculation

Parameters	df	Dry weight (aerial part)	Fresh weight (aerial part)	Dry weight (root)	Fresh weight (root)	Dry weight (total)	Fresh weight (total)	Relative growth
Inoculation	1	744.90*	380.20**	82.09**	81.28**	840.02*	326.15**	5650.58**
Hormone type	1	176.80**	712.98*	323.83**	122.53*	528.70**	1856.25*	834.65*
Hormone concentration	5	189.24**	63.43*	66.98*	79.51*	468.25**	206.57*	383.31**
Inoculation* Hormone type	1	414.3*	44.92*	38.80**	265.15*	119.3**	87.047*	124.67*
Inoculation* Hormone concentration	5	305.2*	717.12**	238.56**	98.26*	381.26**	516.31*	344.02*
Hormone type* Hormone concentration	5	43.7**	629.02**	108.09**	67.73*	660.11**	186.74*	156.30**
Inoculation* Hormone type* Hormone concentration	5	81.11**	308.56**	54.06*	101.52*	588.80**	93.80*	1748.27*
Error	32	13.65	33.15	21.14	712.59	37.32	402.22	12.87

**و* به ترتیب در سطح احتمال $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.05$ معنی‌دار است.

**Significant at $P \leq 0.01$; *Significant at $P \leq 0.05$.

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات رشد در گیاهچه‌های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv. hashemi*) در تیمار با غلظت‌های مختلف اکسین (IAA) و یا جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا به همراه تلقیح با (*A. irakense*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار می‌باشد. هر ردیف نشان‌دهنده میانگین داده‌ها \pm انحراف معیار است. حروف متفاوت در هر ردیف (هر شاخص رشد) نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون LSD است. NI: گیاه تلقیح نشده، AI: گیاهان تلقیح شده با باکتری *A. irakense*; Ctrl: گیاه شاهد بدون تیمار هورمونی،

GA3+IAA: تیمار با هردو هورمون در غلظت ۲۰۰ ppm

Table 2- Comparison of average growth parameters of rice (*O. sativa cv. hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) and or in combinations with *A. irakense* inoculation. The results are the average of 3 replicates. Each row indicated data average \pm standard deviation. Different letters in each row (each indicator growth) show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. NI (non-inoculated plant), AI: (plants treated with *A. irakense*), Ctrl (without hormone treatment), GA3+IAA (both hormones, each 200 ppm)

Growth indicators	Treatments under study						
	Inoculation	Ctrl	IAA (100ppm)	IAA (200ppm)	GA ₃ (100ppm)	GA ₃ (200ppm)	GA ₃ +IAA
Fresh weight (root)(gr)	NI	4.11 \pm 0.36 ^k	5.21 \pm 0.21 ^g	5.46 \pm 0.36 ^f	4.42 \pm 0.18 ^j	4.98 \pm 0.34 ^h	5.89 \pm 0.15 ^d
	AI	4.76 \pm 0.21 ⁱ	5.01 \pm 0.54 ^h	5.70 \pm 0.14 ^e	6.01 \pm 0.11 ^c	6.33 \pm 0.26 ^b	6.60 \pm 0.33 ^a
Fresh weight (aerial part)(gr)	NI	3.27 \pm 0.46 ^l	3.83 \pm 0.21 ^k	4.36 \pm 0.18 ^j	5.19 \pm 0.31 ^h	5.75 \pm 0.28 ^e	6.03 \pm 0.11 ^d
	AI	4.61 \pm 0.24 ⁱ	5.23 \pm 0.36 ^g	5.48 \pm 0.46 ^f	6.53 \pm 0.16 ^c	7.12 \pm 0.22 ^b	7.84 \pm 0.3 ^a
Dry weight (root)(gr)	NI	0.24 \pm 0.07 ^k	0.42 \pm 0.17 ^g	0.51 \pm 0.60 ^f	0.28 \pm 0.012 ^j	0.34 \pm 0.05 ⁱ	0.58 \pm 0.09 ^e
	AI	0.39 \pm 0.07 ^h	0.53 \pm 0.018 ^f	0.69 \pm 0.03 ^d	0.77 \pm 0.021 ^c	0.85 \pm 0.014 ^b	0.94 \pm 0.016 ^a
Dry weight (aerial part)(gr)	NI	0.74 \pm 0.08 ^j	1.18 \pm 0.02 ⁱ	1.25 \pm 0.04 ^h	1.37 \pm 0.07 ^g	1.47 \pm 0.3 ^f	1.56 \pm 0.07 ^e
	AI	1.38 \pm 0.05 ^g	1.46 \pm 0.12 ^f	1.64 \pm 0.09 ^d	1.88 \pm 0.06 ^c	2.11 \pm 0.08 ^b	2.7 \pm 0.012 ^a
Dry weight (total)(gr)	NI	0.98 \pm 0.012 ^k	1.6 \pm 0.003 ^j	1.76 \pm 0.019 ^h	1.65 \pm 0.005 ⁱ	1.81 \pm 0.012 ^g	2.14 \pm 0.004 ^e
	AI	1.77 \pm 0.009 ^h	1.99 \pm 0.004 ^f	2.33 \pm 0.008 ^d	2.65 \pm 0.07 ^c	2.96 \pm 0.05 ^b	3.64 \pm 0.017 ^a
Fresh weight (total)(gr)	NI	7.38 \pm 0.11 ^l	9.04 \pm 0.11 ^k	9.82 \pm 0.04 ^h	9.61 \pm 0.024 ⁱ	10.73 \pm 0.43 ^f	11.92 \pm 0.012 ^d
	AI	9.37 \pm 0.31 ^j	10.24 \pm 0.08 ^g	11.18 \pm 0.17 ^e	12.54 \pm 0.4 ^c	13.45 \pm 0.027 ^b	14.44 \pm 0.36 ^a
Relative growth (gr/T)	NI	0.08 \pm 0.06 ^l	0.16 \pm 0.008 ^k	0.20 \pm 0.06 ^j	0.28 \pm 0.07 ^h	0.35 \pm 0.016 ^f	0.45 \pm 0.02 ^d
	AI	0.24 \pm 0.08 ⁱ	0.31 \pm 0.01 ^g	0.40 \pm 0.017 ^e	0.51 \pm 0.05 ^c	0.59 \pm 0.08 ^b	0.63 \pm 0.014 ^a

ارزیابی میانگین داده‌های رشد نشان داد که وزن تر و خشک بخش هوایی گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری *A. irakense* در مقایسه با گیاهچه‌های شاهد، افزایش معنی‌داری یافته است. نتایج حاصل نشان داد که بالاترین مقدار وزن تر و خشک در گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری و در تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین دیده شده است (جدول ۲).

اثر تلقیح باکتری و تیمار هورمونی بر فاکتورهای بیوشیمیایی

آنالیز واریانس فاکتورهای بیوشیمیایی مورد بررسی نشان داد که اثر فاکتورهای تلقیح، نوع هورمون و غلظت هورمون و نیز اثر متقابل تلقیح × غلظت هورمون، اثر متقابل تلقیح × نوع هورمون، اثر متقابل نوع هورمون × غلظت هورمون، اثر متقابل تلقیح × غلظت هورمون × نوع هورمون بر مقدار پراکسید هیدروژن ریشه، فسفر و پروتئین و قند محلول ریشه و اندام هوایی مثبت و معنی دار است (جدول ۳).

جدول ۳- تجزیه واریانس داده های حاصل از سنجش مقدار پراکسید هیدروژن در ریشه و قند محلول، پروتئین محلول و فسفر در اندام هوایی و ریشه گیاهچه های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv. hashemi*) در تیمار با غلظت های مختلف اکسین (IAA) و یا جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا به همراه تلقیح با *A. irakense*

Table 3- Analysis of variance of data obtained from the measurement of hydrogen peroxide in root, soluble sugar, soluble protein and phosphorus in the aerial parts and roots of rice (*Oryza sativa cv. Hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) and or in combinations with *A. irakense* inoculation

Parameters	df	soluble sugar (aerial part)	soluble sugar (root)	Soluble protein (aerial part)	Soluble protein (root)	Phosphorus (aerial part)	Phosphorus (root)	Hydrogen peroxide (root)
Inoculation	1	523.10*	734.33*	624.03**	323.55*	28.06*	480.79**	131.06*
Hormone type	1	2263.18*	254.63*	714.24*	272.98**	648.91**	167.10*	452.19*
Hormone concentration	5	17.32**	229.42*	6571.12*	87.43**	96.1073*	25.16*	386.33**
Inoculation* Hormone type	1	36.44**	118.7*	50.74**	139.04**	907.1**	291.72*	73.86*
Inoculation* Hormone concentration	5	882.41*	509.019**	392.38*	14.548*	320.50*	17.80**	652.02*
Hormone type* Hormone concentration	5	165.17*	194.26*	25.40**	201.37*	135.066**	220.3*	339.75**
Inoculation* Hormone type* Hormone concentration	5	469.43*	56.24**	67.80*	417.17*	83.22*	56.26**	126.97*
Error	17	19.98	31.58	215.11	118.2	43.56	97.20	106.20

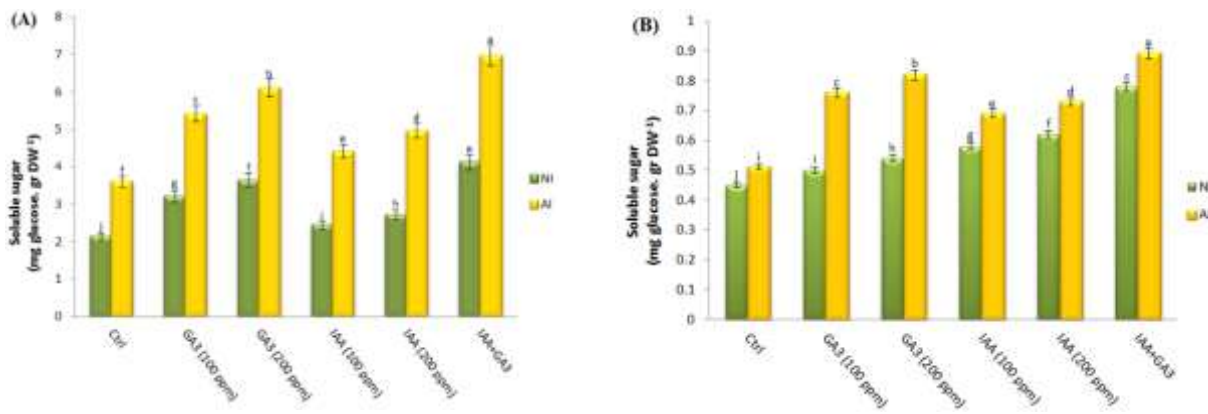
**و* به ترتیب در سطح احتمال $P \leq 0.01$ و $P \leq 0.05$ معنی دار است.

**Significant at $P \leq 0.01$; *Significant at $P \leq 0.05$.

داده های حاضر نشان داد که تلقیح گیاهچه ها با باکتری *A. irakense* سبب افزایش قند محلول اندام هوایی و ریشه در مقایسه با نمونه شاهد شده است. از طرفی دیگر در گیاهچه های تلقیح نشده، مقدار قند محلول اندام هوایی و ریشه در تیمار جیبرلین افزایش معنی داری در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد. بالاترین مقدار قند محلول در دو بخش هوایی و ریشه در گیاهچه های تلقیح شده و در تیمار با دو هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۳).

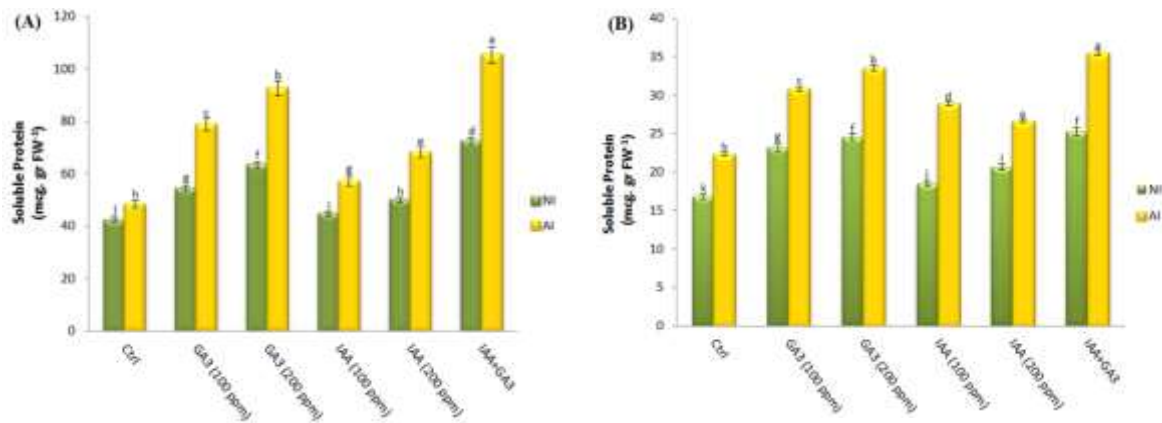
آنالیز داده های حاصل نشان داد که مقدار پروتئین های محلول اندام هوایی و ریشه در گیاهچه های تلقیح شده با *A. irakense* نسبت به شاهد افزایش معنی داری یافته است. از طرف دیگر مقدار پروتئین محلول اندام هوایی و ریشه گیاهچه های تلقیح شده و تلقیح نشده تحت تیمار هورمونی جیبرلین ۴۰-۳۰ درصد و اکسین ۲۰-۱۰ درصد در مقایسه با نمونه شاهد افزایش داشته است. بالاترین مقدار پروتئین محلول در گیاهچه های تلقیح شده و تلقیح نشده، در تیمار با هر دو هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۴).

از طرفی دیگر بررسی میانگین داده های حاصل از اثر تلقیح باکتری به همراه تیمار هورمونی بر روی مقدار فسفر اندام هوایی و ریشه گیاهچه ها نشان داد که تفاوت معنی داری بین انواع تیمارها وجود دارد. محتوای فسفر در گیاهچه های تلقیح شده با باکتری *A. irakense* به طور معنی داری بالاتر از نمونه های شاهد بوده است. همچنین این نتایج نشان داد که تیمار جیبرلین سبب افزایش معنی دار در مقدار فسفر اندام هوایی و ریشه در گیاهچه های تلقیح شده در مقایسه با تیمار با غلظت های مختلف هورمون اکسین شده است. بیشترین محتوای فسفر در گیاهچه های تلقیح شده و در تیمار با هر دو هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۳- مقدار قند محلول در (A) اندام هوایی و (B) ریشه گیاهچه های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv.hashemi*) در تیمار با غلظت های مختلف اکسین (IAA) و جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا به همراه تلقیح با (*A. irakense*) نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون LSD است. NI: گیاه تلقیح نشده، AI: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. irakense*: گیاه شاهد بدون تیمار هورمونی، GA3+IAA: تیمار با هردو هورمون در غلظت ۲۰۰ ppm

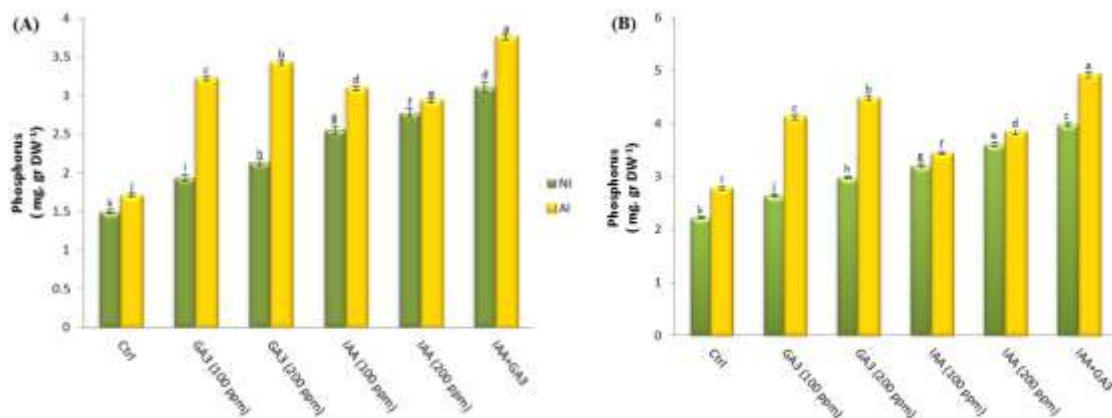
Figure 3- The amount of soluble sugar in (A) aerial parts and (B) roots of rice (*O. sativa cv. Hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) and or in combinations with *A. irakense* inoculation. The results are the average of 3 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. NI (non-inoculated plant), AI: (plants treated with *A. irakense*), Ctrl (without hormone treatment), GA3+IAA (both hormones, each 200 ppm)



شکل ۴- مقدار پروتئین محلول در (A) اندام هوایی و (B) ریشه گیاهچه های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv.hashemi*) در تیمار با غلظت های مختلف اکسین (IAA) و جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا به همراه تلقیح با (*A. irakense*) نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون LSD است. NI: گیاه تلقیح نشده، AI: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. irakense*: گیاه شاهد بدون تیمار هورمونی، GA3+IAA: تیمار با هردو هورمون در غلظت ۲۰۰ ppm

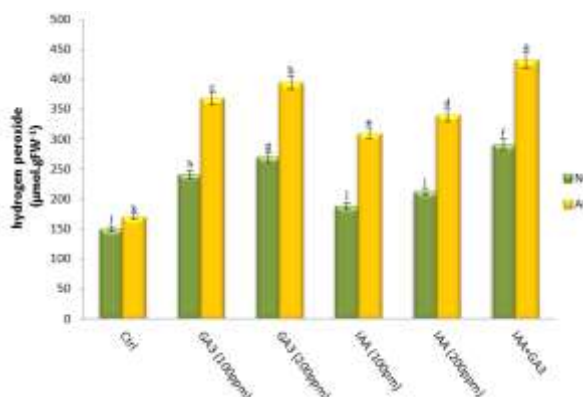
Figure 4- The amount of soluble protein in (A) aerial parts and (B) roots of rice (*O. sativa cv. Hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) and or in combinations with *A. irakense* inoculation. The results are the average of 3 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. NI (non-inoculated plant), AI: (plants treated with *A. irakense*), Ctrl (without hormone treatment), GA3+IAA (both hormones, each 200 ppm)

همچنین داده های حاصل از اندازه گیری پراکسید هیدروژن نشان داد که مقدار این ترکیب در گیاهچه های تلقیح شده با آزوسپریلوم ایراکنز افزایش معنی داری نسبت به شاهد یافته است. نتایج حاصل نشان داد که تیمار جیبرلین سبب افزایش معنی دار در مقدار پراکسید هیدروژن در گیاهچه های تلقیح شده و تلقیح نشده در مقایسه با اکسین شده است. بالاترین مقدار این ترکیب در گیاهچه های تلقیح شده و در تیمار ترکیبی هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۵- محتوی فسفر در (A) اندام هوایی و (B) ریشه گیاهچه های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv. hashemi*) در تیمار با غلظت های مختلف اکسین (IAA) و جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا به همراه تلقیح با (*A. irakense*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون LSD است. NI: گیاه تلقیح نشده، AI: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. irakense*: گیاه شاهد بدون تیمار هورمونی، GA3+IAA: تیمار با هر دو هورمون در غلظت ۲۰۰ ppm

Figure 5- Phosphorus content in (A) aerial parts and (B) roots of rice (*O. sativa cv. Hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) and or in combinations with *A. irakense* inoculation. The results are the average of 3 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. NI (non-inoculated plant), AI: (plants treated with *A. irakense*), Ctrl (without hormone treatment), GA3+IAA (both hormones, each 200 ppm)



شکل ۶- مقدار پراکسید هیدروژن ریشه گیاهچه های برنج رقم هاشمی (*O. sativa cv. hashemi*) در تیمار با غلظت های مختلف اکسین (IAA) و جیبرلین (GA3) به تنهایی و یا به همراه تلقیح با (*A. irakense*). نتایج حاصل میانگین ۳ تکرار است. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار ($p < 0.05$) با توجه به آزمون LSD است. NI: گیاه تلقیح نشده، AI: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. irakense*: گیاه شاهد بدون تیمار هورمونی، GA3+IAA: تیمار با هر دو هورمون در غلظت ۲۰۰ ppm

Figure 6- Hydrogen peroxide content in roots of rice (*O. sativa cv. Hashemi*) seedlings treated with different concentrations of auxin (IAA) and gibberellin (GA3) and or in combinations with *A. irakense* inoculation. The results are the average of 3 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. NI (non-inoculated plant), AI: (plants treated with *A. irakense*), Ctrl (without hormone treatment), GA3+IAA (both hormones, each 200 ppm)

نتایج مطالعات میکروسکوپی در این تحقیق نشان داد که ورود باکتری با اضمحلال دیواره سلولی همراه بوده و در نهایت باکتری ها در داخل لایه پوست به شکل کلنی استقرار می یابند. به نظر می رسد که احتمالاً تلقیح باکتریایی در گیاهان با ایجاد انواع رادیکال های آزاد اکسیژن همراه بوده که سبب القاء تنش اکسیداتیو در گیاه می شود [24]. در شرایط طبیعی، پراکسید هیدروژن و رادیکال های آزاد اکسیژن در بخش های مختلف سلول های گیاه ایجاد می شوند [25]. اما از آنجا که در تلقیح گیاهان با باکتری، سلول های گیاهی بیشتر درگیر مکانسیم های مهم دخیل در اضمحلال دیواره سلولی خود هستند فرآیندهای سم زدایی احتمالاً به صورت ناقص انجام می گردد [26]. خنثی شدن ناقص رادیکال های آزاد اکسیژن و افزایش پراکسید هیدروژن در گیاه منجر به افزایش واکنش های فنتون و هابروایس می گردد که در طی آن رادیکال خطرناک هیدروکسیل تولید می شود و می تواند به صورت پی

در پی انواع ماکرومولکول‌های زیستی از جمله لیپیدها و پروتئین‌های دیواره سلولی تخریب کرده و به همین دلیل به هنگام ورود باکتری اضمحلال سلولی اتفاق می‌افتد [27]، [16]، [8]. همچنین احتمال می‌رود که تنش اکسیداتیو ناشی از تلقیح باکتریایی باعث افزایش پراکسیداسیون لیپید شود که در تخریب غشا و اضمحلال دیواره موثر می‌باشد. داده‌های حاضر نشان داده که تیمار گیاهچه‌های برنج با آزوسپریلوم سبب افزایش معنی‌دار مقدار پراکسید هیدروژن شده است.

اکسین و GA قوی‌ترین تسریع‌کننده‌های فرآیند اضمحلال دیواره بشمار می‌روند. زیرا این هورمون‌ها رشد ساقه، ریشه و تارهای کشنده را در غلظت‌های بهینه با شل کردن دیواره سلولی افزایش می‌دهند. این بررسی نقش اکسین و GA را در تنظیم رشد گیاهچه‌ها، با تمرکز بر نیاز اکسین و GA برای شروع اضمحلال دیواره و بر اساس غلظت بهینه توصیف می‌کند [28]. تصور می‌شود سطح هورمون‌ها در سلول ریشه گیاهچه‌های تحت تیمار با سه پارامتر قابل کنترل است: (۱) بیوسنتز از اسیدآمینو پیش‌ساز. (۲) افزایش هجوم باکتری به سلول (باکتری‌های آزوسپریلوم قادر به تولید هورمون‌ها اکسین و جیبرلین هستند). (۳) انتقال جریان به خارج از سلول (افزایش سطح پراکسید هیدروژن در فضای آپوپلاستی که همراه با اضمحلال دیواره سلولی است).

اکسین در فضای آپوپلاستیک توسط AUX1 (حامل هجوم اکسین) یا با نفوذ فیزیکیوشیمیایی (ترشحات باکتریایی) وارد سلول می‌شود. در سطح سلول، اکسین با ABPI (پروتئین اتصال اکسین) تعامل می‌کند و پروتون‌اکستروژن را افزایش می‌دهد. غلظت بالای پروتون در آپوپلاست باعث افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن مانند هیدروژن پراکسید شده که فاکتور اولیه و مهم در فرآیند اضمحلال دیواره سلولی است. افزایش سطح رادیکال‌های آزاد باعث تجزیه پروتئین‌های سرکوبگر مانند Aux/IAA توسط یک سیستم پروتازوم شده که می‌تواند ژن‌های پاسخ‌دهنده مسیر اضمحلال دیواره را فعال کنند [11]. به عبارت دیگر افزایش محتوای پراکسید هیدروژن به عنوان یک فاکتور مهم در علامت‌دهی به پروتئین‌های سرکوبگر با هدایت یوبیکوئیتین نقش دارند. تاکنون هیچ گیرنده یا حاملی برای GA شناسایی نشده. جیبرلین، پیام‌های سلولی را روی سطح دیواره سلولی یا داخل سلول ارسال می‌کند. رادیکال‌های آزاد مشابه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به طور طبیعی در مسیرهای متابولیسمی هورمون‌ها از جمله جیبرلین، در کلات‌کنندگی پروتئین‌های سرکوبگر ژن، مانند GAI و SLR به همراه موتیف DELLA با سیستم پروتازوم نقش مهمی ایفا می‌کنند. که موجب تجزیه پروتئین‌های سرکوبگر می‌شود. در مقابل، عملکردهای شناخته شده ژن‌های پاسخگو به این فرآیند، افزایش فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و سایر آنزیم‌های هیدرولیتیک در دیواره سلولی هستند [29]. در مطالعه حاضر تیمار با هر کدام از هورمون‌ها به تنهایی یا به همراه باکتری موجب افزایش پراکسید هیدروژن می‌شود که تایید کننده مکانیسم‌های ذکر شده در روند اضمحلال دیواره بوده و ورود باکتری را تسهیل می‌کنند.

تشکیل کلنی‌ها در داخل سلول نشان‌دهنده توانایی باکتری‌ها برای رشد و قرارگیری در شرایطی است که به لحاظ تغذیه‌ای، دما و زمان با محل استقرار خود سازگاری یافته‌اند. به عبارت دیگر ورود موفق باکتری به داخل سلول و ایجاد رابطه همزیستی مطلوب با گیاه میزبان با تشکیل کلنی تایید می‌گردد. همچنین نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده آن است که تلقیح باکتری به همراه تیمار هورمونی بر شاخص‌های رشد گیاهچه‌های برنج رقم هاشمی اثر مثبت و معنی‌داری داشته است به طوری که بدون توجه به تیمار هورمونی، شاخص‌های رشد در گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان تلقیح نشده، افزایش یافته است. گزارش‌های منتشر شده در طی ۲۰ سال گذشته نشان داده که در ۶۰ تا ۷۰ درصد از تحقیقات انجام شده، تلقیح آزوسپریلوم سبب افزایش رشد در گیاهان مختلف شده است [31]، [30]. به عنوان مثال تلقیح گیاه سورگوم با آزوسپریلوم، افزایش ۲۵ تا ۲۸ درصدی در وزن خشک و تر را در این گیاه نشان داده است [32]. در بررسی حاضر نیز تلقیح آزوسپریلوم سبب افزایش وزن خشک، وزن تر و وزن کل گیاهچه‌های برنج شده است. همچنین نتایج حاضر نشان داد که *A. irakense* وزن خشک و تر ریشه و ساقه را افزایش داده است. به نظر می‌رسد باکتری با تاثیر بر رشد ریشه و افزایش سطح آن برای جذب آب و عناصر غذایی، سبب رشد بهتر بخش‌های هوایی و نهایتاً افزایش عملکرد آن شده است [28]، [4]. پژوهشگران تاثیر مثبت تلقیح باکتری آزوسپریلوم را در توسعه ریشه گندم نشان داده‌اند [33]. در مطالعه دیگر نیز نشان داده شد که تلقیح با آزوسپریلوم برازیلنس، تعداد کل و طول ریشه‌های گندم را تا حد ۴۰-۳۴ درصد نسبت به شاهد افزایش داده است [34]. برخی گزارش‌ها نشان داده که تلقیح گیاهچه‌های ذرت با آزوسپریلوم لیپوفروم در شرایط مزرعه سبب توسعه سیستم ریشه و افزایش معنی‌دار در عملکرد ذرت شده است [16]. پژوهشگران نشان دادند که آزوسپریلوم در همان مراحل اولیه رشد گیاه بر مورفولوژی و متابولیسم گیاه اثر دارد [18]. چگونگی و نحوه گسترش ریشه به وسیله آزوسپریلوم هنوز مورد بحث است ولی بیشتر شواهد موید آن است که این باکتری سبب تولید هورمون‌های رشد مانند اکسین می‌شود که محرک رشد ریشه هستند. برخی مطالعات گزارش کردند که انواع جهش یافته آزوسپریلوم، که دارای توان اندکی در ترشح هورمون‌ها دارند، اثر معنی‌داری بر رشد ریشه و رشد کل گیاه ندارند [35]. برخی پژوهشگران معتقدند تاثیر هورمونی القا شده در گیاه

سورگوم به وسیله سیانوباکتر نوستوک، باعث تغییرات مشخص در وزن خشک و تر ساقه می گردد [36]، [4]. محققین نتایج مشابهی را در مورد افزایش وزن خشک بخش هوایی ذرت در اثر تلقیح با آزوسپریلوم گزارش دادند [36]، [25]. قندهای محلول، به ویژه ساکارز، گلوکز و فروکتوز نقش مهمی در ساختار و متابولیسم گیاه دارند [1]. ورود باکتری به درون سلول های ریشه با اضمحلال دیواره سلول های لایه اپیدرم ریشه همراه است. ساختار سلولز دیواره در محل ورود باکتری سست شده و گلوکز و سایر قندهای محلول را به داخل سلول آزاد می کند [11]. انباشته شدن قندهای محلول در داخل سلول پاسخ سریع گیاه به تغییرات پتانسیل و محتوی نسبی آب ریشه است [10]. از طرف دیگر افزایش قندهای محلول به گیاه کمک می کند تا بتواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه در حد مطلوب نگه دارد [37]. همچنین این ترکیبات نه تنها به عنوان منابع متابولیکی و اجزای ساختاری سلول ها عمل می کنند، بلکه به عنوان علامت دهندهایی برای تنظیم فرآیندهای مختلف مرتبط با رشد و نمو گیاه، تنظیم بیان ژن های درگیر در فتوسنتز، متابولیسم ساکارز، سنتز اسمولیت و ساختار سلول عمل می کنند [25]. مسیرهای علامت دهنده قندهای محلول هنگام تنش های زیستی می توانند با تاثیر بر روی مسیرهای متابولیکی و سیستم های دفاعی گیاه، پاسخ های لازم برای کاهش تنش را تسریع کنند و اینگونه سلول، باکتری هم زیست را از پاتوژن تشخیص داده و به آن اجازه ورود می دهد [38]، [26]. از طرف دیگر، قندهای محلول به عنوان مولکول های علامت دهنده در متابولیسم سلولی، مسیرهای انتقال خاص یا مقاطع هورمون را فعال می کنند، و منجر به تغییر فعالیت آنزیم ها و الگوهای پروتئومی می شوند. واکنش های متابولیکی مختلف، قندهای محلول را مستقیماً با تولید گونه های فعال اکسیژن مرتبط می سازند. روابط همگرا یا متضاد بین قندهای محلول و تولید گونه های فعال اکسیژن عموماً با علامت دهی هورمون ها هدایت می شود. که نشان می دهد افزایش محتوای قندهای محلول با کنترل تنش اکسیداتیو مرتبط هستند [29]. در این بررسی تیمار هورمون اثر قابل توجهی در افزایش قندهای محلول داشته که به موازات آن سطح پراکسید هیدروژن نیز افزایش یافته است. بنابراین این نتیجه تایید می کند که هورمون ها نقش های مهمی در تطبیق تعادل قندهای محلول و ترکیبات فعال اکسیژن ایفا می کنند.

نتایج حاضر نشان داد که مقدار پروتئین های محلول ریشه گیاهچه های تلقیح شده با *A. irakense* تحت تیمار ترکیبی دو هورمون اکسین و جیبرلین افزایش یافته است. افزایش مقدار پروتئین های محلول که عمدتاً از گروه آنزیم ها هستند، احتمالاً نشان دهنده تغییرات در فعالیت برخی آنزیم های درگیر در فرآیند اضمحلال دیواره است که طی آن به باکتری ها اجازه ورود به درون سلول را می دهد [39]. همچنین هورمون های اکسین و جیبرلین بر تنظیم تشکیل و اصلاح دیواره سلولی از طریق سنتز پرولین و زنجیره های جانبی گلیسین نقش دارند [11]. گزارش های متعددی نشان داده که تلقیح گندم با باکتری های ریزوبیوم موجب افزایش مقدار پروتئین های محلول می شود [40]، [18].

فسفر (به صورت فسفات³⁻PO₄) به عنوان یک عنصر غذایی پرمصرف ضروری در نظر گرفته می شود و جزء اصلی ترکیبات مهم سلول های گیاهی از جمله قندهای فسفریله شده در فتوسنتز و تنفس، و فسفولیپیدهای سازنده غشاهای سلول های گیاهی است [16]. در مطالعه حاضر محتوای فسفر در گیاهان تلقیح شده با باکتری و تحت تیمار هورمون افزایش یافته است. بخش اعظم فسفر در کودهای شیمیایی با تبدیل به نمک های کلسیم و منیزیم در خاک غیرمحلول شده و از دسترس گیاهان خارج می گردد. باکتری های اطراف ریشه در تبدیل اشکال غیرمحلول فسفر به شکل محلول نقش داشته و دسترسی بعدی فسفر توسط ریشه گیاهان را تحت تاثیر قرار می دهد [8]. در مطالعه حاضر افزایش مقدار فسفر در گیاهان تلقیح شده با آزوسپریلوم با نتایج مطالعات دیگر محققان همخوانی داشت که نشان می دهد گونه های مختلف جنس *Azospirillum* قابلیت انحلال فسفات را دارا هستند [9].

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کلونیزاسیون موفق برنج با باکتری *A. irakense* سبب تغییر در مورفولوژی ریشه و بهبود شاخص های رشد و بیوشیمیایی گیاهچه های مورد بررسی شده است. این شواهد نشان دهنده سازگاری باکتری با گیاه در طول دوره رشد است. از طرفی دیگر نتایج حاضر نشان داد که تلقیح باکتری به همراه تیمار هورمونی سبب افزایش قابل توجه شاخص های رشد شده است. به عبارت دیگر تیمار هورمونی اثر هم افزایی بر عملکرد باکتری داشته است. بنابراین کاربرد غلظت مناسب از هورمون می تواند به بهبود روش های تلقیح باکتری ها با گیاهان و افزایش رشد و راندمان ارقام زراعی منجر شده که نتیجه آن کاهش مصرف کودهای شیمیایی و اثرات زیست محیطی ناشی از آن خواهد بود.

اعلام تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند که هیچ تضادی در منافع ندارند و در قبال ارائه اثر خود وجهی دریافت ننموده‌اند.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه گلستان و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به شماره طرح ۹۹۰۱۲۷۴۷ انجام شده است.

منابع

- [1] Filgueiras, L., Silva, R., Almeida, I., Vidal, M., Baldani, J.I. & Meneses, C.H.S.G. (2020). *Gluconacetobacter diazotrophicus* mitigates drought stress in *Oryza sativa* L. *Plant and Soil*, 451, 57-73.
- [2] Hamidi, A., Asgharzadeh, A., Ahmadi, A., Akbari Vala, S. & Choukan, R. (2021). Effect of Plant Growth Promoting Bacteria (PGPB) and Mycorrhizae Fungi on three Maize (*Zea mays* L.) Hybrids Some Seed Germination and Seedling Vigour Trait. *Journal of agricultural knowledge and sustainable production*, 13, 167-149.
- [3] Chang, C., Yang, M., Wen, H. & Chern, J. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Food Drug Anal*, 10, 178-182.
- [4] Cocking, E. (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria, Centre for Crop Nitrogen Fixation. *University of Nottingham*, 252, 169-175.
- [5] Francine, P., Joko, P., Barry, R., Jeremy, W. & Charles, H. (2007). Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3343-3350.
- [6] EKhwawas, H. & Adachi, K. (2010). Identification and quantification of auxins in culture media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. *Biol Fertil Soils*, 28, 377-381.
- [7] Dazy, M., Jung, V., Ferard, J. & Masfarau, J. (2008). Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implication in site restoration. *Chemosphere*, 74, 57-63.
- [8] Bashan, Y. & de-Bashan, L. (2010). How the Plant Growth-Promoting Bacterium *Azospirillum* Promotes Plant Growth—A Critical Assessment. *Northwestern Center for Biological Research (CIBNOR)*, 108, 78-122.
- [9] Kannan, T. & Ponmurugan, P. (2010). Response of Paddy (*Oryza Sativa* L.) Varieties to *Azospirillum Brasilense* Inoculation. *Journal of Phytology*, 6, 8-13.
- [10] Dias, B., Osorio, F., Kelsey, G., Andreia, B., Rafael, F., Lourdes, M., Augusto, R., Caballero, M., Enilson, L. & Adriana, G. (2014). Rhizobia Enhance Growth in Rice Plants Under Flooding Conditions. *American-Eurasian Journal Agriculture and Environment*, 14, 707-718.
- [11] White, J.F., Kingsley, K.L., Verma, S.K. & Kowalski, K.P. (2018). Rhizophagy cycle: an oxidative process in plants for nutrient extraction from symbiotic microbes. *Microorganisms*, 6, 95-98.
- [12] Alduy, A., Kiyo, N., Tadashi, S., Hisa, S., Bin, Y., Toru, H., Tsuyoshi, I., Hisayuki, M. & Kiwamu, M. (2013). Endophytic Colonization and In Planta Nitrogen Fixation by a *Herbaspirillum* sp. Isolated from Wild Rice Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 5285-5293.
- [13] Rodrigues, E., Rodrigues, L., Martinez, D., Vera, B., Santos, T., Segundo, U. & Veronica, M. (2017). *Azospirillum amazonense* inoculation: effects on growth, yield and N₂ fixation of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Soil*, 302, 249-261.
- [14] Nilsson, M., Bhattacharya, J., Rai, A.N. & Bergman, B. (2002). Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic Nostoc strains. *New Phytologist*, 156, 517-525.
- [15] Kumar, V., Singh, G., Chauhan, R.S. & Sinam, G. (2020). Role of plant growth-promoting rhizobacteria in mitigation of heavy metals toxicity to *Oryza sativa* L. In *Emerging Technologies in Environmental Bioremediation* (pp. 373-390). Elsevier.
- [16] Cosgrove, D. (2016). Catalysts of plant cell wall loosening [version 1; referees: 2 approved]. Department of Biology, 208 Mueller Lab, Pennsylvania State University, University Park, 16, 119-180.
- [17] Kathryn, J., Kingsley, S. & Verma, K. (2018). Rhizophagy Cycle: An Oxidative Process in Plants for Nutrient Extraction from Symbiotic Microbes. U.S. Geological Survey, Great Lakes Science Center, 12, 81-96.
- [18] Doli, P. & Vrinda, T. (2004). Studies on cell wall loosening enzymes in hor mone treated internodes of *Merremia emarginata*. Department of Biosciences, Saurashtra University, 26, 231-238.
- [19] Yoshida, S. & Coronel, V. (1976). Nitrogen nutrition, leaf resistance, and leaf photosynthetic rate of the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 22, 207-211.
- [20] Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. Handbook of phycological methods. *Physiological and biochemical methods*, 95.
- [21] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- [22] Olsen, S. R. & Sommers, L. E. (1982). Phosphorus. pp. 403-430. In: A. L. Page, et al. (eds.) *Methods of soil analysis: Part 2. Chemical and microbiological properties*. Agron. Mongr. 9. 2nd ed. ASA and SSSA, Madison, WI.

- [23] Sergiev, I., Alexieva, V. & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Computer Rend Academic Bulgarian Science*, 51, 121-124.
- [24] Fabricio, C., Bottini, R., Gernot, S. & Patricia, P. (2001). *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* Hydrolyze Conjugates of GA20 and Metabolize the Resultant Aglycones to GA1 in Seedlings of Rice Dwarf Mutants. *American Society of Plant Biologists*, 125, 2053-2058.
- [25] Errington, J., Katarzyna, M., Yoshikazu, K. & Ling, J. (2016). L-form bacteria, chronic diseases and the origins of life. *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences*, 32, 347-354.
- [26] Guixiang, P., Wu, Z., Huifen, L., Hongwei, X., Weihao, L. & Zhiyuan, T. (2019). *Enterobacter oryzae* sp. a nitrogen-fixing bacterium isolated from the wild rice species *Oryza latifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 1650-1655.
- [27] Compant, S., Abdul, S., Faist, H. & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of Advanced Research*, 19, 29–37.
- [28] Zhang, Q., Gong, M., Xu, X., Li, H. & Deng, W. (2022). Roles of auxin in the growth, development, and stress tolerance of horticultural plants. *Cells*, 11, 2761.
- [29] Jeandet, P., Formela-Luboińska, M., Labudda, M. & Morkunas, I. (2022). The role of sugars in plant responses to stress and their regulatory function during development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 5161.
- [30] Ralipo, K. & Must, T. (2009). Content of total carotenoids in *Calendula officinalis* L. from different countries cultivated in Estonia. *Natural Product Communications*, 4, 35-38.
- [31] Carole, S., Didier, B. & Claudine, F. (2013). Biological nitrogen fixation in non-legume plants. *Annals of Botany*, 111, 743-767.
- [32] Mildesgeren, N., Bhattacharya, J. & Rai, B. (2002). Colonization of roots of rice (*Oryza sativa*) by symbiotic Nostoc strains. *New Phytologist*, 156, 517–525.
- [33] Bellincampi, D., Felice, C. & Vincenzo, L. (2014). Plant cell wall dynamics and wall related susceptibility in plant–pathogen interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1-8.
- [34] Caiyan, C. & Hongyan, Z. (2013). Are common symbiosis genes required for endophytic rice-rhizobial interactions. *Chinese Academy of Sciences*, 8, 531-533.
- [35] Aravind, P. & Prasad, M. (2005). Cadmium-induced toxicity reversal by zinc in *Ceratophyllum demersum*.L (a free floating aquatic macrophyte) together with exogenous supplements of amino- and organic acids. *Hemosphere*, 61, 1720-1733.
- [36] Keg, F., sky, M., Jonatan, F. & Willats, W. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 5, 95-112.
- [37] Hironobu, M. & Hlsao, M. (2008). Endophytic Bacteria in the Rice Plant. *Japanese Society of Microbial Ecology*, 23, 109-117.
- [38] Deboy, R., Emmanuel, M., Derrick, F., Louise, T., Hoda, K., Joanne, E., Yasmin, M., Kisha, W., Bernard, H., Harry, G., & Karen, N. (2008). Insights into Plant Cell Wall Degradation from the Genome Sequence of the Soil Bacterium *Cellvibrio japonicas*. *American Society for Microbiology*, 190, 5455-5463.
- [39] Hung, S. & Lin, C. (2005). Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Botanical Studies Bull Academic journal*, 46, 1-10.
- [40] Akihito, O., Takafumi, I., Akiko, K., Wataru, H. & Kousaku, M. (2007). Plant Cell Wall Degradation by Saprophytic *Bacillus subtilis* Strains: Gene Clusters Responsible for Rhamnogalacturonan Depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3803–3813.