

پاسخ سیستم دفاعی آنتی اکسیدان گیاه برنج در برهم کنش با دو گونه از آزوسپریلوم (*Azospirillum*)

زینب شریف السادات^۱، مهناز اقدسی^{۲*}، فائزه قناتی^۳، محمد حسین ارزانش^۴

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

۲. استاد، گروه زیست شناسی- فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

۳. استاد، گروه بیولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۲۸

چکیده

باکتری آزوسپریلوم (*Azospirillum*) یکی از مهم‌ترین باکتری‌های محرک رشد گیاهان است که توانایی تثبیت نیتروژن را دارد. در این تحقیق اثر دو گونه از باکتری آزوسپریلوم به همراه تیمار هورمون‌های اکسین (IAA) و یا جیبرلین (GA3) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در هنگام ورود به ریشه گیاهچه‌های برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa* cv. Hashemi) بررسی شد. به این منظور گیاهچه‌های برنج به مدت ۲۱ روز در محلول یوشیدا کشت و سپس با *brasilensea* و *A. irakens* در حضور غلظت‌های مختلف ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ ppm از IAA و GA3 به تنهایی یا ترکیبی از هر دو هورمون تلقیح شدند. پس از ۴ هفته تیمار، ریشه گیاهچه‌های برنج جمع‌آوری شده و جهت مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با *A. brasilense* در تیمار ترکیبی هورمون مشاهده شد. از طرف دیگر میزان فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی‌فنل اکسیداز و پراکسیداز دیواره‌ای در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری و در تیمار هورمونی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. همچنین مقدار پروتئین و قند محلول و کل به طور معنی‌داری در گیاهچه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد افزایش پیدا کرد. به نظر می‌رسد که سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی شرایط لازم برای ورود باکتری به اندام ریشه برنج را فراهم می‌کند.

کلیدواژگان: آزوسپریلوم، اکسین، تثبیت نیتروژن، جیبرلین، شل شدن دیواره اسکلتی

مقدمه

یکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار استفاده از کودهای زیستی در اکوسیستم‌های زراعی با هدف تعدیل و کاهش مصرف کودهای شیمیایی است. برنج با نام علمی *Oryza sativa* L. از مهم‌ترین غلات و گیاهان زراعی است که غذای اصلی نیمی از جمعیت جهان را تشکیل می‌دهد (Cocking, 2003). در سال‌های گذشته استفاده از کودهای شیمیایی حاوی نیتروژن به منظور تقویت زمین-های کشت برنج رواج یافته است. مصرف این کودها علاوه بر تجمع نیترات و کادمیوم در محصولات کشاورزی، آلودگی‌های زیست محیطی را نیز به همراه دارند (Creus *et al.*, 1997). امروزه استفاده از باکتری‌های محرک رشد یا PGR (Plant Growth Promoting) به عنوان روشی جایگزین در استفاده از کودهای شیمیایی مطرح است (Fan *et al.*, 2020). این باکتری‌ها در ریزوسفر گیاهان حضور داشته و به روش‌های مختلفی نظیر ترشح هورمون‌ها، تثبیت نیتروژن، تولید و ترشح سیدروفورها و القای مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی رشد و متابولیسم گیاهان را بهبود می‌بخشند (Buchanan *et al.*, 2005). از طرفی دیگر باکتری‌های محرک رشد بر روی فیزیولوژی و مورفولوژی ریشه اثر می‌گذارند و سبب افزایش جذب عناصر معدنی توسط می‌گذارند (Dutta *et al.*, 2010). گروهی از باکتری‌های محرک رشد اندوفیت‌ها نام دارند. اندوفیت‌ها باکتری‌های غیر بیماری‌زایی هستند که بخشی از زندگی خود را در درون بافت‌های گیاهی می‌گذارند (Dutta *et al.*, 2010). تاکنون انواعی از اندوفیت‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در ساقه، ریشه و بذر برنج شناسایی و گزارش شده‌اند که از آن جمله می‌توان به *Methylobacterium*، *Pantoea*، *Azospirillum*، *Burkholderia*، *Herbaspirillum*، *Rhizobium* اشاره کرد (Chen & Zhu, 2013). آزوسپریلوم باکتری آزادزی گرم منفی، هوازی، میله‌ای شکل و متعلق به زیررده‌ی آلفا پروتئوباکتیریا می‌باشد. تاکنون گونه‌های متعددی از این باکتری در سراسر جهان شناسایی و معرفی شده است (Cocking, 2003). این باکتری می‌تواند رشد گیاه را به صورت مستقیم و غیر مستقیم تحریک کند (Jnawali *et al.*, 2015; Aasfar *et al.*, 2021). گونه‌های آزوسپریلوم قبل از تحریک رشد و حمایت از گیاهان در برابر انواع پاتوژن‌ها، باید در ریشه-

های آن ساکن شوند. ساکن شدن باکتری در گیاهان به توانایی تشخیص ریشه‌های گیاهان، چسبیدن، نفوذ به درون گیاه و استقامت در برابر متابولیت‌های سمی تولید-شده توسط گیاهان در مواجهه با ارگانیسم خارجی (پاتوژن یا غیر پاتوژن) بستگی دارد (Davidsson *et al.*, 2018). فعل و انفعالات فیزیکی بین باکتری و گیاه به چند لایه اولیه سلول‌های ریشه گیاه و قشر خارجی آن محدود می‌شود. نفوذ باکتری‌ها در قشر ریشه با شل شدن دیواره‌ی سلول گیاه همراه است. ظاهراً این فعل و انفعال به جای یک ارتباط انگلی بین باکتری و گیاه، نوعی رابطه همزیستی است که به موجب آن باکتری‌ها، ژن‌های موجود در سیستم واکنش دفاعی گیاه را فعال ساخته و رشد گیاه و دسترسی سیستم ریشه به مواد تغذیه‌ایی را افزایش می‌دهند (Davidsson *et al.*, 2013)، در عوض منطقه سکونت و مواد تغذیه‌ای مورد نیاز این باکتری‌ها تامین می‌شود. باکتری پس از نفوذ به ریشه گیاه، مولکول‌های زیستی شامل الیسیتورها و نیز آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی را آزاد می‌کند که به افزایش مقاومت گیاه منجر می‌شود (Becker *et al.*, 2016). برخی محققین معتقدند که تولید هورمون‌های رشد و افزایش انتقال مواد معدنی به ریزوسفر، از عوامل مستقیم کنترل عملکرد گونه‌های باکتری در افزایش رشد گیاهان محسوب می‌شوند. یکی از مهم‌ترین مزایای برهمکنش ریشه گیاه با گونه‌های باکتری، افزایش رشد تارهای کشنده ریشه در ریزوسفر است که سبب افزایش جذب مواد غذایی می‌شود و به رشد و متابولیسم گیاه کمک می‌کند (Arnold *et al.*, 2018). برخی گزارش‌ها نشان داده‌اند که برهمکنش باکتری با ریشه موجب القای سیستم دفاعی گیاه و برانگیخته شدن آنزیم‌های لیتیک مختلفی می‌شود. این آنزیم‌ها باعث شل شدن دیواره شده و شرایط لازم برای ورود باکتری به داخل سلول را فراهم می‌کند (Albersheim *et al.*, 2011; Sharifalsadat *et al.*, 2023). حضور باکتری‌ها در ریشه، مکانیسم‌های تدافعی و مقاومتی مانند پاسخ‌های فوق حساسیت (Hypersensitive Reaction)، مقاومت اکتسابی سیستمیک (Systemic Acquired Resistance) و مقاومت سیستمیک (Systemic Resistance) را القا می‌کند (Gow *et al.*, 2017). بالا رفتن مقاومت گیاهان منجر به افزایش تجمع متابولیت‌ها، فعال شدن آنزیم‌های

تنش اکسیداتیو در برنج شده و توانایی گیاهچه‌ها را در حذف گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده در طول متابولیسم نیتروژن افزایش می‌دهد (García de Salomone et al., 2010; Zhang et al., 2018). از سوی دیگر برخی محققان نشان داده‌اند که تلقیح گیاه ذرت با دو سویه مختلف *A. brasilense* سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز و آسکوربات پراکسیداز می‌شود (Fukami et al., 2018). همچنین نشان داده شده که باکتری آزوسپریلوم با تاثیر بر سیستم آنتی‌اکسیدان از گیاه گندم در برابر تنش فلزات سنگین محافظت می‌کند (Gureeva et al., 2025). نتایج تحقیقات پیشین نشان داد که تلقیح گیاهچه‌های برنج با دو گونه *A. irakense* و *A. brasilense* سبب افزایش قابل توجه شاخص‌های رشد می‌شود. از طرفی دیگر کاربرد غلظت مناسب از هورمون‌های اکسین و جیبرلین (۲۰۰ میلی مولار) می‌تواند به تلقیح بهتر گیاه برنج با باکتری کمک کند و رشد را افزایش دهد. به عبارت دیگر تیمار هورمونی اثر هم‌افزایی بر عملکرد باکتری داشته است. همچنین این نتایج نشان داد که زمان ورود *A. irakense* و *A. brasilense* به ترتیب ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از تلقیح بوده است. اگرچه تیمارهای هورمونی تاثیری بر مدت زمان لازم برای ورود باکتری به درون ریشه نداشتند، اما در میزان ورود و تجمع کلنی‌ها موثر بودند (Sharifalsadat et al., 2023). القاء مقاومت در گیاهان تلقیح‌شده با گونه‌های آزوسپریلوم، از جمله مکانیسم‌هایی است که به عنوان فعالیت بیوکنترل در باکتری‌های محرک رشد شناخته شده است. آنزیم‌هایی نظیر پراکسیدازها، آنزیم‌های مرتبط با مسیر سنتز لیگنین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و تولید برخی متابولیت‌ها در حمایت از مکانیسم‌های دفاعی در گیاهان تلقیح‌شده نقش بسزایی دارند. هدف از پژوهش حاضر بررسی نقش سیستم آنتی‌اکسیدان در فرآیند شل‌شدن دیواره سلولی و ورود باکتری‌ها به درون سلول‌های ریشه گیاه برنج رقم هاشمی است.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر به منظور بررسی نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در ورود دو گونه باکتری *Azospirillum brasilense* و *Azospirillum irakense* در ریشه گیاه برنج رقم هاشمی در سال ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی

مرتبط با مکانیسم دفاعی مانند پراکسیدازها و پلی‌فنل-اکسیداز و برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان شده که سبب می‌شود تا گیاهان به پاتوژن و الیستورها پاسخ دهند (Kang et al., 2018).

مکانیسم‌های تدافعی در گیاهان شامل تغییرات اتصالات عرضی دیواره، پاسخ‌های فوق حساسیتی، تولید متابولیت‌های ثانویه چون ترکیبات فنلی و فعال‌شدن سیستم آنتی‌اکسیدان می‌باشد. این سیستم شامل آنزیم‌هایی مانند کاتالاز، سوپراکسید دسموتاز، پلی‌فنل‌اکسیداز و آسکوربات پراکسیداز است (Ferrari et al., 2013). یکی از مکانیسم‌های حفاظتی که تحت تاثیر تنش‌های زیستی و غیرزیستی تحریک می‌شود، سیستم آنتی‌اکسیدان است. سیستم آنتی‌اکسیدان در شرایط مطلوب محیطی نیز در سلول‌های گیاهی فعالیت دارد، اما تنش‌های محیطی مختلف میزان فعالیت آن‌ها را در سلول تغییر می‌دهند (Couto & Zipfel, 2016). این سیستم با عملکرد آنتی‌اکسیدانی خود موجب جمع‌آوری و احیای گونه‌های فعال اکسیژن شده و از اکسیداسیون مولکول‌های زیستی حیاتی پیشگیری می‌کند و مانع از بروز تنش اکسیداتیو و یا تخفیف اثرات آن در سلول‌های گیاه می‌شوند (Bolouri Moghaddam & Van den Ende, 2013). رادیکال‌های آزاد مشابه گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به طور طبیعی در مسیرهای متابولیسمی مختلف در سلول‌ها تولید می‌شوند و نقش مهمی در فرآیند پیام‌رسانی سلول ایفا می‌کنند. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند به اشکال مختلف از جمله پاکسازی رادیکال‌های آزاد، کلات‌کنندگی و احیاء‌کنندگی عمل کنند و موجب کاهش و یا رفع آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد در سیستم‌های زیستی شوند (Cheval et al., 2020). تنش‌های زیستی و غیرزیستی از عوامل محدودکننده در رشد گیاهان به شمار می‌روند. سیستم‌های دفاعی متعددی در مقاومت گیاهان به شرایط تنش با یکدیگر همکاری می‌نمایند. یکی از راه‌های بهبود اثرات زیان‌بار تنش، همزیستی گیاهان با میکروارگانیسم‌های خاک می‌باشد (Reuveni, 1995).

تاکنون گزارش‌های متعددی در خصوص اثر باکتری آزوسپریلوم بر سیستم آنتی‌اکسیدان در گیاهان مختلف منتشر شده است. گزارش‌ها نشان می‌دهد که تلقیح با *A. brasilense* باعث افزایش محتوای نیتروژن و تحمل

شرایط رشد گیاهچه‌ها: در این تحقیق بذره‌های گیاه برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa* L. cv Hashemi) پس از استریل سطحی، بر روی کاغذ صافی نمناک به مدت ۷ روز در دمای ۲۵ سانتی‌گراد در اتاقک کشت قرار داده شدند تا جوانه‌زنی صورت گیرد. سپس دانه‌رست‌ها به محیط کشت یوشیدا حاوی عناصر معدنی ماکروالمان، میکروالمان و آهن (Yoshida & Coronel, 1976) در اتاق کشت با دمای حداقل ۲۲ (در طی شب) و حداکثر ۳۲ درجه سانتی‌گراد (در طی روز) و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت ۱۴ روز رشد داده شدند. در این آزمایش pH محلول غذایی یوشیدا به صورت روزانه بر روی 6 ± 0.2 تنظیم شد. در ادامه گیاهچه‌های ۲۱ روزه با محلول سوسپانسیون باکتریایی حاوی غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۲۰۰ ppm اکسین (IAA) و جیبرلین (GA_3) به تنهایی و با ترکیبی از هر دو (۲۰۰ ppm GA_3 + ۲۰۰ ppm IAA) تیمار شدند. پس از ۴ هفته تیمار؛ ریشه گیاهچه‌های برنج برداشت و جهت مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

دانشگاه گلستان در استان گلستان انجام شد. به این منظور آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با ۴ تکرار انجام شد. فاکتورهای مورد آزمایش دو گونه آزوسپیریوم و نیز دو هورمون IAA و GA_3 (در سه غلظت ۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ ppm) بوده است.

خالص‌سازی و کشت باکتری: در این تحقیق دو گونه آزوسپیریوم از آزمایشگاه بیولوژی خاک بخش تحقیقات خاک و آب مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان گلستان تهیه و کشت داده شد.

در ابتدا باکتری‌ها بر روی محیط اختصاصی RC جامد کشت و سپس شناسایی شدند. در ادامه تک کلنی از باکتری مورد نظر انتخاب و بر روی محیط کشت مایع Nfb غنی شده با یک گرم در لیتر کلرور آمونیوم، در انکوباتور و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت رشد داده شد. سپس محیط کشت مایع حاوی باکتری‌ها به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ ($5000 \times g$) شده و پس از حذف محلول رویی، توده‌ی باکتری با بافر فسفات نمکی (شامل ۰/۲ گرم KH_2PO_4 ، ۱/۱۵ گرم K_2HPO_4 و ۷/۵ گرم NaCl در یک لیتر آب با pH=۷/۲) دو بار شستشو شده و مجدداً سانتریفیوژ شدند. با افزودن بافر فسفات به توده باکتری جذب نوری محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱/۰۵ تنظیم گردید. شمارش کلنی و ضرب تعداد آن در ضریب رقت، غلظت $10^6 CFU/ml$ را تایید کرد.



شکل ۱- گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa*) تلقیح شده با دو گونه از *Azospirillum* و تیمار شده با هورمون‌های گیاهی IAA و GA_3 .

اضافه کردن عصاره به محیط واکنش، تجزیه H_2O_2 توسط آنزیم شروع می‌شود. ضریب خاموشی (€) برای H_2O_2 در طول موج ۲۴۰ نانومتر $40 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ است. فعالیت گایاکول پراکسیداز محلول نیز در مد سینتیک و در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. معرف مورد نیاز برای فعالیت آنزیم، گایاکول است که در حضور الکترون‌های ناشی از تجزیه H_2O_2 به وسیله آنزیم به تتراگایاکول تبدیل می‌شود و رنگ قرمز تولید می‌کند. در این سنجش مقدار ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با $\text{pH} = 6/8$ ، گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۴۰ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. ضریب خاموشی (€) تتراگایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر $26/6 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ می‌باشد (Chance & Maehly, 1955).

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات-پراکسیداز: برای تهیه عصاره آنزیم آسکوربات پراکسیداز از بافر استخراج فسفات مونوسدیک ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) ۲۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7$ استفاده شد (Nakano and Asada, 1981). بدین صورت که مقدار ۰/۰۵ گرم از ریشه گیاه با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۲۵۰ میلی‌مولار هموژن شد. عمل استخراج در هاون چینی سرد و بر روی یخ انجام شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ ۴ درجه با سرعت 16000 g قرار داده شد و بلافاصله از محلول رویی برای اندازه‌گیری آنزیم آسکوربات پراکسیداز استفاده شد.

جهت تعیین فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، ۲ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل ۱۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات-سدیم برای شاهد و ۱۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم برای نمونه، ۵۰ میکرولیتر اسید آسکوربیک ۰/۵ میلی-مولار، ۵۰ میکرولیتر EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی و ۱۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۱/۲ میلی‌مولار می‌باشد (Nakano & Asada, 1981). محلول شاهد فاقد آب اکسیژنه بوده و با اضافه کردن آب-اکسیژنه به مخلوط واکنش، فعالیت آنزیمی شروع شد. کاهش جذب نور به علت پراکسیداسیون اسید آسکوربیک در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۲ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر ثبت گردید. ضریب خاموشی (€) آنزیم آسکوربات پراکسیداز برابر $2/8 \text{ mM}^{-1}\text{Cm}^{-1}$ می‌باشد. برای

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD): ابتدا مقدار ۰/۰۵ گرم از ریشه برنج با ۱ میلی‌لیتر بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 8$ شامل کلرید منیزیم ۱۰۰ میلی‌مولار، ساکارز ۲۵۰ میلی‌مولار، Triton ۰/۵ درصد، مرکاپتواتانول ۱۰ میلی‌مولار و PMSF ۱ میلی‌مولار در هاون چینی سرد خرد شد. محلول به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در 14000 g سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ، از فاز بالایی عصاره (سوپرناتانت) جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم استفاده شد. به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از ریبوفلاوین و متیونین در حضور نور جهت تولید رادیکال‌های سوپر اکسید استفاده شد (Beauchamp et al., 1971). در این آزمایش سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات مونوسدیک ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 7/8$ ، EDTA ۰/۶۶ میلی‌مولار، متیونین ۱۰ میلی‌مولار، NBT ۳۳ میکرومولار، ریبوفلاوین ۰/۰۰۳۳ میلی‌مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود که شاهد در تاریکی و بقیه نمونه‌ها در نور قرار گرفتند. فعالیت آنزیم سوپر اکسید-دیسموتاز در طول موج ۵۶۰ نانومتر بر اساس ممانعت از تولید مونوفورمازان (احیا NBT) در مدت زمان ۱۰ دقیقه اندازه‌گیری شد. تعداد واحدهای آنزیم در مخلوط واکنش بر اساس رابطه زیر محاسبه و در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس واحد SOD در گرم وزن تر گیاه بیان شد.

$$\text{تغییرات جذب در حضور آنزیم SOD} = 2 \times [1 - \frac{\text{تغییرات جذب در غیاب آنزیم SOD}}{\text{تغییرات جذب در حضور آنزیم SOD}}] = \text{واحد آنزیم SOD}$$

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و گایاکول پراکسیداز: مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت ریشه در یک هاون چینی سرد (که از قبل بر روی ظرف یخ قرار داده شد بود) با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با $\text{pH} = 6/8$ هموژن شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در 16000 g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز بالایی عصاره به دست آمده برای اندازه‌گیری فعالیت دو آنزیم کاتالاز و پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت (Kar & Mishra, 1976).

اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز در مد سینتیک و در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد (Chance & Maehly, 1955). که به این منظور، ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با $\text{pH} = 6/8$ ، آب اکسیژنه ۱۵ میلی-مولار و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استفاده شد. با

محاسبه فعالیت آنزیم از تغییرات جذب نور در یک دقیقه اول استفاده گردید.

استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل-اکسیداز و پراکسیداز دیواره‌ای: جهت استخراج مقدار ۰/۱ گرم از بافت تر ریشه گیاهان در هاون چینی با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۶/۸ هموژن شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. فاز بالایی عصاره (سوپرناتانت) به دست آمده برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز و رسوب باقی‌مانده بعد از ۴ بار شست‌وشو با آب مقطر جهت اندازه‌گیری مقدار پراکسیداز دیواره‌ای مورد استفاده قرار گرفت (Kar & Mishra, 1976).

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز، از پیروگال به عنوان معرف استفاده شد. فعالیت آنزیم در طول موج ۴۲۰ نانومتر بر اساس شدت رنگ نارنجی پورپوروگالین تولید شده از پیروگال اندازه‌گیری شد. ضریب خاموشی برای پورپوروگالین ۲/۴۷ لیتر بر میلی-مول بر سانتی‌متر بود. برای اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز دیواره‌ای به رسوب باقیمانده از استخراج بعد از چهار بار شست‌وشو با آب مقطر، ۲ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۱ مولار اضافه شد. بعد از ورتکس کردن، مخلوط به دست آمده در ۱۵۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز دیواره‌ای بر اساس مقدار تتراگایاکول تولید شده در حضور الکترون‌های ناشی از تجزیه پراکسید هیدروژن به وسیله آنزیم در مدت یک دقیقه در حالت کینتیک دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه شد. در این آزمایش مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۲۵ میلی‌مولار با pH=۶/۸، گایاکول ۲۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۴۰ میلی-مولار و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. ضریب خاموشی (E) تتراگایاکول در طول موج ۴۷۰ نانومتر ۲۶/۶ لیتر بر میلی‌مول بر سانتی‌متر است (Kar & Mishra, 1976).

استخراج و اندازه‌گیری پراکسید هیدروژن: ابتدا مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت تر ریشه برنج با ۱ میلی‌لیتر اسیدتری‌کلرواستیک ۰/۱ درصد عصاره‌گیری شد. پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ g، به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول روشناور عصاره ۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷ و یک میلی‌لیتر مخلوط

یدید پتاسیم ۱ مولار در بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی-مولار اضافه شد. سپس جذب نوری ترکیب به دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمودار استاندارد پراکسید هیدروژن با استفاده از محلول مادر ۱ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن رسم شد (Sergiev et al., 1997).

اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپید: پراکسیداسیون لیپید با استفاده از اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدید (MDA) به عنوان شاخص و بر طبق روش هاج و همکاران صورت گرفت (Hodges et al., 1999). به این منظور مقدار ۰/۰۵ گرم از ریشه برنج با ۱ میلی‌لیتر از اسیدتری-کلرو استیک ۰/۱ درصد عصاره‌گیری شد. سپس عصاره‌های مورد نظر در ۱۳۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از محلول بالایی با ۲ میلی-لیتر از معرف اسیدتیوباربیتوریک‌اسید/ اسیدتری‌کلرو-استیک شامل TBA ۰/۲۵ درصد در TCA ۱۰ درصد مخلوط و سپس آن را در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. بلافاصله بعد از زمان مورد نظر، عصاره‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ظرف یخ قرار گرفتند و بعد از این مدت در ۱۳۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مقدار جذب محلول بالایی به دست آمده در طول موج ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. برای اندازه‌گیری مقدار مالون‌دی‌آلدید از فرمول زیر استفاده شد:

=پراکسیداسیون لیپید

$$10^6 \frac{[(A_{532} - A_{600}) - [(A_{440} - A_{600}) \times 0.0571]/157000]}{2}$$
 در نهایت مقدار پراکسیداسیون لیپید بر اساس نانومول مالون‌دی‌آلدید تولید شده در یک گرم وزن تر بیان شد. **اندازه‌گیری قندهای محلول:** عصاره‌گیری و استخراج قندها به روش اوموکولو انجام شد (Omokolo et al., 2005). به این منظور مقدار ۰/۱ گرم از بافت تر ریشه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد گرم در هاون چینی ساییده شده و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۷۰ درجه قرار داده شد. بعد از این مدت عصاره الکلی حاوی قندهای محلول جدا و قسمت پایینی همراه با ۵ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد دوباره برای تکرار عصاره‌گیری به حمام آب جوش منتقل شد. عمل استخراج با اتانول چهار بار تکرار شد. به منظور تبخیر الکول، عصاره بدست آمده در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. قسمت شفاف

داده شد. در ادامه مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از معرف فولین رقیق شده به آن اضافه و به شدت ورتکس شد. پس از ۴۵ دقیقه جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم نمودار استاندارد پروتئین کل از محلول مادر سرم آلبومین (۱ میلی گرم در میلی لیتر) استفاده شد. **آنالیزهای آماری:** آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. آنالیز و تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم افزار Excel و SAS و از آزمون LSD برای ارزیابی تفاوت‌ها در $P \leq 0.05$ استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که اثر فاکتورهای نوع هورمون، غلظت هورمون و نیز اثر متقابل فاکتورهای تلقیح × نوع هورمون، تلقیح × غلظت هورمون، غلظت هورمون × نوع هورمون و نیز اثر سه گانه تلقیح × نوع هورمون × غلظت هورمون بر فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز در سطح ۱٪ معنی‌دار است. این در حالی است که فعالیت آنزیم‌های گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز تنها با اثر فاکتور تلقیح در سطح ۱٪ معنی‌دار بوده و اثر سایر فاکتورها بر فعالیت این دو آنزیم تنها در سطح ۵٪ معنی‌دار است. هم چنین اثر فاکتورهای تلقیح، غلظت هورمون، نوع هورمون و نیز اثر متقابل فاکتورهای غلظت هورمون × نوع هورمون بر فعالیت آنزیم پراکسیداز دیواره‌ای در سطح ۱٪ معنی‌دار است (جدول ۱). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در ریشه گیاهچه‌های برنج نشان داد که فعالیت این آنزیم در نمونه‌هایی که با *A. brasiliense* تلقیح شده بودند بالاتر از تلقیح با *A. irakense* و نیز نمونه‌های شاهد بوده است. همچنین نتایج نشان داد که تیمار هورمونی سبب تحریک بیشتر فعالیت این آنزیم می‌شود. داده‌های حاضر نشان داد که تیمار هورمونی جیبرلین اثر تحریک‌کنندگی بیشتری در مقایسه با اکسین دارد. بالاترین میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز (1 ± 0.2 ۸۸/۳ میکرومول بر دقیقه در هر گرم وزن تر) در نمونه تلقیح‌شده با گونه برازیلنس و تحت تیمار ترکیبی هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد در حالی که پایین‌ترین میزان فعالیت این آنزیم (1 ± 0.2 ۳۸/۹ میکرومول بر دقیقه در هر گرم وزن تر) در نمونه شاهد مشاهده شده است (شکل ۲-الف). بررسی فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نشان داد که میزان فعالیت آنزیم در ریشه گیاهچه‌هایی که

بالایی جدا شده و برای اندازه‌گیری مقدار قندهای محلول مورد استفاده قرار گرفت. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره را در لوله آزمایش ریخته و به آن ۳ میلی‌لیتر محلول آنترون اضافه شد (McCready et al., 1950). مخلوط بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب جوش قرار گرفت. اندازه‌گیری قندهای محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر Shimadzu مدل UV-1600 و در طول موج ۶۲۰ نانومتر انجام شد. برای تهیه منحنی استاندارد از محلول مادر گلوکز ۱ میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد.

اندازه‌گیری قند کل: ابتدا به دو میلی‌لیتر از محلول تهیه شده از مرحله قبل یک میلی‌لیتر محلول فنل ۵ درصد و ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد (V/V) اضافه شد. پس از ۴۵ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (Schlegel, 1956).

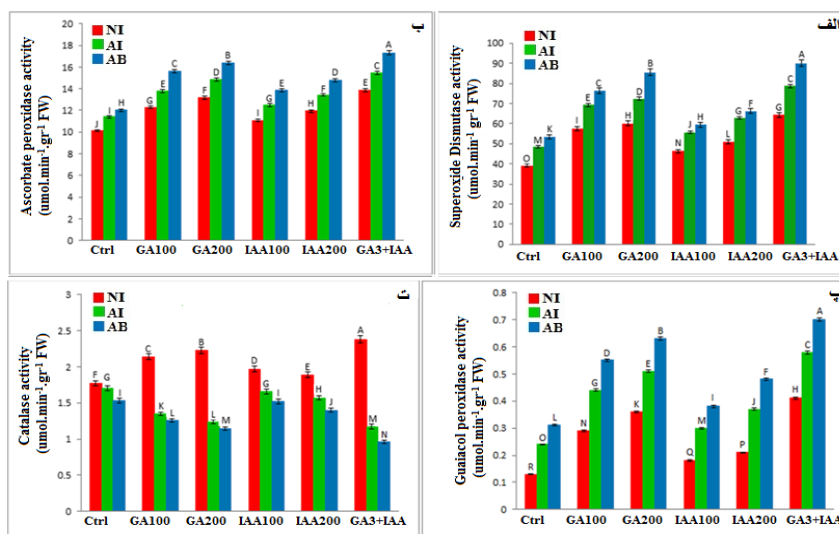
استخراج و اندازه‌گیری پروتئین محلول: به این منظور، مقدار ۰/۱ گرم از بافت تر ریشه در هاون چینی با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۶/۸ هموژن شد و سپس برای مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. فاز بالایی عصاره به دست آمده برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین‌های محلول مورد استفاده قرار گرفت (Kar & Mishra, 1976).

اندازه‌گیری پروتئین‌های محلول با استفاده از محلول برادفورد انجام شد (Bradford, 1976). به منظور رسم نمودار استاندارد پروتئین، از محلول مادر سرم آلبومین ۱۰ میلی گرم در ۱۰ میلی لیتر آب استفاده شد. جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد.

استخراج و اندازه‌گیری پروتئین کل: استخراج پروتئین کل با استفاده از روش مارکول انجام شد (Markewell, 1981). در این روش مقدار ۰/۰۵ گرم بافت تر ریشه با ۱ میلی‌لیتر بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار با pH=۹ حاوی EDTA ۱ میلی‌مولار، PMSF ۱ میلی‌مولار، Triton ۰/۱ درصد و PVPP ۰/۰۶ درصد در هاون چینی سانتریفوژ شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استخراج شده از ریشه با ۳ میلی‌لیتر معرف مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار

(0.8 ± 0.07 میکرومول بر دقیقه در هر گرم وزن تر) را در بین انواع تیمارهای انجام شده نشان داد (شکل ۲-پ). گزارش‌ها نشان می‌دهد که تلقیح گونه‌های مختلف برنج (*Oryza sativa*, *Oryza latifora*) با باکتری آزوسپریلوم برازیلنس سبب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز می‌شود (Gow et al., 2017). داده‌های تحقیق حاضر نشان داد که فعالیت این آنزیم در تیمارهای مورد مطالعه افزایش یافته است. از طرفی دیگر فعالیت دیگر آنزیم‌های پالایند اکسیژن فعال شامل آسکوربات پراکسیداز و گایاکول-پراکسیداز در گیاهان تلقیح‌شده با باکتری به همراه تیمار هورمونی افزایش یافته است. این نتایج حاکی از آن است که تیمارهای انجام شده به عنوان یک تنش زیستی مسیرهای متابولیکی جاروب‌کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن را فعال می‌کند. پژوهش‌های دیگری نیز نشان داده که حضور باکتری در ریزوسفر گیاهان زراعی مانند گندم و برنج باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز و گایاکول-پراکسیداز شده است (Bethke et al., 2014).

با باکتری و هورمون تیمار شده بودند، افزایش یافته است. اثر افزایشی فعالیت آنزیم در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با گونه برازیلنس در مقایسه با ابراکنز قابل توجه بوده است. همچنین داده‌های حاصل نشان داد که تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین اثر بهتری بروی فعالیت آنزیم آسکوربات-پراکسیداز گیاهچه‌های تلقیح‌شده با آزوسپریلوم برازیلنس داشته است. بالاترین میزان فعالیت این آنزیم (17.5 ± 1.8) میکرومول بر دقیقه در هر گرم وزن تر) در نمونه تلقیح‌شده با گونه برازیلنس و تحت تیمار ترکیبی هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۲-ب). نتایج حاصل از تلقیح دو گونه مختلف باکتری بر روی گیاهچه‌های برنج نشان داد که فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز به ترتیب در نمونه‌های شاهد، آزوسپریلوم ابراکنز و آزوسپریلوم برازیلنس افزایش معنی‌داری یافته است. بالاترین میزان فعالیت آنزیم مربوط به تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین در تلقیح با هر دو گونه باکتریایی دیده شده است. نمونه‌های تلقیح‌شده با آزوسپریلوم برازیلنس تحت تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین بیشترین میزان فعالیت آنزیم گایاکول‌پراکسیداز

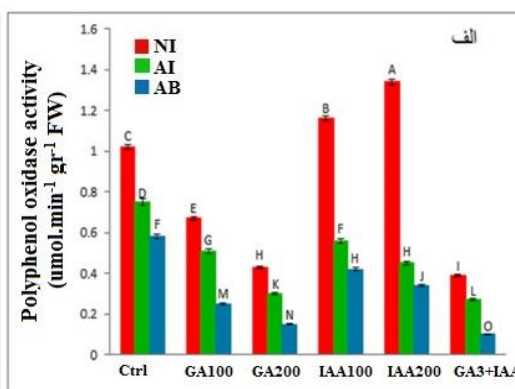
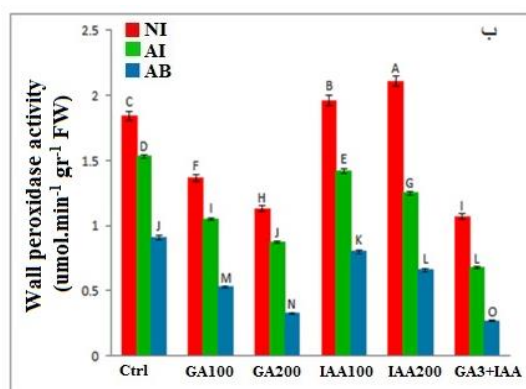


شکل ۲- فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در ریشه گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج تلقیح‌شده با دو گونه از *Azospirillum* و تیمار شده با هورمون‌های گیاهی. سوپراکسیددیسموتاز (الف)، آسکوربات پراکسیداز (ب)، گایاکول پراکسیداز (پ)، کاتالاز (ت). *Azospirillum* AB (*Azospirillum brasilense*), *Azospirillum irakense* (AI), *Azospirillum* NI (بدون تیمار هورمون), *Azospirillum* (بدون تلقیح), (غلظت ۲۰۰ ppm از هر کدام) IAA+GA3. حروف مختلف با توجه به آزمون LSD در $P \leq 0.05$ تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند.

این آنزیم به ترتیب در نمونه‌های شاهد، تلقیح‌شده با آزوسپریلوم ابراکنز و تلقیح‌شده با آزوسپریلوم برازیلنس کاهش یافته است. نتایج حاصل نشان داد که پایین‌ترین

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که تلقیح گیاهچه‌های برنج با دو گونه مختلف باکتری سبب کاهش معنی‌دار در فعالیت این آنزیم می‌شود. به طوری که فعالیت

برازیلنس کاهش معنی داری یافته است. داده‌های حاصل نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها در گیاهچه‌های تلقیح شده با آزوسپریلوم برازیلنس و آزوسپریلوم ایراکنز در تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین کاهش معنی داری داشته است. پایین‌ترین میزان فعالیت در گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری آزوسپریلوم برازیلنس تحت تیمار ترکیبی هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۳). تحریک فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز در اثر تنش-های زیستی و غیرزیستی و همچنین نقش حیاتی عمل اکسیداسیون ترکیبات فنلی توسط این آنزیم در دفاع از گیاهان به اثبات رسیده است (Sehrawat *et al.*, 2010). در این مطالعه، میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز در گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری و تحت تیمار هورمونی کاهش یافته است از این رو می‌تواند بیانگر این باشد که گیاه به طور هوشمندانه با تنظیم عملکرد سیستم دفاعی خود به باکتری اجازه ورود می‌دهد (Kutschera *et al.*, 2019). برخی محققین بیان داشتند تلقیح گیاه گندم با ریزوبیوم سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتز لیگنین شده است. در حالی که تلقیح گیاه کلزا با ریزوبیوم تغییر معنی داری در فعالیت پراکسیداز دیواره ایجاد نکرده است (Arnold *et al.*, 2018). گزارش دیگر هم حاکی از این مطلب است که حضور باکتری موجب کاهش فعالیت پراکسیداز دیواره در گیاه جو شده است (Bethke *et al.*, 2014).



شکل ۳- فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتز لیگنین در ریشه گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج تلقیح شده با دو گونه از *Azospirillum* و تیمار شده با هورمون‌های گیاهی. پلی‌فنل‌اکسیداز (الف)، پراکسیداز دیواره (ب). *AI* (*Azospirillum*), *AB* (*Azospirillum brasilense*). *Ctrl* (*irakens*) (شاهد، بدون تیمار هورمون)، *NI* (بدون تلقیح)، (غلظت ۲۰۰ ppm از هر کدام) *IAA+GA3*. حروف مختلف با توجه به آزمون LSD در $P \leq 0.05$ تفاوت معنی داری نشان می‌دهند.

ترکیبات به ترتیب در گیاهچه‌های شاهد و تلقیح شده با آزوسپریلوم ایراکنز و آزوسپریلوم برازیلنس افزایش

میزان فعالیت در گیاهچه‌های تلقیح شده با آزوسپریلوم برازیلنس و آزوسپریلوم ایراکنز در تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین دیده شده است. از طرفی دیگر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین، در گیاهچه‌هایی که با آزوسپریلوم برازیلنس تلقیح شده‌اند کمتر از گیاهچه‌های تلقیح شده با آزوسپریلوم ایراکنز بوده است (شکل ۲-ت). برخی مطالعات نشان دادند که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در طی همزیستی ذرت با باکتری محرک رشد افزایش یافته ولی میزان فعالیت کاتالاز کاهش داشته است (Acosta-Jurado *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2019; Kutschera *et al.*, 2019). فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، شانس تنش اکسیداتیو و برنامه مرگ سلولی را به حداقل می‌رساند (Albersheim *et al.*, 2011). کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز به عنوان مهم‌ترین آنزیم آنتی‌اکسیدان در این مطالعه می‌تواند دو دلیل داشته باشد: دلیل اول اینکه این باکتری‌ها احتمالاً مواد آنتی‌اکسیدانی تولید می‌کنند که می‌توانند در از بین بردن رادیکال‌های آزاد نقش داشته باشند و یا از تولید رادیکال‌های جدید ممانعت کنند. دلیل دوم آن است که باکتری قادر به تولید آنتی‌بیوتیک است (Beliën *et al.*, 2006). نتایج حاضر نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های پلی‌فنل‌اکسیداز و پراکسیداز دیواره (آنزیم‌های مسیر بیوسنتز لیگنین) به ترتیب در شاهد، تلقیح شده با آزوسپریلوم ایراکنز و آزوسپریلوم

بررسی داده‌های حاصل از اندازه‌گیری مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید نشان داد که مقدار این

هورمون و اثر سه گانه تلقیح × نوع هورمون × غلظت بر مقدار قندهای کل در سطح ۱٪ معنی دار است. همچنین اثر تمام فاکتورهای مورد بررسی (به استثنای غلظت هورمون و نیز اثر سه گانه تلقیح × نوع هورمون × غلظت) بر مقدار پروتئین محلول در سطح ۱٪ معنی دار است. این در حالی است که اثر تمام فاکتورهای مورد بررسی (به استثنای اثر تلقیح) بر مقدار پروتئین محلول در سطح ۵٪ معنی دار است (جدول ۲).

آنالیز داده‌های حاصل نشان داد که مقدار پروتئین محلول و کل به ترتیب در گیاهچه‌های شاهد و در تیمار با آزوسپریلوم ایراکنز و آزوسپریلوم برازیلنس افزایش معنی داری یافته است. از طرف دیگر تیمار هورمون جیبرلین اثر بهتری نسبت به اکسین در افزایش مقدار پروتئین داشته است. همچنین نتایج حاصل نشان داد که مقدار پروتئین‌های محلول و کل در گیاهچه‌های تلقیح-شده با آزوسپریلوم برازیلنس و آزوسپریلوم ایراکنز در تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین افزایش یافته است. بالاترین مقدار این ترکیبات در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری گونه برازیلنس تحت تیمار ترکیبی هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۵). افزایش مقدار پروتئین‌های محلول که عمدتاً از گروه آنزیم‌ها هستند، نشان‌دهنده تغییرات در فعالیت برخی آنزیم‌های درگیر در فرآیند شل شدن دیواره می‌باشد. همچنین، افزایش مقدار پروتئین‌های کل ارتباط مستقیمی با افزایش آنزیم‌ها و میزان فعالیت آن‌ها دارد (Bamford et al., 2019). گزارشات متعددی نشان داد که تلقیح گندم با باکتری‌های ریزوبیوم موجب افزایش مقدار پروتئین‌های محلول و در نتیجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌شود (Arnaud et al., 2013). با توجه به افزایش فعالیت برخی آنزیم‌های مورد مطالعه می‌توان ارتباط روشنی را بین افزایش مقدار پروتئین‌های کل و محلول با فعالیت آنزیم‌ها بیان کرد. بررسی‌های انجام شده بر روی مقدار قندهای کل و محلول نشان داد که تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری آزوسپریلوم ایراکنز و آزوسپریلوم برازیلنس سبب افزایش این ترکیبات در مقایسه با نمونه شاهد شده است. همچنین نتایج حاصل نشان داد که تلقیح گیاهچه‌ها با آزوسپریلوم برازیلنس سبب افزایش بیشتر مقدار قندها در مقایسه با آزوسپریلوم ایراکنز شده است. از طرف دیگر تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین سبب افزایش بیشتر

معنی‌داری نشان داده است. نتایج حاصل نشان داد که مقدار پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپید در گیاهچه‌های تلقیح شده با آزوسپریلوم برازیلنس و آزوسپریلوم ایراکنز در تیمار ترکیبی اکسین و جیبرلین افزایش داشته است. بالاترین مقدار این ترکیبات در گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری گونه برازیلنس تحت تیمار ترکیبی هورمون اکسین و جیبرلین مشاهده شد (شکل ۴). نتایج حاصل از این تحقیق در خصوص افزایش معنی‌دار پراکسید هیدروژن در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری تحت تیمار هورمون با یافته‌های دیگر محققان همخوانی دارد. گزارش‌های دیگر محققان نشان داده که گونه‌های فعال اکسیژن با اولین مولکول مناسبی که با آن روبرو شوند (شامل پروتئین‌ها، لیپیدها و سایر مولکول‌های زیستی) واکنش نشان می‌دهند (Sagi & Fluhr, 2006) و به اشکال زیان بارتر مثل رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^\bullet$) تبدیل می‌شوند که باعث پراکسیداسیون لیپید شده و از این طریق بیشترین تاثیر را بر شکست شدن اتصالات ترکیبات دیواره‌ای دارد. پراکسیداسیون لیپید فرآیند زیستی است که در شرایط هوازی رخ می‌دهد. فعال شدن پراکسید هیدروژن و ایجاد رادیکال‌های هیدروکسیل و اکسیژن تکی موجب می‌شود که با گروه‌های متیل اسیدچرب دارای چند پیوند اشباع نشده (Poly Unsaturated Fatty Acid) واکنش نشان داده (Repetto et al., 2012) و رادیکال‌های پراکسی-لیپید را تولید کنند. این رادیکال‌ها بسیار واکنش‌دهنده بوده و می‌توانند با زنجیره‌های پلی‌گالاکتورونان‌ها و رامنوگالاکتورونان‌ها موجود در ساختار پکتین واکنش نشان داده و آن را بشکنند (White et al., 2014). از این رو محصولات هیدروکسیله شده حاصل از این فرآیند می‌توانند باعث دیسموتاسیون (Dismutation) سایر ترکیبات دیواره سلولی شده و در نهایت شل شدن دیواره را سبب شوند (Chen & Zhu, 2013).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان داد که اثر فاکتورهای تلقیح، نوع هورمون، غلظت هورمون و نیز اثر متقابل فاکتورهای نوع هورمون × غلظت هورمون و نیز اثر سه گانه تلقیح × نوع هورمون × غلظت هورمون بر مقدار قند محلول در سطح ۱٪ معنی دار است. در حالیکه اثر فاکتورهای تلقیح و نیز اثر متقابل فاکتورهای دو گانه تلقیح × غلظت هورمون و نیز نوع هورمون × غلظت

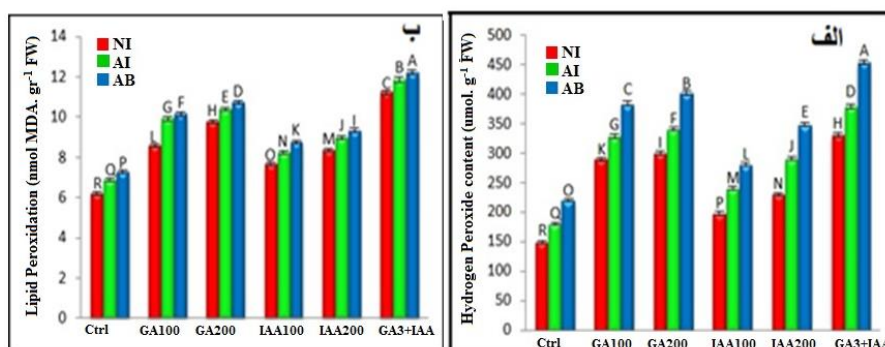
مقدار قند در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با آزوسپریلوم برازیلنس شده است (شکل ۶). افزایش قندهای محلول به عنوان یک مکانیسم تحمل در برابر تنش است و در واقع باعث تنظیم پتانسیل آب سلول در بخش سیتوزول برای مقابله با غلظت‌های بالای یون‌های جذب شده و تجمع یافته در واکوئل می‌گردد. این ویژگی روشی جهت حفظ شرایط اسمزی گیاه است (Almendras et al., 2018).

مقدار قند در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با آزوسپریلوم برازیلنس شده است (شکل ۶). افزایش قندهای محلول به عنوان یک مکانیسم تحمل در برابر تنش است و در واقع باعث تنظیم پتانسیل آب سلول در بخش سیتوزول برای مقابله با غلظت‌های بالای یون‌های جذب شده و تجمع یافته در واکوئل می‌گردد. این ویژگی روشی جهت حفظ شرایط اسمزی گیاه است (Almendras et al., 2018).

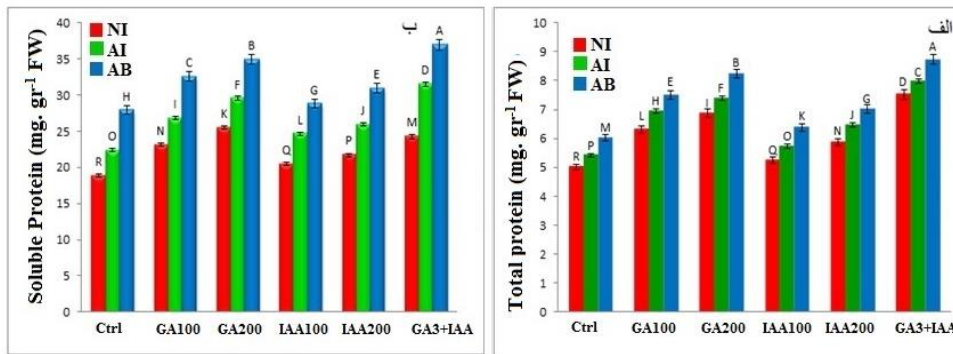
جدول ۲- جدول آنالیز واریانس اثر متقابل تلقیح با دو گونه آزوسپریلوم با نوع و غلظت هورمون بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی گیاه برنج

منابع تغییرات	درجه آزادی	قندهای محلول	قند کل	پروتئین محلول	پروتئین کل
تلقیح	۱	۷۴۴/۹۰*	۳۸۰/۲۰**	۸۲/۰۹**	۸۱/۲۸**
نوع هورمون	۱	۱۷۶/۸۰**	۷۱۲/۹۸*	۳۱۳/۸۳**	۱۲۲/۵۳*
غلظت هورمون	۵	۱۸۹/۲۴**	۳۶/۴۳*	۶۶/۹۸*	۷۹/۵۱*
تلقیح × نوع هورمون	۱	۴۱۴/۳*	۴۴/۹۲*	۳۸/۸۰**	۲۳۵/۱۵*
تلقیح × غلظت هورمون	۵	۳۰۵/۳*	۷۱۷/۱۲**	۲۳۷/۵۶**	۹۸/۲۶*
نوع هورمون × غلظت هورمون	۵	۴۳/۷**	۶۲۹/۰۲**	۱۰۸/۰۹**	۶۷/۷۳*
تلقیح × نوع هورمون × غلظت هورمون	۵	۸۱/۱۱**	۳۰۸/۵۶**	۵۴/۰۶*	۱۰۱/۵۲*
خطای کل	۲۳	۵۳/۶۵	۳۳/۱۵	۲۲/۱۴	۷۳۲/۵۹

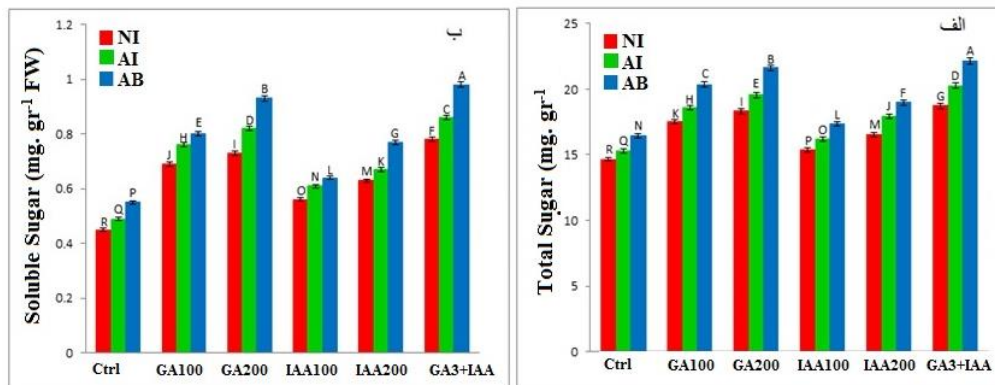
* و ** به ترتیب در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد معنی‌دار است.



شکل ۴- مقدار پراکسید هیدروژن (الف) و پراکسیداسیون لیپیدی (ب) در ریشه گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج تلقیح شده با دو گونه از *Azospirillum* و تیمار شده با هورمون‌های گیاهی. (AI (*Azospirillum irakense*), AB (*Azospirillum brasilense*), Ctrl (شاهد، بدون تیمار هورمون)، NI (بدون تلقیح)، غلظت ۲۰۰ ppm از هر کدام IAA+GA3. حروف مختلف با توجه به آزمون LSD در $P \leq 0.05$ تفاوت معنی داری نشان می‌دهند.



شکل ۵- محتوای پروتئین در ریشه گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج تلقیح‌شده با دو گونه از *Azospirillum* و تیمار شده با هورمون‌های گیاهی. پروتئین کل (الف)، پروتئین محلول (ب). (AB) (*Azospirillum brasilense*), (AI) (*Azospirillum irakense*), Ctrl (شاهد، بدون تیمار هورمون)، NI (بدون تلقیح)، (غلظت ۲۰۰ ppm از هر کدام) IAA+GA3. حروف مختلف با توجه به آزمون LSD در $P \leq 0.05$ تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند.



شکل ۶- محتوای قند در ریشه گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج تلقیح‌شده با دو گونه از *Azospirillum* و تیمار شده با هورمون‌های گیاهی. قند کل (الف)، قند محلول (ب). (AB) (*Azospirillum brasilense*), (AI) (*Azospirillum irakense*), Ctrl (شاهد، بدون تیمار هورمون)، NI (No Inoculation) (بدون تلقیح)، (غلظت ۲۰۰ ppm از هر کدام) IAA+GA3. حروف مختلف با توجه به آزمون LSD در $P \leq 0.05$ تفاوت معنی‌داری دارند.

نتیجه‌گیری کلی

اکسیژن در گیاه است که از آسیب‌های اکسیداتیو و خسارات فیزیولوژیک جلوگیری می‌کند. این امر می‌تواند نشانه‌ای از کنترل سیستم دفاعی گیاه در هنگام ورود باکتری به درون گیاه باشد. گونه‌های مختلف آزوسپیریلوم دارای خصوصیات محرک رشدی متفاوت بوده و توانایی‌های بالقوه‌ای در تعدیل سیستم دفاعی ریشه از خود نشان دادند. مطالعه‌ی انجام شده در مورد گونه‌های آزوسپیریلوم و خصوصیات محرک رشدی مختلف آن‌ها جهت طراحی راه‌حلی برای استفاده از این باکتری‌ها به عنوان کودهای بیولوژیک در کشاورزی پایدار و ارگانیک مفید خواهد بود.

نتایج حاضر نشان داد که تیمار ترکیبی IAA و GA3 سبب افزایش فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دیسموتاز، آسکوربات پراکسیداز و گایاکول پراکسیداز در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با *A. brasilense* شده است. اما فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پلی-فنل اکسیداز و پراکسیداز دیواره‌ای در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری و در تیمار هورمونی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی-اکسیدان و کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر بیوسنتزی لیگنین در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری و تیمار هورمونی، نشانه تنش زیستی و تولید رادیکال‌های آزاد

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

- Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., & Meftah Kadmiri, I. (2021). Nitrogen fixing azotobacter species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontier in Microbiology*, 12, 628379-628382. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628379>.
- Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D. N., Kawaharada, Y., Perea, J. F., Gil-Serrano, A., Jin, H., & Ruiz-Sainz, J. E. (2016). Sinorhizobium fredii HH103 invades Lotus burtii by crack entry in a Nod Factor- and surface polysaccharide-dependent manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(12), 925-937. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-16-0195-R>.
- Albersheim, P., Darvill, A., Roberts, K., Sederoff, R., & Staehelin, A. (2011). Cell walls and plant-microbe interactions. *Plant cell walls: From chemistry to biology*, 319-363. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110038>.
- Almendras, K., García, J., Carú, M., & Orlando, J. (2018). Nitrogen-fixing bacteria associated with Peltigera cyanolichens and Cladonia chlorolichens. *Molecules*, 23(12), 3077. <https://doi.org/10.3390/molecules23123077>.
- Arnaud, J., Audfray, A., & Imbert, A. (2013). Binding sugars: from natural lectins to synthetic receptors and engineered neolectins. *Chemical Society Reviews*, 42(11), 4798-4813. <https://doi.org/10.1039/C2CS35435G>.
- Arnold, M. F., Penterman, J., Shabab, M., Chen, E. J., & Walker, G. C. (2018). Important late-stage symbiotic role of the Sinorhizobium meliloti exopolysaccharide succinoglycan. *Journal of bacteriology*, 200(13), e00665-17. <https://doi.org/10.1128/jb.00665-17>.
- Beliën, T., Van Campenhout, S., Robben, J., & Volckaert, G. (2006). Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(10), 1072-1081. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-1072>.
- Bacete, L., Melida, H., Miedes, E., & Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal*, 93(4), 614-636. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110038>. <https://doi.org/10.1111/tpj.13807>.
- Bamford, N. C., Le Mauff, F., Subramanian, A. S., Yip, P., Millán, C., Zhang, Y., & Howell, P. L. (2019). Ega3 from the fungal pathogen Aspergillus fumigatus is an endo- α -1, 4-galactosaminidase that disrupts microbial biofilms. *Journal of Biological Chemistry*, 294(37), 13833-13849. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009910>.
- Becker, M., Becker, Y., Green, K., & Scott, B. (2016). The endophytic symbiont Epichloë festucae establishes an epiphyllous net on the surface of Lolium perenne leaves by development of an expressorium, an appressorium-like leaf exit structure. *New Phytologist*, 211(1), 240-254. <https://doi.org/10.1111/nph.13931>.
- Beauchamp, C., & Fridovich, H. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Annals of Biochemistry*, 44(1), 276-87. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8).
- Bethke, G., Grundman, R. E., Sreekanta, S., Truman, W., Katagiri, F., & Glazebrook, J. (2014). Arabidopsis Pectin Methylsterases contribute to immunity against Pseudomonas syringae. *Plant Physiology*, 164(2), 1093-1107. <https://doi.org/10.1104/pp.113.227637>.
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2013). Sweet immunity in the plant circadian regulatory network. *Journal of experimental botany*, 64(6), 1439-1449. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert046>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- Buchanan, M., Burton, R. A., Dhugga, K. S., Rafalski, A. J., Tingey, S. V., Shirley, N. J., & Fincher, G. B. (2012). Endo-(1, 4)- β -Glucanase gene families in the grasses: temporal and spatial co-transcription of orthologous genes1. *BMC Plant Biology*, 12(1), 1-19. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-235>.
- Chance, B., & Maehly, A. (1955). Assay of catalase and peroxidase. *Methods in Enzymology*, 2, 764-817. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8).
- Chen, C., & Zhu, H. (2013). Are common symbiosis genes required for endophytic rice-rhizobial interactions. *Chinese Academy of Sciences*, 8, 531- 533. <https://doi.org/10.4161/psb.25453>.
- Cheval, C., Samwald, S., Johnston, M. G., de Keijzer, J., Breakspear, A., Liu, X., & Faulkner, C. (2020). Chitin perception in plasmodesmata characterizes submembrane immune-signaling specificity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(17), 9621-9629. <https://doi.org/10.1073/pnas.1907799117>.

- Cocking, E. (2003). Endophytic colonization of plant roots by nitrogen-fixing bacteria, Centre for Crop Nitrogen Fixation, University of Nottingham, 252, 169–175. <https://doi.org/10.1023/A:1024106605806>
- Couto, D., & Zipfel, C. (2016). Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 537-552. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005811>
- Creus, C. M., Sueldo, R. J., & Barassi, C. A. (1997). Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35, 939-944.
- Davidsson, P.R., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, E.T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in plant science*, 4, 191. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00191>
- Denham, S. T., Verma, S., Reynolds, R. C., Worne, C. L., Daugherty, J. M., Lane, T. E., & Brown, J.C. (2018). Regulated release of cryptococcal polysaccharide drives virulence and suppresses immune cell infiltration into the central nervous system. *Infection and immunity*, 86(3), e00662-17. <https://doi.org/10.1128/IAI.00662-17>
- Dutta, S., & Podile, A. R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone. *Critical Review in Microbiology*, 36, 232-244. <https://doi.org/10.3109.10408411003766806>
- Ferrari, S., Savatin, D. V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., & Lorenzo, G. D. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in plant science*, 4, 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00049>
- Fan, Y., Yu, X., Guo, H., Wei, J., Guo, H., Zhang, L., & Zeng, F. (2020). Dynamic transcriptome analysis reveals uncharacterized complex regulatory pathway underlying dose IBA-induced embryogenic re-differentiation in cotton. *International Journal of Molecular Science*, 21, 426–450. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00049>
- Feng, F., Sun, J., Radhakrishnan, G.V., Lee, T., Bozsóki, Z., Fort, S., & Oldroyd, G.E. (2019). A combination of chitoooligosaccharide and lipochitoooligosaccharide recognition promotes arbuscular mycorrhizal associations in *Medicago truncatula*. *Nature Communications*, 10(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12999-5>
- Fukami, J., Ollero, F. J., Osa, C. D., Fernandez, V., Nogueira, M. A., Megaias, M., & Hungaria, M. (2018). Antioxidant activity and induction of mechanisms of resistance to stresses related to the inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Archive of Microbiology*, 200, 1191-1203. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.2.280-300.2004>
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300. <https://doi.org/10.1128/mmbr.68.2.280-300.2004>
- García de Salamone, I. E., Di Salvo, L. P., Escobar Ortega, J. S., Boa Sorte, P. M. F., Urquiaga, S., & Teixeira, K. R. S. (2010). Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil*, 336(1–2), 351–362. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0487-y>
- Gow, N. A. R., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, 5, 10.1128-101135. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0035-2016>
- Gureeva, M., Kirillova, M. S., Trandina, V. A., Krykova, V. A., Eremina, A., Alimova, A. A., Grabovich, M. Y., & Gureev, R. P. (2025). Effect of bacteria from the genus *Azospirillum* on oxidative stress levels in wheat *Triticum aestivum* L. in the presence of Copper, Nickel, and Lead. *Microorganisms*, 13(2), 334-347. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13020334>
- Hodges, D. M., DeLong, J. M., Forney, C. F., & Prange, R. K., (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta*, 207, 604-611. <https://doi.org/10.1007/s004250050524>
- Jnawali, A. D., Ojha, R. B., & Marahatta, S. (2015). Role of *Azotobacter* in soil fertility and sustainability—A review. *Advances in Plants and Agricultural Research*, 2(6), 1–5 <https://doi.org/10.15406/apar.2015.02.00069>
- Kang, X., Kirui, A., Muszyński, A., Widanage, M. C. D., Chen, A., Azadi, P., & Wang, T. (2018). Molecular architecture of fungal cell walls revealed by solid-state NMR. *Nature communications*, 9(1), 1-12.
- Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57, 315-319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Kutschera, A., Dawid, C., Gisch, N., Schmid, C., Raasch, L., Gerster, T., & Ranf, S. (2019). Bacterial medium-chain 3-hydroxy fatty acid metabolites trigger immunity in Arabidopsis plants. *Science*, 364(6436), 178-181. <https://doi.org/10.1126/science.aau1279>
- McCready, R., Guggolz, J., Silveira, V., & Owens, H. (1950) Determination of starch and amylose in vegetables, application to peas. *Analytical Chemistry*, 22, 1156-1158.
- Nakano, Y., & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867–80. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>

- Omokolo, N. D., Boudjeko, T., & Whitehead, C. S. (2005). Comparative analyses of alterations in carbohydrates, amino acids, phenols and lignin in roots of three cultivars of *Xanthosoma sagittifolium* infected by *Pythium myriotylum*. *South African Journal of Botany*, 71, 432-440. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30116-2](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30116-2)
- Repetto, M. G., & Semprine, J. (2012). Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. book Chapter in book: *Lipid Peroxidation*. <https://doi.org/10.5772/45943>
- Reuveni, R., (1995), Biochemical marker of disease resistance, *Molecular Methods in Plant Pathology*, 42, 99-114.
- Sagi, M., & Fluhr, R. (2006). Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant physiology*, 141, 336-340. <https://doi.org/10.1104/pp.106.078089>.
- Schlegel, H. G. (1956). Die verwertung organischer säuren durch Chlorella im licht. *Planta*, 47, 510-526.
- Sharifalsadat, Z., Aghdasi, M., Ghanati, F., & Arzanesh, M. (2023). Harmonized biochemical modification of cell walls to get permission for entrance of *Azospirillum sp.* to rice roots. *Plant Science*. 335, 111823. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111823>
- Sehrawat, S., Reddy, P. B., Rajasagi, N., Suryawanshi, A., Hirashima, M., & Rouse, B. T. (2010). Galectin-9/TIM-3 interaction regulates virus-specific primary and memory CD8+ T cell response. *PLoS pathogens*, 6(5), e1000882. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000882>
- Sergieff, I., Alexieva, V., & Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Comptent Rend Academia Bulgarian Science*, 51(3), 121-124. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- 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(3), 95. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6030095>
- Yoshida, S., & Cornel, V. (1976). Nitrogen nutrition, leaf resistance, and leaf photosynthetic rate of the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 22(2), 207-211
- Zhang, J., Hussain, S., Zhao, F., Zhu, L., Cao, X., Yu, S., & Jin, Q. (2018). Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on nitrogen transformation and enzyme activity in the rice rhizosphere. *Journal of Soils and Sediments*, 18(4), 1453-1465. <https://doi.org/10.1007/s11368-017-1861-7>

Antioxidant defense system response of rice in interaction with two *Azospirillum* species

Seydeh Zeynab Sharifsadat¹, Mahnaz Aghdasi^{*2}, Faezeh Ghanati³, Mohammad Hossein Arzanesh⁴

1. Ph.D, graduate, Department of Biology-Plant Physiology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran

2. Professor, Department of Biology-Plant Physiology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran

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

4. Assistant Professor, Department of Soil and Water Research, Golestan Agricultural and Natural Resources Research Center, Gorgan, Iran

Received: 11-02-2025

Accepted: 18-05-2025

Abstract

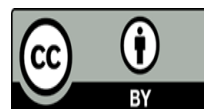
Azospirillum is one of the most important Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) which has capacity to fix atmospheric nitrogen. This study was conducted to investigate the effect of two *Azospirillum* species inoculation with auxin (IAA) and gibberellin (GA3) treatment on the antioxidant enzymes activity and some biochemical factors during their entry into the rice (*Oryza sativa* var. shiroodi) roots seedlings. Rice seedlings were grown in Yoshida medium for 21 days and then were inoculated with *A. brasilense* and *A. irakens* in the presence of 0, 100, and 200 ppm of IAA or GA3 alone or a combination of both. After 4 weeks treatment, roots of seedlings was harvested and used to study the activity of antioxidants and biochemical factors. The experiment was performed in complete randomized design with 3 replications. The obtained results showed that the activity of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase and guaiacol-peroxidase enzymes were significantly increased in seedlings which inoculated with *A. brasilense* in combinations with IAA plus GA3 treatment. On the other hand, the activity of catalase, poly phenol oxidase and wall peroxidase was significantly decreased after inoculating with bacteria and IAA and GA3 treatment. Meanwhile, the amount of total and soluble protein and sugar was significantly increased after inoculation with bacteria and hormones treatment, compared to control samples. It seems enzymatic antioxidant system provide necessary conditions for bacteria entry into rice root organ.

Keywords: *Azospirillum*, Auxin, Cell wall loosening, Gibberellin, Nitrogen fixation

Citation: Sharifsadat, S. Z., Aghdasi, M., Ghanati, F., Arzanesh, M. H. (2025). Antioxidant defense system response of rice in interaction with two *Azospirillum* species. *Plant Production and Genetics*, 6(1), 19-34. <https://doi.org/10.22034/PLANT.2025.143111.1145>

Copyrights:

Copyrights rights for this article is retained by the author (s), with publication rights granted to Plant Production and Genetics. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.



*Corresponding Author Email: m.aghdasi@gu.ac.ir