Nova Biologica Reperta 6(4): 415-423 (2020)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.6.4.415

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۴، صفحات ۴۱۵ الی ۴۲۳ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

بررسی روش‌های غربالگری و پروفایل آنزیمی باکتری‌های اندوفیت گیاهان زراعی

سمانه خسروشاهی[۱]، انسیه صالح قمری[۲]، محمدعلی آموزگار[۳] و پروانه صفاریان[۱]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛[۲]گروه علوم سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران؛[۳]گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: انسیه صالح قمری، esaleh@khu.ac.ir

چکیده. از آن‌جا که در سال‌های اخیر باکتری‌های اندوفیت گیاهی کاربردهای متنوع و مفیدی در بیوتکنولوژی پیدا کرده‌اند، توجه زیادی به جداسازی، شناسایی و ارزیابی این نوع میکروارگانیسم‌ها شده است. در این مطالعه با توجه به دشوار بودن سترون سازی سطوح بافت‌های گیاهی از باکتری‌های اپی‌فیت، کارایی سه روش مختلف غربالگری باکتری‌های اندوفیت شامل ۱- استریل کردن با آب ژاول، ۲- استریل کردن متناوب (تندال تغییر یافته) و ۳- استریل کردن با تریتون X100 و آب ژاول مورد ارزیابی قرار گرفت. روش تندال تغییر یافته روشی ابداعی است که در این پژوهش به منظور حذف مناسب اسپورهای درونی باکتری‌های اپی‌فیت که در جداسازی اندوفیت‌ها مانع به حساب می‌آیند، به‌کار رفت. بیش‌ترین تعداد باکتری‌های اندوفیت از گیاهان دولپه‌ای و از برگ جداسازی شدند. همچنین باکتری‌های اندوفیت از نظر تولید آنزیم‌های مختلف هیدرولازی بررسی شدند در این میان آنزیم پروتئاز در طیف وسیعی از باکتری‌های اندوفیت و به مقدار بیشتر از سایر آنزیم‌ها تولید شد. سویه EndoA، مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت و مشخص شد که به میزان ۱۰۰ درصد مشابه *Bacillus halotolerans* است.

واژه‌های کلیدی. آنزیم‌های هیدرولازی، باسیلوس هالوتولرانس، پروتئاز، زایلاناز، کیتیناز

Screening methods and enzyme profile of agricultural plant-endophytic bacteria

Samaneh Khosroshahi[1], Ensieh Salehghamari[2], Mohammad Ali Amoozegar[3] & Parvaneh Saffarian[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Basic Science, Islamic Azad University, Tehran, Iran; [2]Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran; [3]Department of Microbiology, School of Biology, University College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
Correspondent author: Ensieh Salehghamari, esaleh@khu.ac.ir

Abstract. Nowadays plant endophytic bacteria have found diverse and useful applications in biotechnology; therefore, much attention has been paid to the isolation, identification, and evaluation of these microorganisms. Since the sterilizing plant tissue surfaces from epiphytic bacteria is difficulty, the efficacy of three different screening methods for endophytic bacteria including 1- HClO sterilization, 2- Periodic sterilization (modified tyndallization) and 3- Triton X100 and HClO sterilization, was evaluated in this study. The modified Tyndallization is an innovative method used in this study to appropriately remove the internal spores of epiphytic bacteria, considered to be an obstacle to the isolation of endophytes. Most of the endophytic bacteria were isolated from dicotyledons and leaves. Endophytic bacteria were also studied for the production of different hydrolase enzymes, whereas the protease enzyme was produced in a wide range of endophytic bacteria in greater quantities than other enzymes. The EndoA strain was molecularly identified and found to be 100% similar to *Bacillus halotolerans*.

Key words. *Bacillus halotolerans*, chitinase, hydrolytic enzymes, protease, xylanas

Received 10.07.2019/ Revised 25.09.2019/ Accepted 15.10.2019/ Published 10.01.2020
دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۹/ اصلاح: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳/ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۲/ انتشار: ۱۳۹۸/۱۰/۲۰

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]

مقدمه

باکتری‌های اندوفیت، میکروارگانیسم‌های ویژه‌ای هستند که بدون ایجاد هیچ نوع بیماری در درون بافت‌های سالم گیاه زندگی می‌کنند (Gasser *et al*., 2011). این میکروارگانیسم‌ها اغلب با تولید متابولیت‌های خاص به دفاع در برابر انگل‌ها و میکروارگانیسم‌های بیماریزای گیاهی و همچنین بقای میزبان کمک می‌کنند (Sanchez-Lopez, *et al*., 2018). این میکروارگانیسم‌ها که به صورت یک جامعه میکروبی هستند در درون اندام‌های مختلف گیاهی از جمله ریشه، ساقه و برگ زندگی می‌کنند و میکروبیوم همراه گیاه نامیده می‌شوند. رابطه بین گیاه و میکروبیوم آن یک رابطه همزیستی اجباری است و در این رابطه گیاه برای باکتری اندوفیت محل سکونت پایدار و باکتری اندوفیت برای گیاه مواد مورد نیاز مانند نیتروژن تثبیت شده، پتاسیم، آهن و فسفات محلول و اندول استیک اسید را فراهم می‌کند (Reinhold-Hurek & Hurek 2011; Liu *et al*., 2017).

در سال‌های اخیر به دلیل کاربردهای متنوع و مفید باکتری‌های اندوفیت توجه زیادی به جداسازی و شناسایی این نوع میکروارگانیسم‌ها شده است. از جمله این کاربردها می‌توان به ایجاد افزایش رشد در گیاهان، تثبیت نیتروژن، حذف آلاینده‌های زیستی به کمک گیاهان، تولید آنتی‌بیوتیک، آنتی‌تومور و آنزیم-های هیدرولازی توانمند این باکتری‌ها مانند سلولاز، پکتیناز، کیتیناز، آمیلاز، پروتئاز و لیپاز اشاره نمود (Lodewyckx *et al*., 2002; Christina *et al*., 2013). بنابراین باید به منظور کشف انواع محصولات فعال زیستی در بخش‌های مختلف بیوتکنولوژی، تنوع این باکتری‌ها در گیاهان مورد بررسی قرار گیرد و روابط آن‌ها با گیاه میزبان مطالعه شود.

در این مطالعه سه روش جداسازی مختلف برای غربالگری باکتری‌های اندوفیت گیاهان منطقه پارک پردیسان تهران مورد ارزیابی قرار گرفت. پروفایل آنزیمی این باکتری‌ها بررسی شد و نهایتا یکی از این باکتری‌ها مورد شناسایی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع آوری مواد گیاهی

نمونه‌های گیاهی شامل گوجه فرنگی، جو، گندم، تره، توت، بنجامین، یونجه، عشقه، تاج خروس، هویج، گل جعفری و انار به صورت تصادفی جمع آوری شدند. نمونه‌ها از لواسان در دامنه رشته کوه البرز (۳۵/۸ عرض شمالی و ۵۱/۶ طول شرقی) و پارک پردیسان در شمال غربی تهران (۳۵/۷۴ عرض شمالی و ۵۱/۳۵ طول شرقی) جمع آوری شدند.

روش‌های جداسازی باکتری‌های اندوفیت

از تمامی قسمت‌های گیاهان مذکور (برگ، ریشه، ساقه و میوه) نمونه برداری صورت گرفت. برای حذف گرد و غبار و همچنین باکتری‌های اپی فیت از سطوح خارجی گیاهان از سه روش مختلف استریل کردن استفاده شد و کارایی آن‌ها با یکدیگر مقایسه گردید.

روش اول: نمونه‌های گیاهی به آرامی و با آب در حال جریان به منظور حذف گرد و غبار شستشو داده شدند، سپس به قطعاتی با ابعاد چهار در چهار میلی‌متر تکه تکه و به مدت ۲۰ دقیقه در توبین ۲۰ (۰/۰۱ درصد) غوطه‌ور شدند. سپس نمونه‌ها به ترتیب در اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه، آب ژاول سه درصد به مدت سه دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه غوطه‌ور شدند و با آب مقطر استریل سه بار شستشو داده شدند. نمونه‌ها با تیغ به قطعات کوچک خرد شده و در آب مقطر استریل به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شدند. با استفاده از لوپ از آب اطراف بافت برداشته و روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (Teachowison *et al*., 2003).

روش دوم: نمونه‌های گیاهی به شش قطعه تقسیم شده و به مدت ۲۰ دقیقه در توبین ۲۰ (۰/۰۱ درصد) غوطه‌ور شدند و بقیه مراحل استریل کردن مانند روش اول انجام شد. سپس نمونه‌ها به محیط کشت نوترینت براث منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. مجدداً مراحل استریل سازی بر روی قطعات گیاهی انجام شد. سپس دو قطعه از این قطعات بر روی محیط کشت نوترینت آگار قرار داده شدند. چهار قطعه دیگر در محیط نوترینت براث مانند قبل گرماگذاری شدند. سپس مراحل شستشو برای قطعات گیاهی که در محیط نوترینت براث بودند انجام شد و دو قطعه از آن‌ها در محیط نوترینت آگار مانند قبل گرماگذاری شدند. دو قطعه باقیمانده ۲۴ ساعت دیگر در محیط نوتریت براث گرماگذاری شدند. نهایتاً با طی کردن تمام مراحل شستشو و قرار گرفتن بر روی محیط نوترینت آگار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. این روش به نام "تندال تغییر یافته" نامگذاری شد. روش تندال تغییر یافته، همانند روش تندال برای از بین بردن اسپورهایی است که در هر مرحله رویش می‌کنند اما از آنجایی که امکان استفاده از دما وجود نداشت از مواد شیمیایی مانند آب ژاول و اتانول استفاده شد. این روش به صورت ابداعی است و برای اولین بار در این پژوهش به کار رفته است.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]

روش سوم: نمونه‌های گیاهی به قطعات کوچک برش داده شده، در بطری‌های جداگانه ریخته و با محلول تریتون X100 (۰/۱ درصد) به مدت ۲۰ دقیقه شستشو داده شد. درب بطری‌ها با توری نازک پوشانیده شده و به مدت ۴۵ دقیقه در زیر آب جاری قرار داده شدند. بعد از خشک کردن نمونه‌ها مراحل استریل سازی به کمک اتانول ۷۰ درصد (دو تا پنج دقیقه) و آب ژاول ۵۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت. نمونه‌ها مجدد با آب مقطر استریل شستشو داده شده و سپس نمونه‌های ساقه به صورت عمودی و ریشه و برگ به حالت افقی روی پلیت نوترینت آگار قرار گرفته و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (Reece *et al*., 2014).

در هر سه روش پس از انجام کامل مراحل استریل کردن نمونه‌های بافتی، بلافاصله قبل از گرماگذاری از سطح بافت نمونه‌ای به عنوان شاهد کشت داده شد تا از استریل بودن سطوح بافت‌ها اطمینان حاصل شود.

در هر سه روش به منظور جداسازی و نگهداری سویه‌ها از محیط کشت نوترینت آگار با pH ۷/۴-۷/۲ استفاده شد و به منظور مهار رشد قارچ‌ها در مراحل جداسازی باکتری‌های اندوفیت به محیط کشت ۰/۱ درصد نیستاتین از شرکت Merck آلمان اضافه شد (Bibi *et al*., 2018). تمامی پلیت‌ها تا حداکثر ۲۵ روز در گرم‌خانه نگهداری شدند. کلنی باکتری‌هایی که به تدریج در طی زمان گرماگذاری رشد می‌کردند، به محیط کشت نوترینت آگار منتقل شده و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری و به روش کشت چهار مرحله‌ای خالص سازی شدند. از سویه‌های جداسازی شده، برای بررسی تولید آنزیم‌های هیدرولازی استفاده شد. به منظور ذخیره سازی باکتری‌ها، از محیط تریپتیکاز سوی براث به همراه ۲۰ درصد گلیسرول و دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد.

بررسی توانایی تولید برخی از آنزیم‌های هیدرولازی

به منظور بررسی توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولازی پروتئاز، آمیلاز، کیتیناز و زایلاناز به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با غلظت معادل نیم مک فارلند از سویه‌های اندوفیت خالص‌سازی شده، در محیط‌های سنجش مربوطه کشت داده شده و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. همگی آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام شدند.

تعیین فعالیت آنزیم آمیلاز خارج سلولی

برای سنجش تولید آنزیم آمیلاز به صورت کیفی از محیط کشت نوترینت آگار حاوی یک درصد نشاسته استفاده شد. پس از گرماگذاری پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت، چند قطره معرف لوگل بر روی آن ریخته شد. ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی نشان دهنده تولید آنزیم آمیلاز بود (Cowan, 1991).

تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز خارج سلولی

برای سنجش آنزیم پروتئاز سویه‌های جداسازی شده از محیط کشت با ترکیب عصاره مخمر ۵/۵ درصد، گلوکز ۱ درصد و کازئین ۰/۵ درصد استفاده شد. فعالیت پروتئولیتیک، پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری و با ایجاد هاله شفاف اطراف کلنی تشخیص داده شد (Cowan, 1991).

تعیین فعالیت آنزیم کیتیناز خارج سلولی

فعالیت آنزیم کیتیناز با استفاده از محیط کشت پایه حاوی کلرید سدیم ۰/۲ درصد، کیتین کلوئیدی ۲/۵ درصد و عصاره مخمر ۰/۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. پس از گرماگذاری به مدت یک هفته، هاله شفاف در اطراف کلنی‌های تولید کننده آنزیم کیتیناز مشاهده شد (Carrim *et al*., 2006).

تعیین فعالیت آنزیم زایلاناز خارج سلولی

برای بررسی تولید آنزیم زایلاناز از محیط کشت با ترکیب عصاره مخمر ۰/۵ درصد، زایلان ۰/۲ درصد و پپتون ۱ درصد استفاده شد و پس از یک هفته گرماگذاری، چند قطره معرف کانگو قرمز ۱/ ۰ درصد بر روی کلنی رشد یافته و اطراف آن، ریخته شد و به مدت ۳۰ ثانیه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس پلیت با سدیم کلرید یک مولار به مدت ده دقیقه پوشانیده شد. تولید آنزیم با ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی تشخیص داده شد (Wejse & Ingvorsen, 2003) قطر هاله‌های تولید شده در اثر فعالیت آنزیمی توسط خط کش اندازه گیری شد.

شناسایی مولکولی باکتری اندوفیت انتخاب شده به روش تکثیر ژن 16S rDNA و بررسی روابط فیلوژنتیکی آن

DNA ژنومی طبق روش تغییر یافته Marmur استخراج شد (Marmur, 1961). از بیومس باکتریایی در بافر TE سوسپانسیون درست شد و با آنزیم لیزوزیم دیواره سلولی لیز شده، سپس به کمک محلول SDS ۱۰ درصد غشاء سلولی از بین رفته و به کمک محلول کلرید سدیم پنج مولار و کلروفرم پروتئین‌ها رسوب داده شدند. سپس به منظور رسوب دادن DNA از ایزوپروپانول سرد استفاده شد. DNA ژنومی در بافر TE به صورت محلول نگهداری شد.

به منظور تکثیر ژن 16S rDNA از پرایمرهای 1492R (5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′) و 27F (5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′، M به معنای A و یا C است.) استفاده شد (Kim *et al*., 2011). واکنش PCR در دمای واسرشتی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰۰ ثانیه شروع شد و در ۳۰ سیکل شامل دمای واسرشتی ۹۵ درجه

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]

سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه و دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه ادامه یافت. نهایتا واکنش با ۴۲۰ ثانیه در دمای سنتز ۷۲ درجه سانتی‌گراد خاتمه پیدا کرد. محصولات PCR، بوسیله ژل الکتروفورز مورد بررسی قرار گرفتند و برای تعیین توالی، نمونه‌ها به شرکت ماکروژن در کشور کره جنوبی ارسال شدند.

به منظور بررسی توالی ژن 16s rRNA سویه EndoA از نرم-افزار Bioedit استفاده شد. توالی 16S rDNA سویه EndoA با سایر توالی‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon-e server، BLAST شد و شباهت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت (Kim *et al*., 2012). از نرم افزار ClustalX برای هم‌ردیف سازی توالی‌های مشابه با EndoA که از EzTaxon گرفته شده بودند استفاده شد و نرم افزار MEGA6 برای ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از الگوریتم Maximum Likelihood به کار گرفته شد.

نتایج

بررسی روش‌های جداسازی باکتری‌های اندوفیت

نمونه‌های گیاهی با هر سه روش استریل سازی تیمار شده و باکتری‌های اندوفیت از آن‌ها جدا و خالص سازی شدند. از مجموع ۲۴ سویه اندوفیت خالص سازی شده (شکل ۱)، ۷۱ درصد سویه‌ها به کمک روش اول و ۲۹ درصد آن‌ها به کمک روش دوم جداسازی شدند. با استفاده از روش سوم هیچ سویه اندوفیتی جداسازی نشد (شکل۲). کلنی حدود ۱۱ درصد از سویه‌ها در روز سوم مشاهده شد، اما کلنی حدود ۳ درصد از اندوفیت‌ها پس از ۲۱ روز از شروع گرماگذاری مشاهده شد.

از باکتری‌های اندوفیت خالص سازی شده، ۳۳ درصد از سویه‌ها از ریشه، ۸ درصد از ساقه، ۴۵ درصد از برگ و ۱۲ درصد از میوه جدا شدند. هیچ باکتری اندوفیتی از گل نمونه‌های گیاهی جداسازی نشد (شکل ۳).

از سویه‌های اندوفیت جداسازی شده، ۱۶ درصد ازسویه‌های اندوفیت از گیاهان تک لپه، ۵۵ درصد از گیاهان دولپه و ۲۹ درصد از گیاهان دو لپه ای نو جداسازی شدند.

بررسی توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولازی

به منظور بررسی توانایی تولید آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز، کیتیناز و زایلاناز، باکتری‌های اندوفیت بر روی محیط‌های کشت سنجش مربوط به هر آنزیم، کشت داده شدند. نتایج نشان داد که ۱۲/۵ درصد از سویه‌های اندوفیت دارای آنزیم زایلاناز، ۱۲/۵ درصد دارای آنزیم کیتیناز و ۳۳ درصد از سویه‌ها دارای آنزیم پروتئاز هستند (شکل ۴).

قطر هاله‌ها به کمک خط کش اندازه‌گیری شد. همچنین در بین آنزیم‌های مورد بررسی بالاترین میزان تولید (قطر هاله دو سانتی‌متر) مربوط به آنزیم پروتئاز بود. این آنزیم در طیف وسیعی از باکتری‌های اندوفیت به نسبت سایر آنزیم‌های مورد مطالعه تولید شد و قطر هاله تولید شده توسط آنزیم مذکور در اغلب سویه‌های اندوفیتی مورد مطالعه دو سانتی‌متر بود (شکل ۵). قطر هاله تولید شده توسط آنزیم زایلاناز در سویه‌های تولید کننده این آنزیم یک سانتی‌متر و برای آنزیم کیتیناز ۰/۵ سانتی-متر اندازه گیری شد.

در بین باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده ۱۶/۸ درصد از سویه‌ها، تولید کننده دو نوع از آنزیم‌های مورد بررسی بودند بدین صورت که تعداد ۸/۴، ۴/۲ و ۴/۲ درصد از باکتری‌ها، به ترتیب تولید کننده "پروتئاز و زایلاناز"، "پروتئاز و کیتیناز" و "کیتیناز و زایلاناز" بودند. همچنین برخی سویه‌ها فقط یک نوع آنزیم را تولید می‌کردند بدین صورت که تعداد ۲۰/۹ و ۴/۲ درصد سویه‌های اندوفیت خالص سازی شده، تولید کننده به ترتیب فقط آنزیم پروتئاز و کیتیناز بودند. هیچ یک از باکتری‌های اندوفیت، تولید کننده آنزیم آمیلاز نبودند و هیچ کدام از سویه‌ها تولید کننده هر سه آنزیم پروتئاز، کیتیناز و زایلاناز نبودند. در نهایت ۱۴ سویه اندوفیت هیچ یک از آنزیم‌های مورد بررسی را تولید نمی‌کردند.

از آنجایی که آنزیم پروتئاز بیش‌ترین تولید را در بین باکتری‌ها داشت، سویه اندوفیت EndoA که از ریشه گیاه گوجه فرنگی جدا شده بود و بیش‌ترین میزان تولید آنزیم پروتئاز و همچنین بیش‌ترین تنوع در تولید آنزیم‌های هیدرولازی مورد بررسی را نشان داده بود، برای شناسایی مولکولی انتخاب شد.

شناسایی مولکولی و تعیین موقعیت فیلوژنی سویه‌های اندوفیت

سویه اندوفیتی EndoA به منظور شناسایی مولکولی انتخاب شد. پس از استخراج DNA ژنومی، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با هدف تکثیر ژن 16S rRNA انجام شد (شکل ۶).

بعد از توالی‌یابی، با توجه به آنالیز ژن 16S rRNA مشخص شد که سویه اندوفیت EndoA به میزان ۱۰۰ درصد مشابه گونه *Bacillus halotolerans* است. توالی این ژن در GenBank با شماره دسترسی MK817516 ثبت شد. درخت فیلوژنی سویه EndoA در شکل ۷ آورده شده است.

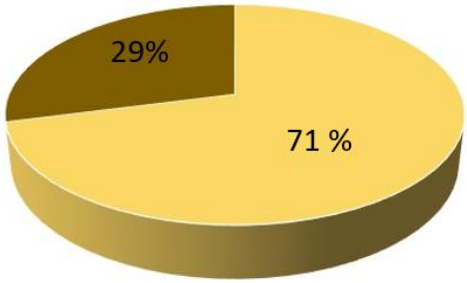
بحث

اندوفیت‌های میکروبی در تمامی گیاهان آوندی حضور دارند. باکتری‌های اندوفیت از میزبانشان در مقابل عوامل عفونی و شرایط نامطلوب به وسیله تولید متابولیت‌های ثانویه فعال زیستی،

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]

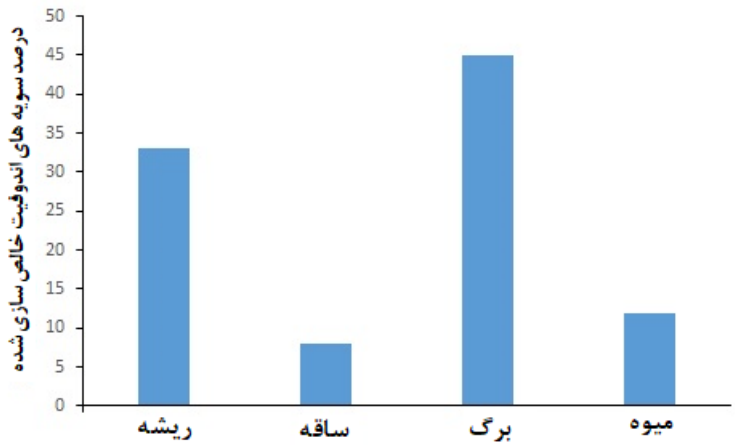
شکل ۱- رشد باکتری اندوفیت در اطراف بافت گیاهی، استریل شده به روش دوم غربالگری باکتری‌های اندوفیت.

Fig. 1. Endophyte growth around plant tissue, sterilized by the second method of endophytic bacterial screening.



شکل ۲- مقایسه روش‌های مختلف برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت. روش اول ۷۱ درصد (رنگ روشن) و روش دوم ۲۹ درصد (رنگ تیره)

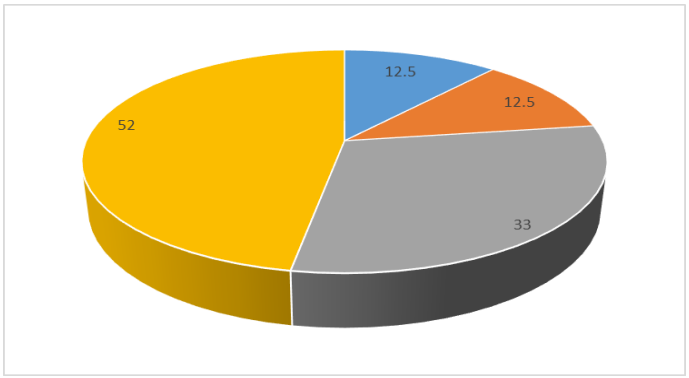
Fig. 2. Comparison of different methods for isolation of endophytic bacteria. The first method, 71% (bright color) and the second method, 29% (dark color).



شکل ۳- مقایسه اندام‌های مختلف گیاهی از نظر مقدار سویه اندوفیت خالص سازی شده از آن‌ها.

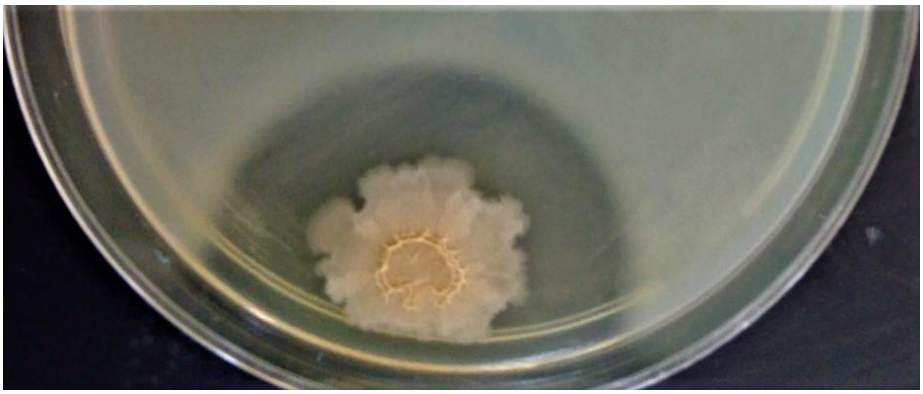
Fig. 3. Comparison of different plant organs in terms of the amount of their purified endophytic strains.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]



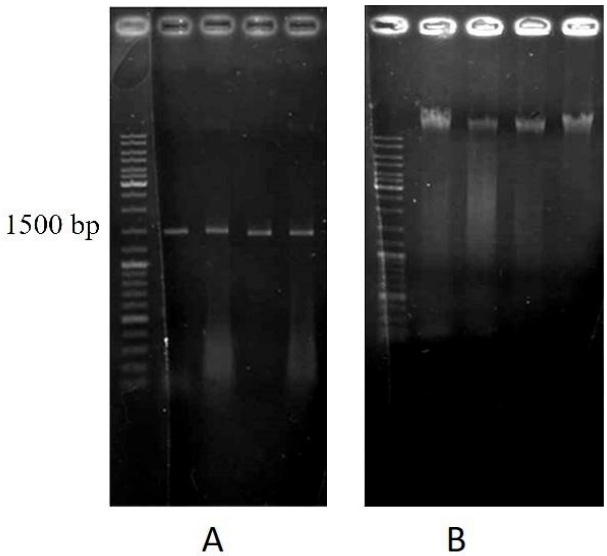
شکل ۴- درصد توانایی تولید سه آنزیم هیدرولازی پروتئاز (خاکستری)، کیتیناز (آبی) و زایلاناز (نارنجی) در سویه‌های اندوفیت خالص‌سازی شده. رنگ زرد نشان دهنده درصد سویه‌هایی است که هیچ آنزیمی تولید نکرده‌اند.

Fig. 4. The ability to produce protease (gray), chitinase (bleu) and xylanase (orang) in purified endophytic strains. Yellow color shows the percentage of strains with no enzyme production.



شکل ۵- نمونه‌ای از تولید آنزیم پروتئاز توسط سویه‌های اندوفیت

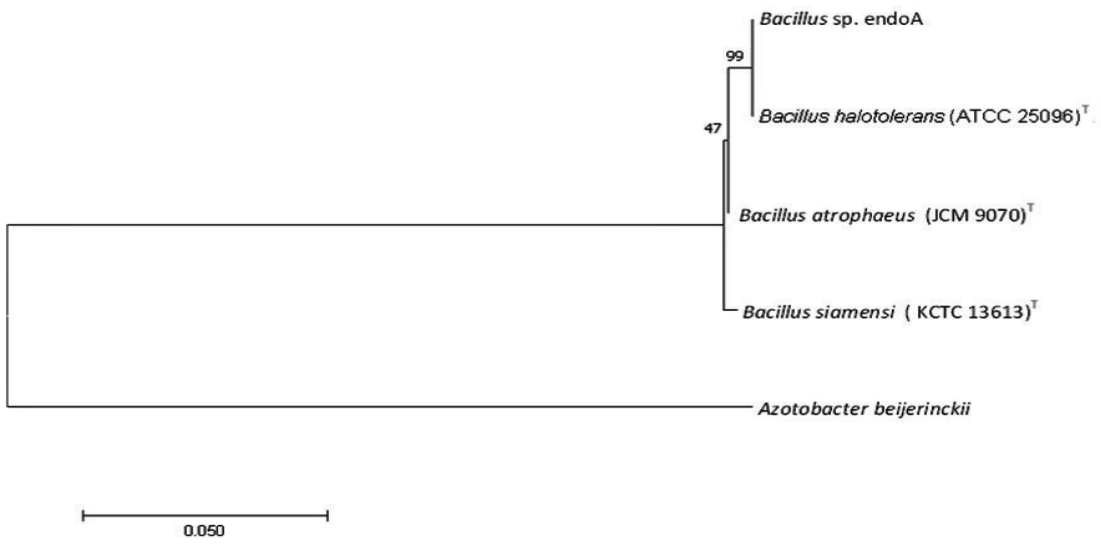
Fig. 5. Protease enzyme produced by endophytic strains.



شکل ۶-شناسایی مولکولی سویه اندوفیتی EndoA. A. استخراج DNA ژنومی. **B**. تکثیر ژن 16S rRNA.

Fig. 6. Molecular identification of endophytic strain EndoA. **A.** genomic DNA extract. **B.** proliferation of 16s rRNA gene.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]



شکل ۷- درخت فیلوژنی سویه اندوفیتی EndoA. *Azetobacter beijerinckii* به عنوان گروه خارجی انتخاب شد. ارزش بوت استرپ در محل‌های انشعاب آورده شده است. بار= ۵ درصد

Fig. 7. The phylogenetic tree of EndoA endophytic strain and its close relatives. *Azotobacter beijerinckii* was selected as an outgroup. Bootstrap value is given in the branching region. Bar = 5%.

محافظت می‌کنند و بنابراین نقش مهمی در زندگی میزبانشان ایفا می‌کنند (Malinowski *et al*., 2005; Malinowski & Belesky, 2006; Tintjer & Rudgers, 2006). تاکنون وجود این میکروارگانیسم‌های هم زیست با گیاه ثابت شده اما تنوع و توزیع آن‌ها ناشناخته مانده است. در این پژوهش ۲۴ سویه اندوفیت مختلف از انواع گیاهان تک لپه، دولپه و دولپه‌ای نو جداسازی شدند. برای این منظور از سه روش جداسازی استفاده شد. علت مقایسه این روش‌ها سختی استریل کردن سطح گیاه است، زیرا برخی باکتری‌های اپی‌فیت دارای اسپور درونی بوده و بنابراین نسبت به مواد شیمیایی استریل کننده مانند آب ژاول مقاوم هستند. همچنین از آنجایی که رشد باکتری‌های اندوفیت به دلیل انتقال باکتری از درون گیاه به محیط کشت زمان بیشتری به نسبت رشد باکتری‌های سطحی گیاه نیاز دارد، باکتری‌های اپی‌فیت به سرعت رشد کرده و سطح پلیت را می‌پوشانند و تشخیص اپی‌فیت از اندوفیت غیر ممکن می‌شود. در نتیجه یافتن روشی بهینه که باکتری‌های اپی‌فیت دارای اسپور را از بین ببرد، اما به باکتری‌های اندوفیت آسیبی وارد نکند، از اهمیت به سزایی برخوردار است. با توجه به نتایج به دست آمده روش اول بیش‌ترین میزان جداسازی اندوفیت را به خود اختصاص داد (شکل ۲). همچنین علت به کارگیری روش دوم که طولانی‌تر از بقیه روش‌ها و ابداعی است و دومین رتبه در جداسازی اندوفیت‌ها را به خود اختصاص داده است، از بین بردن اسپورهایی است که در هر مرحله از مراحل سه گانه این روش، تازه رویش می‌کنند. در واقع این روش همانند روش تندالیزاسیون است، اما به جای حرارت از مواد شیمیایی مانند آب ژاول استفاده شده است. با توجه به این‌که جداسازی اندوفیت بستگی به حذف کامل باکتری‌های اپی‌فیت دارد و اپی فیت‌های دارای اندوسپور به سختی از بین می‌روند، این روش توانست در آزمایشات کنترل نتیجه بهتری نسبت به روش‌های دیگر از خود نشان دهد. به طور مثال در روش اول تعداد نمونه‌هایی که به دلیل استریل نشدن سطحی بافت‌ها در آزمایش کنترل کنار گذاشته می‌شدند، حدود ۷۰ درصد بودند. اما در روش دوم تنها ۱۰ درصد از نمونه‌ها به علت آلودگی کنار گذاشته شدند.

بر اساس نتایج به دست آمده، بیشتر سویه‌های اندوفیتی از برگ گیاهان و سپس از ریشه آن‌ها جداسازی شدند (شکل ۳). در گزارش دیگری نیز که به منظور جداسازی اندوفیت‌ها انجام گرفته است، بیش‌ترین میزان جداسازی مربوطه به اندام برگ گیاهان است (Bloemberg *et al*., 2006). همچنین در مطالعه‌ای دیگر بیش‌ترین سویه‌های اندوفیتی از ریشه و سپس از ساقه و برگ جداسازی شدند (De Almeida Lopes, 2018). در مطالعه دیگری که برروی درختان مانگرو انجام شده بود، بیش‌ترین میزان جداسازی باکتری‌های اندوفیت از برگ و سپس از ریشه جداسازی شدند (Ntabo *et al*., 2018). همچنین در این تحقیق بیش‌ترین میزان باکتری‌های اندوفیت از گیاهان دولپه‌ای جداسازی شدند که این نتیجه پیش از این هم مشاهده شده بود (Arnold & Engelbrecht, 2007).

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]

از آنجایی که آنزیم‌های تولید شده از باکتری‌های اندوفیت عملکردی بسیار حائز اهمیت در گیاهان دارند، در این پژوهش به بررسی تولید چند آنزیم هیدرولازی در باکتری‌های اندوفیت پرداخته شد. در این پژوهش بیش‌ترین میزان تولید آنزیمی در باکتری‌های اندوفیت، آنزیم پروتئاز بود (شکل ۴). همچنین این آنزیم به نسبت سایر آنزیم‌های بررسی شده، توزیع بیشتری در بین باکتری‌های اندوفیت داشت. رتبه‌های بعدی مربوط به میزان توزیع تولید آنزیم در بین اندوفیت‌ها، متعلق به آنزیم زایلاناز و سپس کتیناز بود. در مطالعات سایرین به ترتیب آنزیم‌های سلولاز، پروتئاز و زایلاناز بیش‌ترین تولید را در باکتری‌های اندوفیت به خود اختصاص دادند (Berg *et al*., 2004). همچنین در مطالعه دیگری بیش‌ترین تولید آنزیمی مربوط به آنزیم سلولاز و آمیلاز و در درجه دوم پکتیناز و پروتئاز و نهایتا آنزیم کیتیناز بود (Ntabo *et al*., 2018). در مطالعه دیگری آنزیم آمیلاز و سلولاز بیش‌ترین تولید در میان اندوفیت‌ها را داشتند و سپس تولید آنزیم کیتیناز در رتبه بعدی قرار گرفت (Joshi *et al*., 2018).

سپاسگزاری

از دکتر محمد جعفری به دلیل راهنمایی ایشان در شناسایی گیاهان تشکر می‌نماییم.

REFERENCES

Arnold, A.E. and Engelbrecht, B.M.J. 2007. Fungal endophytes nearly double minimum leaf conductance in seedlings of a neotropical tree species. – J. Tropic. Ecol. 23: 369-372.

Bibi, F., Naseer, M.I., Yasir, M., Al-Ghamdi, A.A.K. and Azhar, E.I. 2018. LC-MS based identification of secondary metabolites from marine antagonistic endophytic bacteria. – Genet. Mol. Res. 17: 1-14.

Bloemberg, G.V. and Carvajal M.M.C. 2006. Microbial interactions with plants: a hidden world. In microbial root endophytes. 321-333. Springer, Berlin, Heidelberg.

Carrim, A.J.I., Barbosa, E.C. and Vieira, J.D.G. 2006. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates of *Jacaranda decurrens* Cham. (Carobinha-do-campo). – Braz. Arch. Biol. Tech. 49: 353-359.

Christina, A., Christapher, V. and Bhore, S.J. 2013. Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: an overview. – Pharmacogn. Rev. 7: 11-16.

Cowan, D.A. 1991. Industrial enzymes. In biotechnology, the science and the business eds moses, V. and cape, R.E. pp 311–340. Reading: Harwood Academic Publishers.

De Almeida Lopes, K.B., Carpentieri-Pipolo, V., Fira, D., Balatti, P.A., López, S.M.Y., Oro, T.H. and Degrassi, G. 2018. Screening of bacterial endophytes as potential biocontrol agents against soybean diseases. – J. App. Microbial. 125: 1466-1481.

Gasser, I., Cardinale, M., Müller, H., Heller, S., Eberl, L., Lindenkamp, N., Kaddor, C., Steinbüchel, A. and Berg, G. 2011. Analysis of the endophytic lifestyle and plant growth promotion of Burkholderia terricola ZR2-12. – Plant Soil 347: 125-137.

Joshi, S., Singh, A.V. and Prasad, B. 2018. Enzymatic activity and plant growth promoting potential of endophytic bacteria isolated from *Ocimum sanctum* and *Aloe vera*. – Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 7: 2314-2326.

Kim, M., Morrison, M. and Yu, Z., 2011. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. – J. Microbiol. Meth. 84: 81-87.

Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M. and Na, H. 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. – Int. J. Syst. Evol. Micr. 62: 716-721.

Liu, Y., Guo, J., Li, L., Asem, M.D., Zhang, Y., Mohamad, O.A., Salam, N. and Li, W. 2017. Endophytic bacteria associated with endangered plant *Ferula sinkiangensis* KM Shen in an arid land: diversity and plant growth-promoting traits. – J. Arid Land 9: 432-445.

Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R., Taghavi, S., Mezgeay, M. and der Lelie, D.V. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. – Cr. Rev. Plant Sci. 21: 583-606.

Malinowski, D.P. and Belesky, D.P. 2006. Ecological importance of *Neotyphodium* spp. grass endophytes in agroecosystems. – Grassland Sci. 52: 1-14.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]

[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]

Malinowski, D.P., Zuo, H., Belesky, D.P. and Alloush, GA. 2005. Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not perennial ryegrass infected with *Neotyphodium* spp. endophytes. – Plant Soil 267: 1-12.

Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. – J. Mol. Biol. 3: 208-218.

Ntabo, R.M., Nyamache, A.K., Lwande, W., Kabii, J. and Nonoh, J. 2018. Enzymatic activity of endophytic bacterial isolates from selected mangrove plants in Kenya. – Open Microbiol. J. 12: 354-363.

Reece, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. and Jackson, R.B. 2014. Campbell biology (No. s 1309). Boston: Pearson.1263 pp.

Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. – Curr .Opin. Plant. Biol. 14: 435-443.

Sánchez-López, A.S., Thijs, S., Beckers, B., González-Chávez, M.C., Weyens, N., Carrillo-González, R. and Vangronsveld, J. 2018. Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of *Crotalaria pumila* growing on metal mine residues. – Plant Soil 422: 51-66.

Taechowisan, T., Peberdy, J.F. and Lumyong, S. 2003. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. – World J. Microbiol. Biotechnol. 19: 381-385.

Tintjer, T. and Rudgers, J.A. 2006. Grass-herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. – New Phytol. 170: 513-521.

Wejse, P.L. and Ingvorsen, K. 2003. Purification and characterization of two extremely halotolerant xylanase from a novel halophilic bacterium. – Extremophiles 7: 423-431.

*****

How to cite this article:

Khosroshahi, S., Salehghamari, E., Amoozegar, M.A. and Saffarian, P. 2020. Screening methods and enzyme profile of agricultural plant endophytic bacteria. – Nova Biolo. Reperta 6: 415-423. (In Persian)

خسروشاهی، س.، صالح‌قمری، ا.، آموزگار، م.ع. و صفاریان، پ. ۱۳۹۸. بررسی روش‌های غربالگری و پروفایل آنزیمی باکتری‌های اندوفیت گیاهان زراعی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۴۲۳-۴۱۵.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-11-25]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.4.15.6]

[DOI: 10.29252/nbr.6.4.415]