Cereal Biotechnology and Biochemistry

Online ISSN: 2783-5170

Razi University

Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

The effects of *Bacillus amyloliquefaciens* inoculation on sensitive and tolerant wheat cultivar under salt stress conditions

Maryam Faramarzi [1] ✉ , Abbas Alemzadeh [2] & Baratali Fakheri [3]

[1]✉ Department of Production engeneering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Zabol University, Iran. E-mail: maryam.faramarzi.sh@gmail.com

[2] Department of Production engeneering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran. E-mail: alemzadeh@shirazu.ac.ir

[3] Department of Production engeneering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Zabol University, Iran. E-mail: ba_fakheri@yahoo.com

ABSTRACT

Introduction: The world's population is increasing, and the area of suitable agricultural land is not enough to supply food. Considering the nutritional value of wheat and its role in the food supply, poor soils and salty waters must be used for agriculture to solve the problem of food shortage in the world, so the use of salty waters for irrigation is inevitable in these conditions. Recently, special attention has been paid to the use of growth-promoting bacteria to moderate the effects of salinity. Microbial inoculation is better than other methods to reduce salinity stress because it minimizes production costs and environmental damage. This research was performed to investigate the effect of *B. amyloliquefaciens* inoculation on proline content, catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPx) activities, and protein expression in control and treatment plants.

Materials and methods: A factorial experiment was arranged in a completely randomized design with three replications in the greenhouse of the School of Agriculture, Shiraz University, to investigate the effect of *Bacillus* bacteria (PGPR). The first factor was salinity levels (0 and 200 MM), the second factor was an application of bacteria (inoculated and non-inoculated), and the third factor was wheat genotypes (susceptible and resistant). The suspension containing Bacillus bacteria was injected into the soil during the application of salt stress. Twenty-four hours after salinity treatment, the leaves were sampled and used for all laboratory tests, such as measuring the activity of peroxidase enzymes, the amount of proline, and protein concentration. The data were analyzed using SAS software, and protein band pattern comparison was made by the SDS PAGE method.

Results: The results showed that using bacteria under salt stress increased the proline and catalase enzyme activity in both sensitive and resistant genotypes. Nevertheless, the peroxidase enzyme did not increase under stress conditions in the resistant cultivar. It also increased the amount of total protein in the susceptible variety. The effect of bacteria on the one Hundred-Seeds weight was not significant, but since the weight of one hundred seeds is one of the growth parameters that hardly changes, the slightest change in it can be effective, which was observed in this project. Finally, applying this bacterium caused changes in the pattern of protein bands in susceptible and resistant cultivars under salinity stress and non-stress conditions. These changes included the removal of the protein band or its higher expression in different stress conditions compared to normal conditions.

Conclusion: The plant inoculation by bacteria and its use several times in the roots region of sensitive and resistant wheat has had a positive effect on biochemical properties. The application of these types of bacteria without harming the environment can be used as a practical method to control salinity stress and maintain optimal yield in salt soils. control the signals received by the bacteria from the plant and the effects of the bacteria on the growth of the plant by manipulating the bacteria, and it can be used as a suitable alternative to the complex and time-consuming methods of gene transfer to the plant.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, Salt stress, Wheat, SDS-PAGE.

Article Type: Research Article

Article history: Received: 09/11/2022, **Revised:** 24/11/2022, **Accepted:** 07/12/2022, **Published online:** 26/12/2022

Cite this article: Faramarzi, M., Alemzadeh, A., & Fakheri, B. (2022). The effects of *Bacillus amyloliquefaciens* inoculation on sensitive and tolerant wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar under salt stress conditions. Cereal Biotechnology and Biochemistry. 1 (4). 522-534. DOI: 10.22126/cbb.2023.8674.1032

© The Author(s).

Publisher: Razi University

10.22126/cbb.2023.8674.1032

بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات
شاپا الکترونیکی: ۵۱۷۰-۲۷۸۳
Homepage: https://cbb.razi.ac.ir

تأثیرات تلقیح باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* برصفات بیوشیمیایی رقم‌های حساس و متحمل گندم در شرایط تنش شوری

مریم فرامرزی [۱]✉، عباس عالم زاده [۲] و براتعلی فاخری [۳]

[۱]✉ دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه زابل، ایران. رایانامه: maryam.faramarzi.sh@gmail.com
[۲] دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، ایران. رایانامه: alemzadeh@shirazu.ac.ir
[۳] استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران. رایانامه: ba_fakheri@yahoo.com

چکیده

مقدمه: جمعیت دنیا روز به روز در حال افزایش است و وسعت خاک‌های مناسب کشاورزی برای تأمین غذا، کافی نمی‌باشد. با توجه به ارزش غذایی گندم و نقش آن در تأمین غذا، ناچار باید ازخاک‌های نامرغوب و آب‌های شور برای کشاورزی بهره گرفت تا مشکل کمبود غذا در جهان تعدیل شود. بنابراین استفاده از آب‌های شور برای آبیاری در این شرایط اجتناب‌ناپذیر است. برای حل مشکل شوری، راهکارهای زیادی وجود دارد. اخیراً توجه خاص به استفاده از باکتری-های محرک رشد برای تعدیل اثرات شوری شده است. تلقیح میکروبی برای کاهش تنش شوری، روش بهتری نسبت به روش‌های دیگر است زیرا هزینه‌های تولید و مخاطرات زیست محیطی را به حداقل می‌رساند. هدف از این تحقیق، بررسی تغییرات محتویات گیاهی و پرولین، فعالیت‌های کاتالاز (CAT) و گوایکول پراکسیداز (GPx) و الگوی باند پروتئین پس از تلقیح توسط *Bacillus amyloliquefaciens* و مقایسه با گیاهان غیر تلقیح شده بود.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی اثر باکتری باسیلوس که گونه ای ازباکتری PGPR می‌باشد، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز انجام شد. از دو سطح شوری (۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار) به‌عنوان فاکتور اول، کاربرد باکتری (بصورت تلقیح و عدم تلقیح به گیاه) به عنوان فاکتور دوم و رقم گندم (حساس و مقاوم) به‌عنوان فاکتور سوم، استفاده شد. اعمال تنش شوری در مرحله چهار برگی انجام شد. در حین اعمال تنش شوری، سوسپانسیون حاوی باکتری باسیلوس به خاک تزریق می‌شد. نمونه‌برداری از برگ‌ها، ۲۴ ساعت پس از اتمام تنش شوری انجام شد و همه سنجش‌های آزمایشگاهی از قبیل اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز، میزان پرولین و غلظت پروتئین روی بافت برگ انجام گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه شده و مقایسه الگوی باند پروتئینی با روش SDS PAGE انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کاربرد باکتری در شرایط تنش شوری، باعث افزایش میزان پرولین و فعالیت آنزیم کاتالاز در هر دو رقم حساس و مقاوم شد. اما آنزیم پراکسیداز در رقم مقاوم در شرایط تنش، افزایش پیدا نکرد. همچنین میزان پروتئین کل را در رقم حساس افزایش داد. اثر باکتری روی وزن صد دانه معنی‌دار نشد، اما از آنجا که وزن صد دانه از پارامترهای رشدی است که به سختی تغییر می‌کند، کوچکترین تغییر در آن می‌تواند مؤثر باشد که در این طرح مشاهده شد. نهایتاً کاربرد این باکتری باعث تغییراتی در الگوی باندهای پروتئینی در رقم حساس و مقاوم، در شرایط تنش و عدم تنش شوری شد که این تغییرات شامل حذف باند پروتئینی یا بیان بیشتر آن در شرایط مختلف تنش، در مقایسه با شرایط نرمال بود.

نتیجه‌گیری: تلقیح باکتری به بذر گیاه و استفاده آن در چند نوبت به صورت تزریق به ریشه گندم حساس و مقاوم اثر مثبت بر خصوصیات بیوشیمیایی داشته است. کاربرد این گونه باکتری‌ها بدون آسیب به محیط زیست، به‌عنوان روشی کاربردی برای کنترل تنش شوری و حفظ عملکرد بهینه در خاک‌های شور، قابل استفاده می باشد. هم‌چنین می‌توان با دست‌ورزی باکتری، سیگنال‌های دریافتی باکتری توسط گیاه و اثرات باکتری بر رشد گیاه را کنترل کرد و به-عنوان جایگزینی مناسب برای روش‌های پیچیده و زمان‌بر انتقال ژن به گیاه استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: باکتری *Bacillus amyloliquefaciens*، تنش شوری، گندم، ، SDS-PAGE

نوع مقاله: مقاله پژوهشی

نوع مقاله: دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۸ **اصلاح:** ۱۴۰۱/۰۹/۰۳ **پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۹/۱۶، **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۱/۱۰/۰۵

استناد: فرامرزی، م.، عالم زاده، ع. و فاخری ، ب. (۱۴۰۱). تأثیرات تلقیح باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* برصفات بیوشیمیایی رقم‌های حساس و متحمل گندم در شرایط تنش شوری. بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات. ۱ (۴). ۵۳۴-۵۲۲. DOI: 10.22126/cbb.2023.8674.1032

ناشر: دانشگاه رازی

© نویسندگان.

مقدمه

جهان با مشکلات زیادی مواجه است که بیشتر آن‌ها ناشی از افزایش روزافزون جمعیت و فشار ضمنی بر منابع و محیط زیست است. پیش‌بینی می‌شود که جمعیت جهان تا سال ۲۱۰۰، حدود ۵۰ درصد افزایش یابد (Worldometers, 2015). این بدان معنی است که تقاضای جهانی برای غذا با سرعت زیادی رشد می‌کند و غذای بیشتری در آینده مورد نیاز خواهد بود (Bruinsma, 2009).

از سوی دیگر، کشاورزی با مشکلات و چالش‌های بسیاری مواجه است که به‌طور عمده، ناشی از تنش‌های زیستی و غیر زیستی مانند تنش شوری است. تنش شوری، مانع تظاهر کامل پتانسیل ژنتیکی گیاه می‌شود که نتیجه آن، کاهش بهره‌وری کشاورزی می‌باشد (Zhu, 2001). یک‌سوم از اراضی آبی جهان در حال حاضر تحت تأثیر درجات مختلف شوری قرار دارند (Ghassemi *et al*., 1995).

همان‌طور که اشاره شد، جمعیت جهان در دهه‌های آینده به‌طور چشمگیری افزایش خواهد یافت و استفاده از خاک-های متأثر از شوری برای کشت محصولات، اجتناب‌ناپذیر خواهد بود. با توجه به دلایل ذکر شده، تولید گیاهان متحمل به شوری و یا استفاده از روش‌هایی برای کمک به رشد گیاهان در شرایط تنش شوری ضروری به نظر می‌رسد (Owens, 2001). شوری خاک، سبب کاهش جذب مواد مغذی گیاه مانند فسفر می‌گردد، زیرا این یون‌ها با یون کلسیم در خاک‌های متأثر از شوری رسوب می‌کنند (Grattan & Grieve, 1999). برخی از باکتری‌ها با تولید مواد محرک رشد گیاه، می‌توانند دسترسی گیاه به یون‌های مفید را افزایش داده و باعث بهبود رشد گیاه شوند (Gyaneshwar *et al*., 2002). شواهد مختلفی مبنی بر مفید بودن سویه‌های باکتریایی خاص برای رشد گیاهان وجود دارد. گروهی از باکتری‌ها که چنین نقش‌هایی را ایفا می‌کنند، ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)[1] نامیده می‌شوند (Timmusk & Wagner, 1999). بنابراین استفاده از انواع مختلف باکتری‌ها و قارچ‌ها در خاک، یکی از راه‌های مقابله با تنش شوری است (Diouf *et al*., 2005, Evelin *et al*., 2009). تلقیح میکروبی برای کاهش تنش شوری، روش بهتری نسبت به روش‌های دیگر است؛ زیرا هزینه‌های تولید و مخاطرات زیست محیطی را به حداقل می‌رساند (Dixon *et al*., 1993).

بر اساس تحقیقات انجام شده، برخی از باکتری‌ها مانند *Paenibacillus polymyxa* می‌توانند در برابر تنش غیرزیستی مقاومت ایجاد کنند (Timmusk & Wagner, 1999). همچنین مشخص شده که *Bacillus amyloliquefaciens* می‌تواند تحمل گیاه برنج به مقدار بالای نمک را در شرایط تنش شوری افزایش دهد (Nautiyal *et al*., 2013) با این حال، گزارشی برای نشان دادن اثر *B. amyloliquefaciens* بر تحمل به شوری در گندم وجود ندارد. نقش احتمالی این باکتری‌ها در کاهش

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria

تنش شوری در گیاهانی که در محیط‌های شور رشد می کنند، مشخص نشده است (Ashraf *et al*., 2004). اگرچه گزارش‌های کمی در رابطه با اثر PGPR بر الگوی بیان ژن‌های مختلف وجود دارد (Timmusk & Wagner, 1999)، اما اثر این باکتری‌ها بر پروتئین‌های گیاهی مورد مطالعه قرار نگرفته است.

هدف از این پژوهش، بررسی تغییرات محتویات گیاهی نظیر پرولین، فعالیت آنزیم های کاتالاز[۲](CAT) و گایاکول پراکسیداز[۳] (GPx) و الگوی باندی پروتئین پس از تلقیح توسط *B. amyloliquefaciens* و مقایسه با گیاهان غیر تلقیح شده بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل سه فاکتور، سطوح مختلف شوری (۰ و ۲۰۰ میلی مولار) به عنوان فاکتور اول، کاربرد باکتری باسیلوس به‌صورت عدم تلقیح و تلقیح به گیاه به عنوان فاکتور دوم، و ژنوتیپ (گندم رقم شیراز که حساس به شوری است و گندم دوروم رقم بهرنگ که متحمل به شوری می‌باشد) به عنوان فاکتور سوم در سه تکرار در گلخانه بخش زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در سال ۱۳۹۴ انجام شد. کشت در گلدان‌های پنج کیلوگرمی انجام شد. قبل از شروع کشت، هدایت الکتریکی [۴](EC) و ظرفیت زراعی خاک[۵] (FC) توسط آزمایشگاه خاکشناسی اندازه-گیری شد. تا مرحله‌ی چهار برگی، آبیاری با آب معمولی صورت گرفت. اعمال تنش شوری در مرحله چهار برگی انجام شد.

در حین اعمال تنش شوری، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون حاوی باکتری باسیلوس به خاک اطراف ریشه تزریق شد. پس از ۲۴ ساعت، نمونه‌برداری از برگ‌ها انجام شده و همه سنجش‌های آزمایشگاهی روی بافت برگ صورت گرفت. در این آزمایش برای عصاره‌گیری جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم‌ها از بافر فسفات‌پتاسیم که حاوی فسفات-پتاسیم مونوبازیک (KH_2PO_4) و دی‌بازیک (K_2HPO_4) است، استفاده گردید. برای تهیه بافر استخراج پروتئین از برگ‌ها، از محلول فسفات‌پتاسیم (K_2HPO_4) با غلظت ۵۰mM و pH=۷/۱۵ استفاده شد.

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از روش (Dhindsa, 1981) استفاده شد و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز با روش (Chance & Maehly, 1995) انجام شد. برای تعیین میزان پرولین از روش بیتس (Bates *et al*., 1973) و دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر استفاده شد. برای تعیین غلظت پروتئین از روش بردفورد (Bradford, 1976) استفاده گردید. جهت بررسی

[2] Catalase
[3] Guaiacol peroxidase

[4] Electrical conductivity
[5] Field capacity

تغییرات الگوی بیان پروتئین از روش الکتروفوروز روی ژل پلی‌آکریل‌آمید استفاده شد. نمونه‌ها شامل مقدارهای مساوی از پروتئین استخراجی از تیمارهای مختلف گیاهی جهت SDS- PAGE بر طبق روش (Laemmli, 1970) بود. تمامی تجزیه‌های آماری داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون چند-دامنه‌ای دانکن در سطوح احتمال ۵٪ و ۱٪ انجام گرفت و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

وزن صد دانه

طبق جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه بر میزان وزن صددانه بسیار معنی‌دار شد. با بررسی اثرات متقابل سه گانه در جدول ۲ مشخص شد که در شرایط تنش شوری، تلقیح باکتری تغییری بر وزن صددانه رقم بهرنگ به عنوان رقم مقاوم، ایجاد نکرده است و وزن صد دانه در هر دو حالت ۴/۶۱۶ گرم می‌باشد، اما در شرایط آبیاری با آب معمولی، تلقیح باکتری باعث افزایش این صفت گردیده و وزن صد دانه از ۴/۷۱۶ گرم به ۴/۷۴۰ گرم افزایش یافته است. در رقم شیراز به عنوان رقم حساس در شرایط تنش شوری، باکتری باعث افزایش وزن صددانه گردیده و وزن صد دانه از ۴/۵۴۰ گرم به ۴/۶۵۰ تغییر کرده است، اما در شرایط آبیاری با آب معمولی تلقیح باکتری بر افزایش این صفت اثرگذار نبوده و افزایش معنی‌داری در وزن صد دانه ایجاد نکرده است.

محققیق افزایش عملکرد دانه در اثر تلقیح باکتری PGPR را به دلایلی همچون ترشح انواع هورمون‌ها که سبب افزایش رشد ریشه و جذب آب و مواد غذایی از خاک می‌شود، نسبت می‌دهند (Egamberdiyeva and Höflich, 2003). برای مثال ایندول استیک اسید[6] (IAA) طویل شدن برگ و ریشه را در بذر گندم در پاسخ به تنش بالا تحریک می‌کند (Egamberdieva, 2009) و باعث بهبود عملکرد می‌شود.

میزان پرولین

طبق نتایج جدول ۱، اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه بر میزان پرولین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. با توجه به جدول مقایسه میانگین اثرات متقابل صفات (جدول ۲)، تلقیح گیاه با باکتری، باعث افزایش قابل توجه میزان پرولین در شرایط تنش شوری در رقم حساس شده است و محتوای پرولین در گیاه از ۰/۸۰۱۱ به ۵۳/۷۴ میکرومول بر گرم وزن تر، افزایش یافته است. با توجه به اینکه یکی از مکانیسم‌های باکتری‌های ریزوسفر توانایی تولید هورمون گیاهی مثل آبسیزیک‌اسید است (Shaharoona *et al*., 2006) و در گیاهان تجمع آبسیزیک‌اسید در پاسخ به تنش اسمزی، تظاهر ژن مربوط به پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتاز را که در سنتز پرولین دخیل است، تنظیم می‌کند (Ashraf &

[6] Indole Acetic Acid

Foolad, 2007)، می‌توان نتیجه گرفت که به احتمال زیاد این باکتری از طریق تولید آبسیزیک‌اسید، باعث افزایش بیان ژن مربوط به سنتز پرولین در گیاه شده است.

در رقم مقاوم، تلقیح با باکتری در شرایط تنش و عدم تنش باعث کاهش میزان پرولین شده است. همانطور که در جدول شماره ۲ مشخص شده در شرایط عدم تنش، تلقیح باکتری باعث کاهش محتوای پرولین از ۱۲/۸۳ به ۱۱/۰۳۳ میکروگرم بر مول شده و در شرایط تنش، این کاهش چشمگیرتر بوده و باعث کاهش محتوای پرولین از ۳۴/۴۴ به ۲۴/۹۵ میکرومول بر گرم وزن تر، شده است. می‌توان گفت مکانیسمی که باکتری برای مقابله با تنش در گیاه مقاوم القا کرده، متفاوت از مکانیسمی است که در رقم حساس ایجاد می‌کند و باعث کاهش میزان پرولین شده است.

فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدان

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱، بیانگر معنی‌دار بودن اثرات متقابل سه گانه بر فعالیت آنزیم آنتی اکسیدان بود. با توجه به جدول شماره ۲، تلقیح گیاه با باکتری باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز و کاتالاز در شرایط تنش شوری شد. همانطور که از داده‌های جدول پیداست، در رقم حساس، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از ۰/۰۵۵ به ۰/۸۱۰ میکرو مول بر دقیقه بر گرم وزن تر، افزایش یافته و در مورد آنزیم گایاکول پراکسیداز این افزایش از ۱/۸۸۵ به ۴/۸۴۳ میکرو مول بر دقیقه بر گرم وزن تر بوده است. در رقم مقاوم، افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز از ۰/۰۶۱ به ۱/۰۹۴ میکرو مول بر دقیقه بر گرم وزن تر بوده و در مورد آنزیم گایاکول پراکسیداز این افزایش از ۰/۰۴۳ به ۰/۲۹۶ میکرو مول بر دقیقه بر گرم وزن تر بوده است. تحقیقات نشان داده IAA تولید شده توسط گونه‌های PGPR باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در شرایط تنش‌های محیطی می‌شود (Bianco & Defez, 2009). با تجزیه IAA و یا غیرفعال شدن آن در شرایط تنش محیطی، باکتری قادر است که مقدار ناچیز IAA را برای رشد و فیزیولوژی گیاه مورد استفاده قرار دهد (Gamalero & Glick, 2011).

غلظت پروتئین محلول

با توجه به نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، اعمال تنش شوری بر میزان پروتئین محلول در هر دو رقم حساس و مقاوم معنادار شده است که با نتایج یلدیز (Yildiz, 2007) مطابقت دارد. تحقیق ذکر شده روی گندم نان و گندم دوروم انجام شده بود که پروتئین محلول برگ در شرایط تنش شوری افزایش یافته بود. همچنین تلقیح باکتری به گیاه نیز اثر معنی‌داری بر میزان پروتئین داشته است که با نتایج دشتی و همکاران (Dashti *et al*., 1997) مطابقت دارد. این گروه اثر تلقیح باکتری به گیاه سویا را بررسی و گزارش کردند که تلقیح باکتری باعث افزایش عملکرد پروتئین دانه و تولید پروتئین گیاهی کل در سویا شده است.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر شوری، باکتری و ژنوتیپ بر صفات مورد بررسی

Table 1. Analysis of variance of salinity, bacteria and genotype effects on the studied traits

منابع تغییرات SOV	درجه آزادی df	آنزیم گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase enzyme	آنزیم کاتالاز Catalase enzyme	پرولین Proline	پروتئین Protein	وزن صد دانه 100-seeds weight
شوری Salinity	1	6.452**	1.02**	22510.45**	0.039**	0.777**
باکتری Bacteria	1	6.983**	1.093*	1044.239**	0.139**	0.008**
رقم Cultivar	1	30.976*	0.055**	97.320*	0.372**	0.317**
باکتری×شوری Bacteria×Salinity	1	1.664**	1.320**	436.625**	0.053**	0.001**
رقم×شوری Salinity×cultivar	1	5.104**	0.016 ns	15.444**	0.030**	0.370**
رقم×باکتری Cultivar×Bacteria	1	5.326**	0.013 ns	2129.089**	0.127**	0.003**
رقم×باکتری×شوری Cultvar×Bacteria×Salinity	1	1.013**	0.047**	918.930**	0.005 ns	0.004**
خطا Error	16	0.0092	0.13300	0.21	0.0007	0.000138
ضریب تغییرات CV	-	0.0243	1.259	0.0243	0.0591	0.0024

ns، * ،**: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪و ۱٪.

ns,* and **: non-significant and significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری، تلقیح باکتری و ژنوتیپ بر صفات مورد مطالعه

Table 2. Mean comparison of salinity × bacteria × genotype interaction for the studied traits

تیمار Treatment	آنزیم گایاکول پراکسیداز Guaiacol peroxidase enzyme (µmol /min g fw)	آنزیم کاتالاز Catalase enzyme (µmol /min g fw)	پرولین Proline (µmol/g fw)	وزن صد دانه 100-seeds weight (gr)
$a_1b_1c_1$	0.863(c)	0.053(b)	0.739(g)	5.196(a)
$a_1b_1c_2$	0.0411(e)	0.139(b)	12.83(d)	4.716(c)
$a_1b_2c_1$	1.946(b)	0.052(b)	11.863(e)	5.216(a)
$a_1b_2c_2$	0.065(e)	0.055(b)	11.033(f)	4.740(b)
$a_2b_1c_1$	1.885(b)	0.050(b)	0.8011(g)	4.540(f)
$a_2b_1c_2$	0.043(e)	0.061(b)	34.44(b)	4.616(e)
$a_2b_2c_1$	4.843(a)	0.810(a)	53.74(a)	4.650(d)
$a_2b_2c_2$	0.296(d)	1.094(a)	24.95(c)	4.616(e)

(a_1): تیمار شاهد (a_2): تنش شوری (b_1): عدم تلقیح باکتری (b_2): تلقیح با باکتری باسیلوس (c_1): رقم شیراز (c_2): رقم بهرنگ

(a_1): control (a_2): salinity stress (b_1): non-inoculation bacteria (b_2): inoculation bacteria (c_1): Shiraz cultivar (c_2): Behrang cultivar

الگوی باند پروتئین روی ژل آکریل آمید

با توجه به شکل ۱، در گندم دوروم، در تیمارهایی که تلقیح با باکتری صورت نگرفته، اعمال تنش شوری تغییری در الگوی باندهای پروتئینی ایجاد نکرده است، اما در تیمارهایی که تلقیح بذر با باکتری صورت گرفته، تغییر الگوی باندهای پروتئینی در شرایط نرمال و شرایط اعمال تنش به این صورت مشاهده شد.

باند ۶۰kDa در تیمار شاهد و شوری تلقیح شده با باکتری بیان بسیار پایینی داشته و یا بیان آن به طور کامل سرکوب شده است. باند ۷۰kDa در اعمال همزمان تنش شوری و تلقیح باکتری حذف شده و یا بیان بسیار پایینی داشته است. هم‌چنین باند ۵۵kDa در تیمار شوری و تلقیح باکتری بیان بالایی را نشان داد. در خصوص باند ۶۰kDa می‌توان گفت که در بیان ژن کدکننده این پروتئین در گندم دوروم، باکتری به عنوان یک عامل القای مقاومت زنده عمل کرده و گیاه با دریافت سیگنال‌های مربوطه از باکتری، بیان ژن کدکننده این پروتئین را در مسیر ایجاد القای مقاومت سرکوب کرده است. محققان در بررسی‌های خود بیان کردند که سرکوب بعضی ژن‌ها مانند MAPK به طور قابل ملاحظه‌ای باعث افزایش مقاومت به قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌شود (Xiong & Yang, 2003). باتوجه به حذف این پروتئین در گیاه و رشد بهتر در حالت تلقیح با باکتری باسیلوس، می‌توان نتیجه گرفت که این پروتئین بر رشد گیاه اثر مثبتی نداشته است که در حالت عدم بیان این ژن هم رشد گیاه در شرایط تنش شوری و عدم تنش، نسبت به تیمارهای مشابه بدون تلقیح با باکتری به‌خوبی صورت گرفته است. احتمالاً کاهش بیان باند پروتئینی ۷۰kDa در تیمار اعمال همزمان تنش شوری و تلقیح با باکتری به‌علت کاهش بیان ژن مربوطه می‌باشد که با مطالعات تیماسک و وانگر (Timmusk & Wagner, 1999) مطابقت دارد. آن‌ها با بررسی mRNA چند ژن پاسخ‌دهنده به تنش زنده و غیرزنده، به این نتیجه رسیدند که علت کم بودن بیان برخی ژن‌ها، مربوط به تنظیم مرتبط و پیوسته ژن‌ها با هم بوده است و به بیان دیگر، ژن‌ها به‌صورت هم بیان عمل می‌کنند. احتمالاً در تیماری که اعمال همزمان تنش شوری و تلقیح با باکتری صورت گرفته، ژن مربوط به این پروتئین با ژن مربوط به باند پروتئینی ۶۰ kDa هم بیان بوده و کمتر بیان شده است. در ضمن کاهش بیان ژن مربوطه با بررسی‌های صورت گرفته روی گیاه برنج مطابقت دارد (Nautiyal *et al.*, 2013). در آزمایشات این محققان مشخص شد که بیان برخی ژن‌ها در پاسخ به تنش شوری در صورت تلقیح با باکتری باسیلوس در شرایط گلخانه‌ای کاهش می‌یابد.

در تحقیقات مشابه مشخص شد که تلقیح فلفل با گونه‌ای از باکتری باسیلوس، باعث تعدیل تنش اسمزی حاصل از تنش شوری و خشکی شده است (Sziderics *et al.*, 2007). افزایش بیان باند پروتئینی ۵۵kDa در تیمار اعمال همزمان تنش شوری و تلقیح باکتری در شرایط گلخانه نیز با نتایج

ناتیال و همکاران (Nautiyal *et al*., 2013) مطابقت دارد. تحقیقات نشان داده است که متیل جاسمونات در رونویسی ژن‌های باز دارنده پروتئینازها و آنزیم‌های مؤثر در بیوسنتز فلاونوئیدها و لیپواکسیژنازها که همه آن‌ها سبب ایجاد مقاومت گیاه در برابر انواع تنش‌ها می‌شوند، مؤثرند. تلقیح گیاه تحت تنش شوری با دو باکتری آزوسپریلیوم و ریزوبیوم باعث ترشح گسترده فلاوونوئید در مقایسه با حالت تلقیح با یک باکتری شد. پس می‌توان گفت لازمه تولید فلاوونوئید، حضور باکتری بوده است (Dardanelli *et al*., 2008).

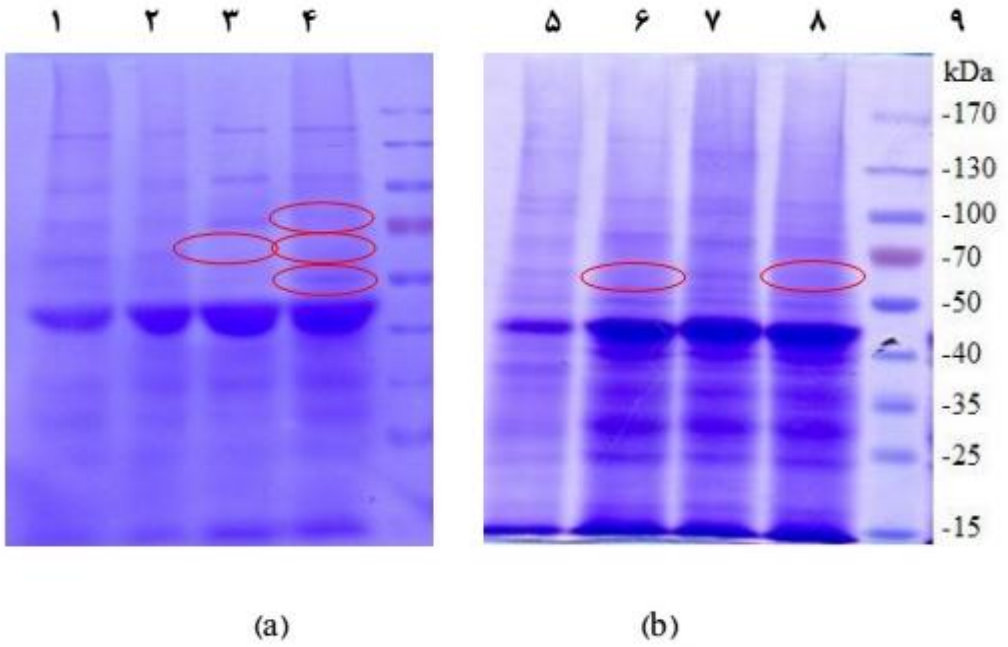
در رقم شیراز به جز شرایط اعمال تنش شوری، تغییری در الگوی باندهای پروتئینی مشاهده نشد (شکل ۱). اعمال تنش شوری باعث کاهش بیان باند ۶۵kDa شد و تلقیح باکتری هم تأثیری بر بیان این پروتئین نداشته است. به نظر می‌رسد که باکتری بر بیان ژن‌های مربوط به این پروتئین اثر خاصی نداشته است. حذف پروتئین در شرایط تنش شوری بدون تلقیح با باکتری با نتایج یلدیز (Yildiz, 2007) و کاهش بیان ژن در شرایط اعمال همزمان تنش شوری و تلقیح باکتری با نتایج ناتیال و همکاران (Nautiyal *et al*., 2013) مطابقت دارد. در این بررسی بیان ۱۴ ژن در کشت هیدروپونیک و اعمال تنش شوری و تلقیح باکتری افزایش یافت، اما در شرایط کشت گلخانه‌ای بیان چند ژن که نهایتاً سنتز پروتئین را سبب می‌شوند، کاهش یافت.

این تحقیق نشان داد که تلقیح باکتری با بذر گیاه و استفاده آن در چند نوبت به صورت تزریق به ریشه گندم حساس و مقاوم اثر مثبت بر خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی داشته است. همانطور که مشاهده شد، استفاده از این گونه باکتری باسیلوس باعث افزایش میزان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و هم‌چنین پرولین در هر دو رقم گردید. همچنین، میزان غلظت پروتئین کل در رقم حساس را تغییر داده، اما بر غلظت پروتئین کل رقم مقاوم اثری نداشته است. نهایتاً مشخص شد که تلقیح با باکتری میزان عملکرد و وزن صد دانه را به مقدار جزیی تغییر داد. تنش شوری باعث کاهش وزن صد دانه نسبت به آبیاری با آب معمولی در هر دو حالت تلقیح و عدم تلقیح شد. از آنجا که کشور ما با کمبود آب مواجه است، آبیاری مزارع با آب شور اجتناب‌ناپذیر است. پس کاربرد این گونه باکتری بدون آسیب به محیط زیست، روشی کاربردی برای کنترل تنش و حفظ عملکرد بهینه در این مناطق قابل استفاده می باشد. با توجه به این نکته که انتقال ژن به گیاه در مقابل ایجاد تغییرات ژنتیکی در باکتری‌ها بسیار پرهزینه و زمان‌بر است، می‌توان با دست‌ورزی باکتری، سیگنال‌های دریافتی باکتری توسط گیاه و اثرات باکتری بر رشد گیاه را کنترل کرد؛ چرا که با تغییر میزان هورمون‌های گیاهی، آنزیم‌ها و سایر محصولات تولید شده در باکتری و تلقیح آن به گیاه می‌توان اثرات متفاوتی را در گیاه مشاهده کرد. همچنین چند باکتری به طور همزمان می‌تواند به گیاه تلقیح شود و هر یک اثر خود را بر گیاه داشته باشد که تقریباً معادل انتقال چند ژن با هزینه و زمان کمتر به گیاه است؛ زیرا یکی از

قابلیت‌های این باکتری‌ها، تحریک پروموتورهای ژن در شرایط تنش محیطی است.

شکل ۱- بررسی اثر باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* بر الگوی بیان پروتئین

Figure 1. the effect of *Bacillus amyloliquefaciens* bacteria on the protein expression pattern



a: رقم بهرنگ b: رقم شیراز (۱و۵: شاهد بدون تلقیح باکتری. ۲و۶: شوری بدون تلقیح باکتری. ۳و۷: شاهد و تلقیح باکتری. ۴و۸: شوری و تلقیح باکتری. ۹: مارکر)

a: Behrang cultivar, b: Shiraz cultivar (1, 5: control and non-inoculation bacteria. 2, 6: salinity and non-inoculation bacteria. 3, 7: control and inoculation bacteria. 4, 8: salinity and inoculation bacteria. 9: marker)

References

Ashraf, M., & Foolad, M. R. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 59 (2), 206-216.

Ashraf, M., Hasnain, S., Berge, O., & Mahmood, T. 2004. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. Biology and Fertility of soils, 40 (3), 157-162.

Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39 (1), 205-207.

Bianco, C., & Defez, R. 2009. Medicago truncatula improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing Sinorhizobium meliloti strain. Journal of Experimental Botany, 60 (11), 3097-3107.

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 (1-2), 248-254.

Bruinsma, J. 2009. The resource outlook to 2050: by how much do land, water and crop yields need to increase by 2050?

Chance, B., & Maehly, A.C. 1955. Assay of Catalase and Peroxidases. Methods in Enzymology. 11, 764–775.

Dardanelli, M. S., de Cordoba, F. J. F., Espuny, M. R., Carvajal, M. A. R., Díaz, M. E. S., Serrano, A. M. G., Okon, Y., & Megías, M. 2008. Effect of Azospirillum brasilense coinoculated with Rhizobium on Phaseolus vulgaris flavonoids and Nod factor production under salt stress. Soil Biology and Biochemistry, 40 (11), 2713-2721.

Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R., & Smith, D. L. 1997. Application of plant growth-promoting rhizobacteria to soybean (Glycine max [L.] Merr.) increases protein and dry matter yield under short-season conditions. Plant and Soil, 188 (1), 33-41.

Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P., & Thorpe, T. A. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32 (1), 93-101.

Diouf, D., Duponnois, R., Ba, A. T., Neyra, M., & Lesueur, D. 2005. Symbiosis of Acacia auriculiformis and Acacia mangium with mycorrhizal fungi and Bradyrhizobium spp. improves salt tolerance in greenhouse conditions. Functional Plant Biology, 32 (12), 1143-1152.

Dixon, R. K., Garg, V. K., & Rao, M. V. 1993. Inoculation of Leucaena and Prosopis seedlings with Glomus and Rhizobium species in saline soil: rhizosphere relations and seedling growth. Arid Land Research and Management, 7 (2), 133-144.

Egamberdieva, D. 2009. Alleviation of salt stress by plant growth regulators and IAA producing bacteria in wheat. Acta Physiologiae Plantarum, 31 (4), 861-864.

Egamberdiyeva, D., & Höflich, G. 2003. Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different soils and temperatures. Soil Biology and Biochemistry, 35 (7), 973-978.

Evelin, H., Kapoor, R., & Giri, B. 2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. Annals of Botany, 104 (7), 1263-1280.

Gamalero, E., & Glick, B. R. 2011. Mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. In Bacteria in agrobiology: plant nutrient management (pp. 17-46). Springer.

Ghassemi, F., Jakeman, A. J., & Nix, H. A. 1995. Salinisation of Land and Water Resources: Human Causes, Extent, Management and Case Studies. CAB international, University of New South Wales Press, Sydney.

Grattan, S. R., & Grieve, C. M. 1999. Mineral nutrient acquisition and tanggapane by plants grown in salin environment. Dalam M. Pessarakli (Ed). Handbook of Plant and Crop Stress. In: Marcel Dekker, Inc. New York.

Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L. J., & Poole, P. S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil, 245 (1), 83-93.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227 (5259), 680-685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Nautiyal, C. S., Srivastava, S., Chauhan, P. S., Seem, K., Mishra, A., & Sopory, S. K. 2013. Plant growth-promoting bacteria Bacillus amyloliquefaciens NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. Plant Physiology and Biochemistry, 66, 1-9. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.020.

Owens, S. 2001. Salt of the earth. EMBO Reports, 2 (10), 877-879.

Shaharoona, B., Arshad, M., Zahir, Z. A., & Khalid, A. 2006. Performance of Pseudomonas spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (Zea mays L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. Soil Biology and Biochemistry, 38 (9), 2971-2975.

Sziderics, A. H., Rasche, F., Trognitz, F., Sessitsch, A., & Wilhelm, E. 2007. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (Capsicum annuum L.). Canadian Journal of Microbiology, 53 (11), 1195-1202.

Timmusk, S., & Wagner, E. G. H. 1999. The plant-growth-promoting rhizobacterium Paenibacillus polymyxa induces changes in Arabidopsis thaliana gene expression: a possible connection between biotic and abiotic stress responses. Molecular Plant Microbe Interactions, 12 (11), 951-959. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.11.951.

Worldometers. http://www.worldometers.info/world-population/ [accessed 28 November 2015.].

Xiong, L., & Yang, Y. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid–inducible mitogen-activated protein kinase. The Plant Cell, 15 (3), 745-759.

Yildiz, M. 2007. Two-dimensional electrophoretic analysis of soluble leaf proteins of a salt-sensitive (Triticum aestivum) and a salt-tolerant (T. durum) cultivar in response to NaCl stress. Journal of Integrative Plant Biology, 49 (7), 975-981.

Zhu, J.-K. 2001. Plant salt tolerance. Trends in Plant Science, 6 (2), 66-71.