



Razi University



Cereal Biotechnology and Biochemistry

## Investigation of modulation in *P5CS* gene expression and some physiological and biochemical traits of wheat in response to *Azospirillum* and *Piriformospora indica* inoculation under salinity stress

Mohammad Javad Zarea<sup>1</sup> & Zohreh Karimi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Associate Professor, Department of Agronomy and Crop Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

<sup>2</sup> Ph.D. Graduated in Agrotechnology, Department of Agronomy and Crop Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

Corresponding author. E-mail: [mj.zarea@ilam.ac.ir](mailto:mj.zarea@ilam.ac.ir)

### ABSTRACT

**Introduction:** Environmental stresses such as salinity are one of the major threats to the sustainability of crop production. Climate change has increased the intensity of these environmental tensions in different regions of the world. Drought and salinity are the critical environmental stresses in arid and semi-arid regions. In recent decades, various strategies have been introduced to reduce the effects of salinity stress on crops. The use of beneficial soil microorganisms is one of these methods.

**Materials and methods:** In the present study, the effect of *Azospirillum* bacteria and *Piriformospora indica* fungus in separate and combined inoculation was investigated to identify the role of these above-mentioned plant growth-promoting microorganisms in the modulation of the molecular, biochemical, and physiological aspects in wheat under salt stress conditions. A 2x2 factorial experimental design was implemented in a completely randomized block design with three replications under greenhouse conditions in 2022. The experiment was conducted in the pot. The main treatments included salt stress imposition, inoculation with and without *Azospirillum zaea*, and endophytic fungus *Piriformospora indica* application. Salinity was induced using calcium chloride (65 mg) and sodium chloride (0.375 g) to achieve a salinity level of 12 dS/m. Saline water irrigation was performed 21 and 28 days after wheat germination. Normal water with a salinity of 0.3 decisiemens per meter was used for the control treatment. The wheat cultivar Pishgam was used for this experiment. Twenty-four hours after applying the second salinity treatment, leaf sampling was conducted to extract total RNA and study the expression of the delta-pyrroline-5-carboxylate synthase gene. The changes in leaf proline content and the expression of the gene responsible for proline synthesis (pyrroline-5-carboxylate synthase), malondialdehyde production, ion leakage, leaf relative water content, nitrogen content, and chlorophyll pigment levels in response to applied microorganisms under both salinity and non-salinity conditions were investigated. Additionally, succinate dehydrogenase activity and root colonization rate with fungus were measured under the influence of salinity and inoculation with *Azospirillum*.

**Results:** The percentage of fungal colonization in wheat roots of cultivar Pishgam was 24.9%. Inoculation with *Azospirillum* increased the root colonization rate by 3.17%. Salinity had no significant effect on succinate dehydrogenase, but inoculation with *Azospirillum* significantly increased succinate dehydrogenase. The plants inoculated with *P. indica* and *Azospirillum* had a higher relative water content in leaves under salt stress. Plants inoculated with bacteria and fungus also had higher nitrogen content. Salinity increased the amount of ion leakage, but inoculation with fungus and bacteria prevented it from increasing. Salinity did not cause a significant change in the amount of chlorophyll pigments, although inoculation with *P. indica* and *Azospirillum* increased the amount of chlorophyll a. The effect of salinity, *P. indica*, *Azospirillum*, and their interaction on the expression level of the delta-pyrroline-5 carboxylate synthase gene was significant. Control plants showed higher levels of gene expression, while the inoculated plants with *P. indica* and *Azospirillum* had lower gene expression levels. Additionally, the interaction between *Azospirillum* and *P. indica* on the expression level of the delta-pyrroline-5 carboxylate synthase gene was significant and it caused a greater decrease compared to the plants that were only inoculated with *P. indica*. The effect of salinity, *P. indica*, and bacteria, as well as their mutual effects on leaf proline concentration, was significant. Under salt stress, the amount of proline in the plants inoculated with *P. indica* was lower than that of the control plants. A similar trend was observed in plants inoculated with bacteria, showing lower levels of proline under salt stress. The expression trend of the delta-pyrroline-5-carboxylate synthase gene was consistent with the trend of proline accumulation under salt stress, indicating the effect of salt induction on the expression of this gene.

**Conclusion:** The inoculated plants with *P. indica* and *Azospirillum* were less affected by induced salt stress than the control plants. The inoculated plants exhibited a lower rate of malondialdehyde and electrolyte leakage, as well as a higher level of chlorophyll pigment and leaf-relative water content. Additionally, *P5CS* gene expression and proline accumulation in inoculated plants were lower than in control plants.

**Keywords:** Ion leakage, malondialdehyde, plants-microbe interaction, proline, succinate dehydrogenase.

**Article Type:** Research Article

**Article history:** Received: 20 Oct 2023, Revised: 01 Dec 2023, Accepted: 20 Dec 2023, Published online: 22 Dec 2023

**Cite this article:** Zarea, M. J. & Karimi, Z. (2023). Investigation of modulation in *P5CS* gene expression and some physiological and biochemical traits of wheat in response to *Azospirillum* and *Piriformospora indica* inoculation under salinity stress. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 2(4), 391-417. DOI: [10.22126/cbb.2024.10502.1070](https://doi.org/10.22126/cbb.2024.10502.1070)



© The Author(s).  
[10.22126/cbb.2024.10502.1070](https://doi.org/10.22126/cbb.2024.10502.1070)

**Publisher:** Razi University



## بررسی تغییرات در بیان ژن *P5CS*، و برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گندم در پاسخ به باکتری *آزوسپیریلوم* و قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* تحت تنش شوری

محمدجواد زارع<sup>۱</sup> ✉ و زهره کریمی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

<sup>۲</sup> دانش آموخته دکتری آگروتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

✉ نویسنده مسئول. راینامه: [mj.zarea@ilam.ac.ir](mailto:mj.zarea@ilam.ac.ir)

### چکیده

**مقدمه:** تنش‌های محیطی از بزرگ‌ترین تهدیدها برای ثبات در تولید محصولات کشاورزی محسوب می‌گردند. تغییرات آب و هوایی شدت تنش‌های محیطی را در مناطق مختلف جهان افزایش داده است. خشکی و شوری مهمترین تنش‌های محیطی مناطق خشک و نیمه خشک جهان هستند. در دهه‌های اخیر راهکارهای مختلفی جهت کاهش اثرات تنش شوری بر گیاهان زراعی معرفی شده است. استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید خاک از جمله روش‌های توصیه شده می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در مطالعه حاضر اثر باکتری *آزوسپیریلوم* و قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* در تلقیح جداگانه و توأمان آنها به‌منظور بررسی تغییرات مولکولی، بیوشیمیایی و فیزیولوژی گندم تحت اعمال و عدم اعمال تنش شوری بررسی گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل سه عاملی هر کدام با دو سطح بر پایه طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام انجام گرفت. سه تیمار آزمایش شامل تنش شوری (۰ و ۱۲ دسی زیمنس بر متر)، تلقیح با باکتری *آزوسپیریلوم* ( $10^8 \times 1.8$  سلول زنده در هر میلی‌لیتر محیط کشت)، و کاربرد قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* (۱۰ گرم حاوی کلامیدوسپور در یک کیلوگرم خاک) بود. جهت اعمال تنش شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر از مخلوط دو نمک کلرید کلسیم (۶۵ میلی‌گرم) و کلرید سدیم (۳۷۵/۰ گرم) استفاده گردید. ۲۱ و ۲۸ روز پس از سبز شدن گندم شوری اعمال گردید. از گندم رقم پیشگام جهت این آزمایش استفاده گردید. ۲۴ ساعت پس از اعمال دومین آبیاری با آب شور نمونه‌گیری برگ به جهت استخراج rRNA کل و مطالعات مرتبط با بیان ژن دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز که آنزیم کلیدی در مسیر سنتز پرولین است انجام گرفت. میزان تغییرات پرولین برگ، میزان تولید مالون دی‌آلدهید، نشت یونی، محتوای آب نسبی برگ، محتوای نیتروژن، میزان رنگیزه‌های کلروفیلی در پاسخ به میکروارگانیسم‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفت. همچنین میزان کلونیزاسیون قارچ و سوکسینات دهیدروژناز که معیاری از میزان فعالیت زیستی قارچ در ریشه گیاه است نیز مورد سنجش قرار گرفت.

**یافته‌ها:** درصد کلونیزاسیون قارچ با ریشه گندم رقم پیشگام ۲۴/۹ درصد بود. تلقیح با *آزوسپیریلوم* میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ را ۳/۱۷ درصد افزایش داد و به مقدار ۲۹ درصد رساند. شوری تاثیر معنی‌داری بر سوکسینات دهیدروژناز نداشت اما تلقیح با باکتری میزان آن را به صورت معنی‌داری افزایش داد. گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری از محتوای آب نسبی بیشتر اما نشت یونی و مالون دی‌آلدهید کمتری تحت شوری برخوردار بودند. شوری موجب تغییر معنی‌دار در میزان رنگیزه‌های کلروفیلی نگردید؛ هر چند تلقیح با قارچ و باکتری میزان کلروفیل a را افزایش داد. تاثیر شوری، قارچ و باکتری و اثر متقابل آنها بر میزان بیان ژن دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز معنی‌دار بود. گیاهان شاهد سطوح بیشتری از بیان ژن را نشان دادند. در حالیکه گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری از میزان بیان ژن کمتری برخوردار بودند. همچنین کاربرد همزمان باکتری و قارچ بر میزان بیان ژن دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز معنی‌دار بود و موجب کاهش بیشتر آن در مقایسه با گیاهانی که فقط با قارچ تلقیح شده بودند گردید. اثر شوری، قارچ و باکتری و نیز اثرات متقابل آنها بر میزان غلظت پرولین برگ معنی‌دار بود. تحت تنش شوری میزان پرولین در گیاهان تلقیح شده با قارچ کمتر از گیاهان شاهد بود. چنین روندی نیز در گیاهان تلقیح شده با باکتری مشاهده گردید به طوری که گیاهان تلقیح شده سطوح کمتری از پرولین را تحت تنش شوری نشان دادند.

**نتیجه‌گیری:** گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری نسبت به گیاهان شاهد کمتر تحت تاثیر تنش شوری قرار گرفتند که میزان تولید کمتر مالون دی‌آلدهید و نشت الکترولیت و بالاتر بودن میزان رنگیزه کلروفیلی و محتوای آب نسبی برگ تایید کننده این نتایج بود. همچنین میزان بیان ژن دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتاز و تجمع پرولین در گیاهان تحت تنش شوری در مقایسه با گیاهان کنترل نشان داد که میکروارگانیسم‌های استفاده شده از طریق دیگری شدت تنش را بر گیاه میزبان کاهش داده‌اند.

**واژه‌های کلیدی:** پرولین، روابط گیاه-میکروارگانیسم، سوکسینات دهیدروژناز، مالون دی‌آلدهید، نشت یونی.

**نوع مقاله:** مقاله پژوهشی

**نوع مقاله: دریافت:** ۱۴۰۲/۰۷/۲۸ **اصلاح:** ۱۴۰۲/۰۹/۱۰ **پذیرش:** ۱۴۰۲/۰۹/۲۹ **انتشار آنلاین:** ۱۴۰۲/۱۰/۰۱

**استناد:** زارع، م. ج. و کریمی، ز. (۱۴۰۲). بررسی تغییرات در بیان ژن *P5CS*، و برخی صفات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گندم در پاسخ به باکتری *آزوسپیریلوم* و قارچ

*پیریفورموسپورا ایندیکا* تحت تنش شوری. *بیوتکنولوژی و بیوشیمی غلات*، ۲(۴)، ۳۹۱-۴۱۷. DOI: [10.22126/cbb.2024.10502.1070](https://doi.org/10.22126/cbb.2024.10502.1070)



## مقدمه

گیاه به شمار می‌آیند و بیشترین مطالعات را در بین گروه‌های مختلف باکتریایی به خود اختصاص داده‌اند. باکتری‌هایی این جنس قادر به تثبیت نیتروژن اتمسفری می‌باشند. این باکتری‌ها قادر به کلون اطراف و بخش‌های داخلی ریشه گیاهان هستند. گزارشات مختلفی در ارتباط با تاثیر افزایش‌دهی رشد و عملکرد محصولات مختلف توسط این باکتری‌ها منتشر شده است ( Jafarian *et al.*, 2017; Zarea *et al.*, 2017; Raffi *et al.*, 2021). علاوه بر تثبیت نیتروژن، این جنس از باکتری‌ها قادر به تولید هورمون‌های مختلف رشد گیاهی هستند و توانمندی این باکتری‌ها در افزایش رشد گیاهان را به توانایی آنها در تولید این هورمون‌ها می‌دانند (Molina *et al.*, 2018). بنابراین توانایی آنها محدود به تثبیت نیتروژن نمی‌باشد (Fukami *et al.*, 2018).

میزان تاثیر گذاری قارچ‌های همزیست گیاهی به میزان همزیستی (کلونیزاسیون ریشه) آنها با گیاه میزبان دارد. هرچند فعالیت زیستی قارچ در ریشه نیز مهم است. فعالیت زیستی قارچ در ریشه را بر اساس میزان سوکسینات دهیدروژناز مورد سنجش قرار می‌دهند. تنش‌های محیطی مانند شوری می‌تواند میزان سوکسینات دهیدروژناز را کاهش دهد؛ هرچند این میزان کاهش بسته به نوع قارچ متفاوت است (Djighaly *et al.*, 2018). شوری میزان همزیستی قارچ‌های همزیست با گیاه را می‌تواند تحت تاثیر قرار دهد؛ هرچند میزان اثر گذاری آن در بین قارچ‌های مختلف متفاوت گزارش شده است (Yu *et al.*, 2012; Scharnagl *et al.*, 2018).

عوامل مختلفی مانند ساختار و حاصلخیزی خاک، محتوای آب خاک و عناصر غذایی تعیین کننده رشد و عملکرد گیاهان می‌باشند. کاهش منابع آبی و شوری آب و خاک مهمترین عوامل محدود کننده محیطی تولیدات زراعی است. بخش قابل توجهی از اراضی قابل کشت در مناطق خشک و نیمه خشک واقع هستند؛ یعنی در مناطقی که اکثراً متاثر از پدیده شوری خاک و آب هستند. از شوری به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل که امنیت غذایی را به خطر می‌اندازد نام برده می‌شود. بنابراین معرفی راه‌کارهایی که منجر به کاهش اثرات سوء شوری بر تولیدات زراعی گردد می‌تواند مهم باشد. یکی از روش‌های موثر جهت افزایش تحمل گیاهان زراعی به تنش شوری به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های افزایش‌دهنده رشد گیاهی (قارچ و باکتری‌های) است. اثرات مفید ریزوباکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاه در افزایش بهره‌وری محصول به طور مکرر گزارش گردیده است (Hartmann *et al.*, 2019). شناخت و فهم بیشتر مکانیسم‌هایی که این گروه از میکروارگانیسم‌های به کار می‌برند تا اثرات سوء تنش‌های محیطی را بر گیاه کاهش دهند می‌تواند ارزشمند باشد (Ma *et al.*, 2021).

کاهش اثرات سوء تنش شوری با استفاده از باکتری‌های القاء کننده رشد در گیاهان مختلف مورد بررسی و تایید قرار گرفته است (Ashraf *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2012; Atouei *et al.*, 2019). باکتری‌های جنس *آزوسپیریلوم* از معروف‌ترین باکتری‌های القاء کننده رشد

شوری موجب افزایش نشت یونی از غشاهای سلولی می‌گردد (Demidchik *et al.*, 2014) که نتیجه اکسیداسیون غشاءها در اثر واکنش با گونه‌های مختلف اکسیژن فعال است. از تغییرات میزان مالون دی آلدئید به‌عنوان شاخصی از میزان خسارت وارد شده در اثر تنش به گیاه استفاده می‌گردد. شوری از طریق افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال میزان مالون دی آلدئید را در گیاه افزایش می‌دهد (Pastuszak *et al.*, 2022).

گیاهان در مواجهه با تنش خشکی و شوری و به جهت تنظیم اسمزی سلول اقدام به تجمع پرولین می‌کنند. پرولین نقش مهمی در تنظیم اسمزی سلول در گیاه تحت تنش دارد (Zarea & Karimi 2023a; Karimi *et al.*, 2024). پرولین-۵- کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) آنزیم کلیدی در سنتز پرولین است. ژن P5CS در بیوسنتز پرولین از طریق تاثیر بر ساخت آنزیم P5CS تاثیر گذار است (Zarea & Karimi 2023b). گزارش شده است که رونوشت برداری از ژن (بیان ژن) P5CS تحت تنش شوری (Tavakoli *et al.*, 2016) و خشکی (Maghsoudi *et al.*, 2018) در گندم افزایش یافته است.

هدف از این پژوهش بررسی تاثیر باکتری *Azospirillum* گونه *zeae* و قارچ انوفیت ریشه *Serendipita indica* (*synonym, Piriformospora indica*) بر برخی تغییرات فیزیولوژیک و بیان ژن مرتبط با سنتز پرولین pyrrolin-5-carboxylate synthetase; P5CS-( $\Delta 1$ ) و تجمع پرولین در گیاه گندم تحت تنش شوری بود. در

درون‌زیست ریشه *Serendipita indica* (به‌عنوان *Piriformospora indica*) شناخته می‌شد (Boorboori & Zhang, 2022) جزو قارچ‌های محرک رشد گیاه محسوب می‌گردد که با مکانیسم‌های مختلف زمینه‌قاء و بهتر شدن رشد گیاه را فراهم می‌آورد. گزارشات مختلف منتشر شده از کشورهای مختلف تایید کننده پتانسیل این قارچ در افزایش رشد و عملکرد گونه‌های مختلف گیاهی است (Gill *et al.*, 2016). گزارش شده است که کاربرد توامان باکتری *Azospirillum* و قارچ *Piriformospora indica* تاثیر موثرتری در افزایش تحمل شوری در گندم داشته است (Zarea *et al.*, 2012).

نمک موجود در خاک و آب آبیاری از طریق افزایش فشار اسمزی مانع از سهولت جذب آب به گیاه می‌شود که نتیجه آن کاهش رشد گیاه است. البته گیاهان با بهره‌گیری از مکانیسم‌های مختلف با تنش شوری مقابله می‌کنند. تجمع اسمولیت سازگار مانند قندهای محلول و برخی اسیدهای آمینه مانند پرولین، حذف سدیم در هنگام ورود به گیاه و یا جلوگیری از انتقال سدیم به برگ از مکانیسم‌هایی شناخته شده‌ای است که گیاه جهت مقابله و یا تحمل شوری از آنها استفاده می‌کند (Roy *et al.*, 2014; Munns & Gilliam *et al.*, 2015; Hasanuzzaman & Fujita, 2022). تنش شوری از طریق افزایش تشکیل گونه‌های مختلف اکسیژن فعال موجب ایجاد تنش اکسیداسیون در گیاه می‌گردد. تنش

این بررسی از دو نوع متفاوت میکروارگانیسم استفاده گردید با فرض اینکه در صورت وجود رابطه مثبت بین این دو نوع میکروارگانیسم آیا امکان افزایش سودمندی آنها برای گیاه تحت تنش بیشتر خواهد بود یا خیر.

زیمنس بر متر استفاده گردید. اعمال شوری پس از گذشت ۲۱ و ۲۸ روز از سبز شدن گیاهان و از طریق آب آبیاری انجام گرفت. رقم گندم استفاده شده در این آزمایش رقم پیشگام بود.

## مواد و روش‌ها

### نحوه انجام آزمایش

آزمایش در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام در سال ۱۴۰۰ انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل کاربرد و عدم کاربرد قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا و باکتری آزوسپیریوم (گونه *zeae*) تحت اعمال دو سطح شوری ۰ و ۱۲ دسی زیمنس بر متر بود. آزمایش به صورت گلدانی انجام گرفت. گنجایش گلدان‌ها سه کیلوگرم و خاک مورد استفاده جهت آزمایش از مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام تهیه گردید. برای این آزمایش از خاک دو بار استریل استفاده شد. استریل خاک با دستگاه اتوکلاو تحت دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس با فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل با سه تیمار اصلی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تعداد بذره‌های کاشت شده در هر گلدان ۱۰ عدد بود که پس از مرحله دو برگی به ۵ عدد بوته در گلدان کاهش داده شد. جهت تهیه آب شور از مخلوط دو نمک کلرید سدیم (۰.۳۷۵ گرم) و کلرید کلسیم (۶۵ میلی‌گرم) استفاده گردید. با استفاده از این دو نمک شوری آب به ۱۲ دسی زیمنس بر متر رسانده شد. جهت تیمار شاهد از آب معمولی با شوری ۰/۳ دسی

### میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و نحوه آماده

#### سازی آنها

باکتری استفاده شده در این آزمایش از جنس *Azospirillum* گونه *zeae* بود. باکتری مورد استفاده قادر به تحمل یک درصد کلرید سدیم در محیط کشت می‌باشد. این سویه باکتری از ریشه گندم جداسازی و قادر به کلون کردن بخش داخلی ریشه گیاه گندم است. شناسایی ژنتیک این جدایه باکتری با همکاری دکتر کاتیا بورو (مرکز تحقیقات ارفورت برای محصولات باغبانی، دانشگاه علوم کاربردی، ارفورت، آلمان) انجام گرفت. باکتری جداسازی شده بر اساس تجزیه و تحلیل ژن 16S rRNA بیشترین شباهت (۹۸٪) را با *zeae* *S. Indica* داشت. کشت اصلی قارچ *S. Indica* توسط پروفسور فیلیپ فرانکن (مرکز تحقیقات ارفورت برای محصولات باغبانی، دانشگاه علوم کاربردی ارفورت، آلمان) در اختیار قرار داده شد. این قارچ از توانمندی بالایی در تحمل به شوری (۰/۴ مولار کلرید سدیم) برخوردار است (Zarea et al., 2012).

کشت باکتری در محیط نیمه جامد بدون نیتروژن (NFb) تعدیل شده انجام گرفت (Karimi et al., 2018). علت

گرم حاوی کلانیدوسپور در یک کیلوگرم خاک) انجام گرفت.

### تعیین میزان کلونیزاسیون

اندازه‌گیری میزان کلونیزاسیون قارچ با ریشه فقط در تیمارهایی که قارچ اضافه شده بود مورد سنجش قرار گرفت. به این منظور نمونه‌هایی از ریشه در پایان آزمایش تهیه شد. ریشه‌ها در محلول هیدروکسید پتاسیم ده درصد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شدند تا نرم شوند. سپس نمونه‌های ریشه در محلول اسید کلریدریک یک مولار به مدت ۱۰ دقیقه اسیدی گردیدند. پس از آن ریشه‌ها سه بار در آب مقطر شسته شدند. در نهایت نمونه‌های ریشه با ۰/۰۲ درصد تریپان بلو رنگ آمیزی شدند. عمل رنگ آمیزی ریشه در طول شب انجام گرفت. برای حذف لکه‌های اضافی رنگ از ریشه‌ها، نمونه‌ها ریشه در ۵۰ درصد لاکتوفنول برای مدت زمان ۲ ساعت قرار داده شدند. درصد کلونیزاسیون ریشه بر اساس روش گزارش شده قبلی اندازه‌گیری شد (Waller *at al.*, 2005). تعیین میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ *P. indica* در زیر میکروسکوپ نوری انجام گرفت. با قرار دادن قطعات ریشه روی پتری‌دیش مدرج در زیر میکروسکوپ نوری درصد کلونیزاسیون تعیین گردید (McGonigle *et al.*, 1990). به جهت اطمینان از عدم آلودگی ریشه در گیاهان شاهد سه نمونه تصادفی از ریشه گیاهان شاهد گرفته و مراحل رنگ آمیزی و مشاهده میزان آلودگی مطابق روش شرح داده شده انجام گرفت.

استفاده از محیط کشت هزینه کمتر تهیه آن بود؛ ضمن اینکه این محیط کشت محدودیتی جهت رشد باکتری ایجاد نمی‌کند. قبل از تلقیح بذر با باکتری نسبت به ضد عفونی بذر سطحی بذر اقدام گردید. ابتدا بذرهای به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۹۸ درصد غوطه ور گردیدند و سپس به مدت ۴ دقیقه در محلول هیپوکلرید ۲ درصد قرار داده شدند. در انتها بذرهای چندین مرتبه با آب استریل شستشو داده شدند. سپس بذرهای به دو گروه تقسیم شدند: نیمی از آنها با باکتری و نیمی دیگر با باکتری اتوکلاو شده (تیمار شاهد) تلقیح گردیدند. غلظت باکتری مورد استفاده  $10^8 \times 1/8$  CFU بود. میزان مایه تلقیح استفاده شده به نسبت یک میلی‌لیتر محیط کشت باکتری در دانه بود. بذرهای به نسبت ذکر شده در مایه باکتری‌یای غوطه‌ور گردید. جهت اطمینان از تلقیح کامل بذرهای غوطه‌ور شده در مایه تلقیح با تعداد ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت یک ساعت شیک گردیدند. جهت بذرهای شاهد از محیط کشت باکتری اتوکلاو شده  $10^8 \times 1/8$  CFU باکتری استفاده شد.

جهت تهیه مایه تلقیح قارچ از محیط کشت هیل و کافر (Hill & Kaefer, 2001) استفاده گردید. ابتدا ۷ پلاگ قارچی (به قطر ۵ میلی‌متر) از کشت تازه قارچ جداسازی و به ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر مایه کشت منتقل گردید. رشد قارچ با قرار دادن ارلن‌ها بر شیکر تحت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ۱۴ روز انجام گرفت. تلقیح به روش مخلوط کردن قارچ با خاک (۱۰)

DNA، سنتز cDNA و تعیین کمی و کیفی RNA

استخراج شده مطابق روش گزارش شده انجام گرفت (Zarea & Karimi, 2023c). از پرایمرهای پیشرو و برگشت گزارش شده (Tavakoli *et al.*, 2016) برای تعیین میزان بیان ژن *P5CS* استفاده شد. پرایمرهای رو به جلو و معکوس مورد استفاده برای کپی برداری از ژن مورد هدف TCGGTGCTGAGGTTGGCATAAG و TTGTCACCATTCCACTTGCCC بودند (Tavakoli *et al.*, 2016). از تکنیک Real-time

quantitative Polymerase Chain Reaction جهت کمی سازی میزان بیان ژن هدف و ژن مرجع به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. برای محاسبه میزان بیان ژن مورد نظر (*P5CS*) از فرمول  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  استفاده گردید (Livak & Schmittgen, 2001). داده های ژن هدف (*P5CS*) با استفاده از ژن رفرنس *actin* تحلیل گردیدند.

### محتوای آب نسبی برگ

تعیین محتوای آب نسبی برگ از برگ های کاملاً توسعه یافته و بر اساس روش توصیف شده (Ritchie *et al.*, 1990) تعیین شد. نمونه های برگ در ساعات ظهر بین ساعت ۱ تا ۲ از تمام گلدانها گرفته شد. برگ های نمونه برداری شده به قطعات با ابعاد یک سانتیمتر مربع برش داده شدند. بلافاصله قطعات تهیه شده که از مرکز برگها تهیه شده بودند وزن شدند (وزن تازه). سپس نمونه های قطعات برگ در فالكون حاوی آب مقطر به

### سوکسینات دهیدروژناز

سوکسینات دی دهیدروژناز معیاری از فعالیت قارچ در ریشه را نشان می دهد. با توجه به اینکه گیاهان شاهد هیچ گونه آلودگی ریشه با قارچ را نداشتند بنابراین اندازه گیری سوکسینات دی دهیدروژناز نیز فقط در گیاهانی که با قارچ آلوده شده بودند انجام گرفت. برای اندازه گیری سوکسینات دهیدروژناز از روش مبتنی بر استفاده از نمک نیترو بلو تترازولیوم استفاده گردید (Kough *et al.*, 1987). به این منظور ریشه ها به قطعات ۰.۵ سانتی متر برش داده شدند و سپس در بافر تریس ۰/۵ مولار با میزان اسیدیته ۷/۴ تحت شرایط دمای اتاق قرار داده شدند. بافر تریس مورد استفاده حاوی سوکسینات سدیم ۰/۲۵ مولار، کلرید منیزیم ۰/۵ میلی مولار و نمک نیترو بلو تترازولیوم (۱ میلی گرم در میلی لیتر) بود. ریشه های رنگ آمیزی شده به مدت ۱۰ دقیقه در هیدرات کلرال آبی ۲۰ درصد جوشانده شدند تا تشبیت رنگ انجام گردد.

### بیان ژن *P5CS*

۲۴ ساعت پس از اعمال دومین شوری نمونه گیری برگ به جهت استخراج RNA کل انجام گرفت. از کیت RiboEx Total RNA-301-001 kit (شرکت پیشگام، تهران، ایران) جهت استخراج RNA استفاده گردید. RNA کل استخراج شده در آب DEPC با کمک حرارت دادن (قرار دادن در بن ماری) حل گردید. هضم آلودگی

(معادله ۲) (هدایت الکتریکی اولیه / هدایت الکتریکی مطلق)  $\times 100 =$  نشت الکترولیت (درصد)

### اندازه گیری پرولین

غلظت پرولین برگ به روش اسپکتروفتومتری از برگ‌های گیاهی و با استفاده از روش مبتنی بر نین‌هیدرین (Bates *et al.*, 1973) اندازه‌گیری شد. پرولین از نمونه‌های برگ تازه با اسید سولفوسالیسیلیک ۳ درصد استخراج شد. جذب عصاره پرولین در تولوئن در طول موج ۵۲۰ نانومتر ثبت شد (Bates *et al.*, 1973). به جهت تعیین غلظت پرولین در عصاره‌های استخراج شده از منحنی استاندارد پرولین استفاده گردید. به این منظور محلول‌هایی حاوی مقادری مختلف پرولین (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم ال-پرولین) تهیه شد و میزان جذب آنها در طول موج ۵۲۰ نانومتر خوانش گردید. سپس غلظت پرولین عصاره‌های استخراجی با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده به صورت میکرومول در گرم وزن تازه برگ محاسبه و بیان شد.

### اندازه گیری رنگی‌رنگی‌های فتوسنتزی

رنگی‌رنگی‌های کلروفیلی (کلروفیل a، کلروفیل b، و مقدار کلروفیل کل) از برگ کاملاً توسعه یافته، و بر طبق روشی که توسط آرنون (Arnon, 1949) شرح داده شده تعیین گردید. رنگی‌رنگی‌های کلروفیلی با استفاده از استون ۸۰ درصد استخراج گردید. جذب عصاره حاوی رنگی‌رنگی‌های استخراج شده کلروفیلی در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و

مدت ۲۴ ساعت غوطه ور شدند. با گذشت ۲۴ ساعت برگ‌ها با دستمال کاغذی به آرامی خشک و وزن اشباع آنها (وزن تورژسانس برگ) تعیین گردد. در آخر وزن خشک نمونه‌های برگ اندازه‌گیری و میزان درصد محتوای آب نسبی برگ بر اساس معادله ۱ تعیین شد.

(معادله ۱)  $100 \times (\text{وزن خشک برگ} - \text{وزن اشباع برگ}) / (\text{وزن خشک برگ} - \text{وزن تازه برگ}) =$  محتوای آب نسبی برگ (درصد)

### نشت الکترولیت

در این تحقیق نشت الکترولیت مطابق با روش منتشر شده (Lutts *et al.*, 1996) اندازه‌گیری شد. به این منظور نمونه‌هایی از برگ از هر گلدان تهیه شد. نمونه‌برداری از برگ‌ها در ظهر (بین ساعت ۱ تا ۲ بعدازظهر) انجام شد. نمونه‌های برگ به آرامی با آب مقطر شسته شدند تا املاح چسبیده به سطح برگ حذف گردد. دیسک‌هایی از مرکز برگ (بخش وسط برگ) با ابعاد ۱ سانتیمتر مربع تهیه شدند. دیسک‌های برگ در فالكون حاوی ۲۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق و تحت تاریکی غوطه ور شدند. پس از غوطه‌وری، رسانایی اولیه (هدایت الکتریکی) با استفاده از رسانایی‌متر (Ec-Meter، GLP31، CRISON، اسپانیا) اندازه‌گیری شد. سپس دیسک‌های برگ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو شده و رسانایی مطلق تعیین شد. درصد نشت الکترولیت مطابق معادله ۲ تعیین شد.



به ترتیب در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر انجام شد. میزان مالون دی آلدئید با کم کردن مقدار جذب اختصاصی خوانده شده از مقدار جذب غیراختصاصی تعیین شد. مقدار مالون دی آلدئید موجود به صورت نانومول در گرم وزن تازه محاسبه شد.

### محتوای نیتروژن

در پایان آزمایش بخش هوایی گیاهان به جهت اندازه‌گیری نیتروژن برداشت گردید. از روش کج‌دال برای تعیین میزان نیتروژن گیاه استفاده گردید.

### تجزیه داده‌ها

با نظر به اینکه در این پژوهش از خاک دو بار استریل شده استفاده شد بود و همچنین رنگ آمیزی از ریشه گیاهان شاهد نیز هیچ گونه آلودگی با هیچ قارچی را نشان نداد، بنابراین تعیین میزان فعالیت سوکسنیت دهیدروژناز و میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ فقط در گیاهان آلوده شده با قارچ و تحت تاثیر تیمار شوری و باکتری انجام گرفت. برای این منظور شوری به عنوان یک تیمار (فاکتور) اصلی و کاربرد به تنهایی قارچ و یا کاربرد آن با باکتری به عنوان عامل دوم در نظر گرفته شد. آنالیز داده‌ها به صورت آزمایش فاکتوریل دو عاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. برای سایر صفات و بر اساس طرح آزمایشی (فاکتوریل سه عاملی بر پایه طرح کاملاً تصادفی) انتخاب شده تاثیر سه فاکتور شوری،

۴۷۰ نانومتر قرائت گردید (Lichtenthaler & Wellburn, 1983). از معادلات ۳ و ۴ برای تعیین میزان غلظت کلروفیل در نمونه‌ها استفاده گردید.

(معادله ۳) 
$$\text{Chl a (mg g}^{-1} \text{ FW)} = [(13.95\text{OD}665 - 6.88\text{OD}649)V/200 W$$

(معادله ۴) 
$$\text{Chl b (mg g}^{-1} \text{ FW)} = [(24.96\text{OD}649 - 7.32\text{OD}665)V/200W$$

در این معادلات A663 جذب در طول موج ۶۶۳ نانومتر و A645 جذب در طول موج ۶۴۵ نانومتر است.

### مالون دی آلدئید

مقدار مالون دی آلدئید بر روی ۰/۵ گرم نمونه برگ تازه و بر اساس روش توصیف شده اندازه‌گیری (Stewart & Bewley, 1980) و به صورت نانو مول در گرم وزن تر بیان شد. نمونه برگ در ۲ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۰.۱ درصد هموژنیزه شد. هموژنه در ۱۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و ۲ میلی‌لیتر مایع رویی به لوله جدید منتقل شد. سپس ۵ میلی‌لیتر تیوباربتوریک اسید در محلول تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد به نمونه هموژن برگ اضافه شد. مخلوط در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب انکوبه شد. برای توقف واکنش، نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت روی یخ نگهداری شدند. فاز رویی با سانتریفیوژ کردن نمونه‌ها (تعداد دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه) برداشت شد. قرائت جذب اختصاصی و غیراختصاصی مالون دی آلدئید

رقم شاهد این میزان به دلیل استریل بودن خاک صفر بود. صرف نظر از اعمال و عدم اعمال شوری، کاربرد باکتری *آزوسپیریلوم* موجب افزایش ۳.۱۷ درصدی در میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ گردید (شکل ۳). عدم تغییر معنی‌دار در میزان کلونیزاسیون ریشه تحت تاثیر شوری را می‌تواند مربوط به دو عامل دانست. گزارش گردیده است که اعمال شوری موجب افزایش قابل توجهی در میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ میکوریز نگردید (Scharnagl *et al.*, 2018). بر خلاف گزارش ذکر شده قبلی در مطالعه‌ای دیگر کاهش قابل توجه در میزان کلونیزاسیون به علت شوری بالا گزارش گردیده است (Yu *et al.*, 2012). در این آزمایش مدت زمانی که گیاهان تحت تنش شوری قرار گرفتند طولانی نبود. بنابراین تنش شوری اعمال شده نتوانسته تاثیر معنی‌دار بر میزان همزیستی قارچ داشته باشد. همچنین قارچ مورد استفاده در این تحقیق قادر به تحمل شوری‌های بسیار بالایی است (Zarea *et al.*, 2012). بنابراین شوری اعمال شده هر چند روی گیاه تاثیر گذار بوده اما روی قارچ تاثیری نداشته است. از طرفی دیگر همزیستی با قارچ در مراحل اولیه رشد اتفاق افتاده است. باکتری تاثیر مثبت بر میزان کلونیزاسیون داشت. مطالعات انجام شده سودمندی بین قارچ‌های میکوریزی و *آزوسپیریلوم* بر گیاه میزبان را مورد بررسی و تایید قرار داده اند (Ruíz-Sánchez *et al.*, 2011; Domínguez-Núñez *et al.*, 2015).

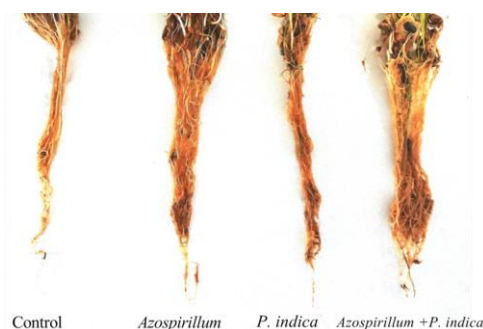
باکتری و قارچ و اثرات دوگانه و سه گانه آنها بر سایر صفات اندازه‌گیری شده تحت تجزیه آنالیز واریانس قرار گرفت. از نرم افزار SAS برای تجزیه آنالیز داده‌ها استفاده شد و در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمار، از آزمون حداقل اختلاف استاندارد (LSD) برای مقایسه میانگین تیمارها استفاده گردید.

## نتایج و بحث

### میزان کلونیزاسیون و سوکسینات دهیدروژناز

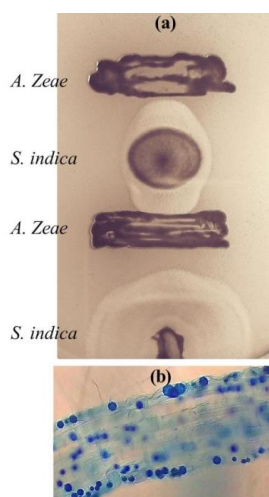
میزان همزیستی قارچ و سوکسینات دهیدروژناز فقط از گلدان‌هایی که با قارچ تلقیح شده بودند و تحت تاثیر کاربرد و عدم کاربرد باکتری و اعمال و عدم اعمال شوری مورد سنجش قرار گرفت. به عبارتی سنجش دو صفت اندازه گیری شده در گیاهان شاهد انجام نگرفت. نتایج آنالیز واریانس تاثیر تیمارها بر میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ در جدول ۱ نشان داده شده است.

تاثیر تلقیح با باکتری، قارچ *پریفورموسپورا ایندیکا* و باکتری *آزوسپیریلوم* بر شکل ظاهری ریشه گندم رقم پیشگام در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل ۲ (الف) میزان کلونیزاسیون ریشه با قارچ در گیاهان شاهد و تلقیح یافته تحت حضور و عدم حضور باکتری استفاده شده را نشان می‌دهد. همچنین شکل ۲ (ب) تاثیر القاء کنندگی باکتری بر رشد قارچ را بر روی پلیت کشت نشان می‌دهد. بر اساس رنگ آمیزی ریشه درصد کلونیزاسیون قارچ با ریشه گندم رقم پیشگام ۲۴.۹ درصد بود (شکل ۳). در



شکل ۱- تاثیر تلقیح به تنهایی و یا در کاربرد دوجانبه باکتری آزوسپیریلوم و قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا بر شکل ظاهری گندم رقم پیشگام در مقایسه با تیمار کنترل

**Figure 1. Effect of inoculation of *Azospirillum* or in combination with *Piriformospora indica* on the growth features of wheat plants roots cultivar Pishgam compared to the control treatment.**



شکل ۲- تاثیر باکتری آزوسپیریلوم بر القاء رشد قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا بر محیط کشت (الف) و کلونیزاسیون ریشه گندم با قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا (ب)

**Figure 2. The effect of *Azospirillum* inoculation on the induction growth of *P. indica* in culture medium (a) and wheat root colonized by *P. indica* (b).**

جدول ۱- تاثیر شوری و تلقیح با قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا و باکتری آزوسپیریلوم بر میزان کلونیزاسیون ریشه و سوکسینات دهیدروژناز در گندم رقم پیشگاه تحت تنش شوری

**Table 1. Effect of inoculation with *Piriformospora indica* and *Azospirillum* on root colonization rate and succinate dehydrogenase activity of wheat cultivar Pishgam subjected to salinity stress**

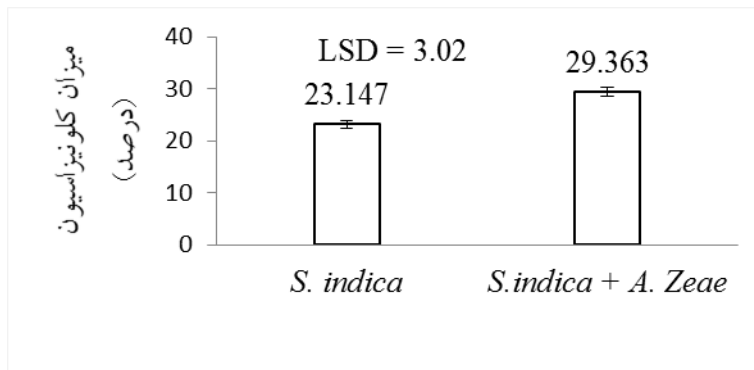
منابع تغییر	درجه آزادی	میزان کلونیزاسیون	سوکسینات دی دهیدروژناز
SOV	d.f.	Colonization rate	Succinate dehydrogenase
شوری Salinity	1	0.37ns	0.28ns
تلقیح Inoculation <sup>†</sup>	1	115.9 **	76.4**
شوری × تیمار Salinity × Treatment	1	3.08	0.45ns
خطا Error	8	1.5	5.26
ضریب تغییرات (درصد) C.V.		8.63	5.41

\*، \*\* و ns: به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم تفاوت معنی دار

<sup>†</sup> کاربرد قارچ به تنهایی و در کاربرد آن با باکتری

\*, \*\* and ns: significant at 5%, 1% probability levels, and non-significant, respectively

<sup>†</sup> Inoculation with *P. indica* alone or in combination with *Azospirillum*



شکل ۳- درصد کلونیزاسیون ریشه گندم تلقیح شده با قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا به تنهایی و یا در کاربرد آن با باکتری آزوسپیریلوم

**Figure 3. Percentage of wheat root colonization inoculated with *Piriformospora indica* fungus alone or in combination with *Azospirillum***

کاربرد باکتری آزوسپیریلوم در جدول ۱ نشان داده شده

است. شوری تاثیری معنی دار بر سوکسینات دهیدروژناز

نداشت اما تلقیح با باکتری میزان آن را به صورت معنی دار

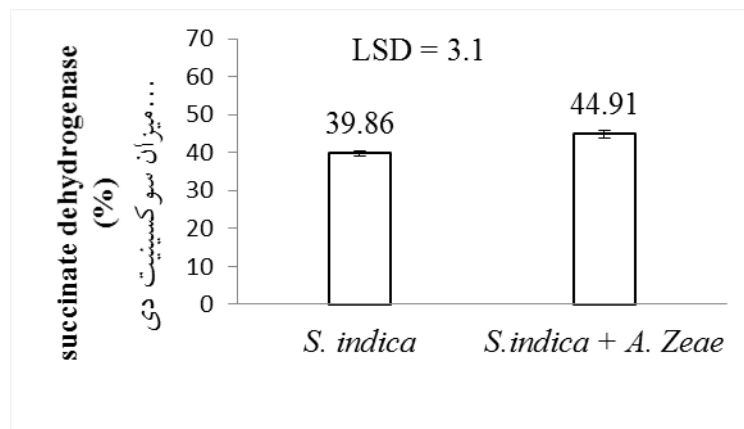
میزان سوکسینات دهیدروژناز

تاثیر تیمار شوری بر میزان فعالیت سوکسینات دهیدروژناز

در گیاهان تلقیح شده با قارچ تحت تاثیر کاربرد و عدم

دارد و شوری به یک نسبت موجب کاهش فعالیت متابولیکی در بین قارچ‌های متفاوت نمی‌گردد (Djighaly *et al.*, 2018). قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا از تحمل بالایی به شوری برخوردار است (Zarea *et al.*, 2012) بنابراین شوری اعمال شده نتوانسته تاثیری بر سوکسیات دهیدروژناز داشته باشد. باکتری موجب افزایش فعالیت متابولیکی قارچ (میزان سوکسیات دهیدروژناز) گردید که شاید یکی از علل آن افزایش درصد کلونیزاسیون قارچ در این آزمایش باشد.

افزایش داد. شکل ۳ میزان سوکسیات دهیدروژناز در گیاهان تلقیح شده با قارچ در حضور و عدم حضور باکتری را نشان داده است. حضور باکتری در مقایسه با عدم تلقیح آن موجب افزایش میزان سوکسیات دهیدروژناز گردید (شکل ۳). سوکسیات دهیدروژناز نشان دهنده مکان‌های است که قارچ دارای فعال متابولیکی است و این میزان در بین قارچ‌های آربوسکولار میکوریز متغیر است (Abdel-Fattah, 2001). گزارش گردیده است که تاثیر شوری بر میزان سوکسیات دی دهیدروژناز که منعکس کننده فعالیت متابولیکی قارچ در ریشه است بستگی به نوع قارچ



شکل ۴- درصد سوکسیات دهیدروژناز ریشه در تلقیح با قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا و در تلقیح آن و باکتری آروسپیریلوم

**Figure 4. Root succinate dehydrogenase activity in wheat plant inoculated with *Piriformospora indica* alone or in co-inoculation with *Azospirillum* bacteria**

مسئول سنتز پرولین، محتوای نسبی آب برگ، میزان مالون دی آلدئید و نشت یونی و نیز میزان رنگیزه‌های کلروفیلی در جدول ۲ نشان داده شده است.

میزان بیان ژن *P5CS*، تغییرات صفات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک تاثیر تیمار شوری، قارچ، باکتری و اثرات دوگانه و سه گانه آنها بر محتوای نیتروژن گیاه، پرولین برگ، میزان بیان ژن

جدول ۲- تاثیر تلقیح با قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا و آزوسپیریلوم بر محتوای نیتروژن، تجمع پرولین، بیان ژن مسئول سنتز پرولین (P5CS)، میزان محتوای نسبی آب برگ، مالون دی آلدهید، نشت الکترولیت و میزان رنگیزه‌های کلروفیل در گندم تحت تنش شوری

**Table 2. Effect of inoculation with *Piriformospora indica* and *Azospirillum* on nitrogen content, proline accumulation, P5CS gene expression, content of leaf relative water content, malondialdehyde, electrolyte leakage, and chlorophyll pigment content of wheat subjected to salinity stress**

منابع تغییر SOV	درجه آزادی <i>d.f.</i>	محتوای نیتروژن N content	پرولین	بیان ژن P5CS expression	محتوای آب نسبی برگ LRWC	مالون دی آلدهید MDA	نشت الکترولیت EL	کلروفیل a Chl a	کلروفیل b Chl b
شوری (S)	1	1.57**	34.2**	42.2**	619**	6.28**	22.3**	0.001ns	0.0036ns
قارچ <i>P. indica</i> (Pi)	1	2.62**	0.9*	0.31*	218**	0.86*	4.69**	0.27**	0.0008ns
باکتری <i>Azospirillum</i> (Az)	1	1.95**	37.4**	1.04**	176**	0.71*	13.1**	0.35**	0.0033ns
شوری در باکتری S × Az	1	0.06ns	18.4**	0.71**	5.2ns	1.07*	10.96**	0.007ns	0.0022ns
شوری در قارچ S × Pi	1	0.1*	5.2**	0.41*	11.1ns	0.51*	8.12**	0.002ns	0.027ns
باکتری در قارچ Az × Pi	1	0.44**	17.8**	2.34**	7.1ns	0.43*	8.37**	0.037ns	0.0025ns
شوری در قارچ در باکتری S × Az × Pi	1	0.12*	9.8**	0.56**	69.4**	1.19*	4.26**	0.0008ns	0.0007ns
خطا Error	16	0.016	0.17	0.06	3.34	0.104	0.35	0.029	0.01
ضریب تغییرات C.V.		5.58	6.64	10.15	2.4	11.62	9.27	15.96	19.64

\*، \*\* و ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد و عدم تفاوت معنی‌دار

\*, \*\* and ns: significant at 5%, 1% probability levels, and non-significant, respectively

## محتوای نیتروژن

است (Fukami *et al.*, 2018). همچنین این گروه از

باکتریها از طریق تاثیر بر رشد ریشه سطح جذب عناصری

مانند نیتروژن را نیز افزایش می‌دهند (Ribeiro *et al.*, 2022).

بنابراین بالاتر بودن میزان محتوای نیتروژن

گیاهان تلقیح شده با باکتری می‌تواند به دو ویژگی ذکر

شده این باکتری‌ها مرتبط باشد. قارچ پیریفورموسپورا

/ ایندیکا قادر به افزایش جذب عناصر غذایی به گیاه میزبان

است (Kundu & Vadassery, 2022). جذب بیشتر

نیتروژن در گیاهان تلقیح شده با این قارچ در مقایسه با

اثر تیمار شوری، تلقیح با قارچ و باکتری بر میزان

نیتروژن گیاه معنی‌دار بود (جدول ۲). شوری موجب

کاهش محتوای نیتروژن گیاه گردید. تلقیح با باکتری

محتوای نیتروژن را افزایش داد (شکل ۵). همچنین

گیاهان تلقیح شده با قارچ نیز از محتوای نیتروژن

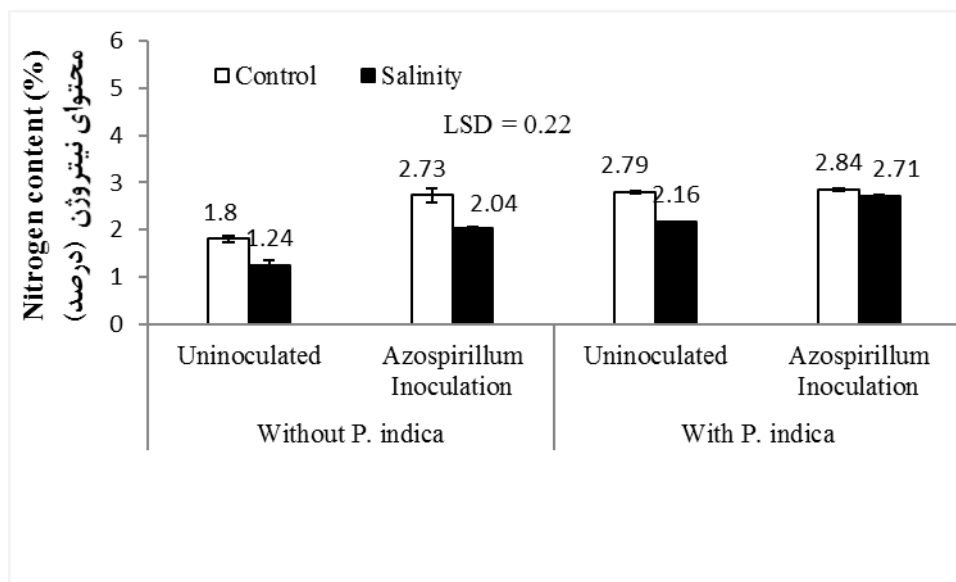
بیشتری برخوردار بودند. بیشترین میزان نیتروژن تحت

تنش شوری از گیاهان تلقیح شده با تلقیح دوگانه قارچ و

باکتری حاصل گردید (شکل ۵). باکتری جنس

*آزوسپیریلوم* دارای توانمندی تثبیت ژنسیته نیتروژن

گیاهان شاهد تحت تنش شوری قبلاً نیز گزارش شده است (Ghorbani et al., 2019).



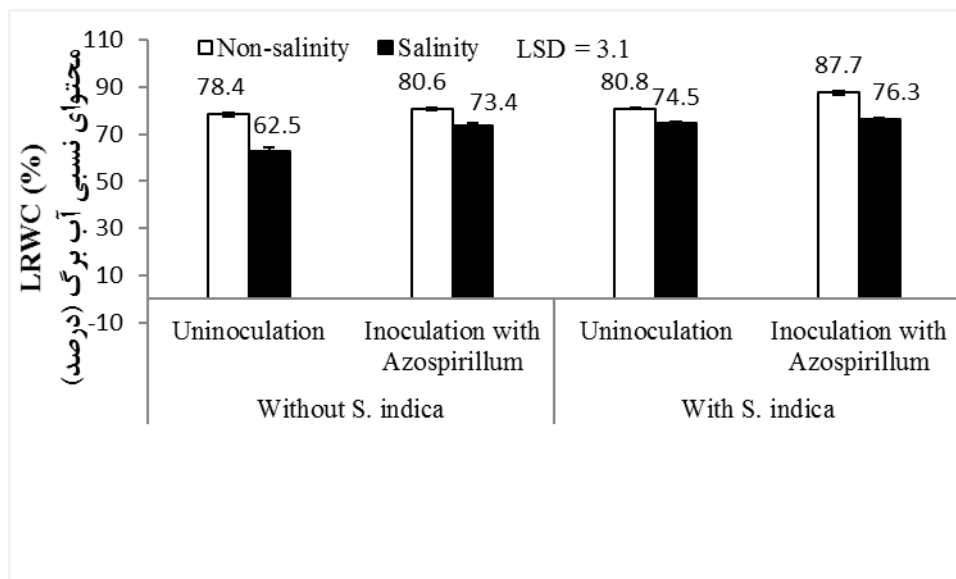
شکل ۵- تاثیر تلقیح با *آزوسپیریلوم* و قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* بر میزان نیتروژن گیاه گندم تحت اعمال تنش شوری

Figure 5. The effect of inoculation with *Azospirillum* and *Piriformospora indica* on the nitrogen content in wheat plants under salt stress

گرفته تایید شده است. به عنوان نمونه گزارش گردیده که تلقیح گیاهان گندم با *باسیلوس مگاتریوم* موجب افزایش ۵۹ درصد محتوای نسبی آب نسبی و کاهش محتوای مالون دی آلدهید تحت تنش خشکی گردیده است (Rashid et al., 2021). چنین تاثیر مثبتی بر افزایش میزان جذب آب به وسیله قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* نیز در گیاه گندم تحت تنش خشکی بیان گردیده است (Hosseini et al., 2017).

#### محتوای نسبی آب برگ

نتایج تجزیه واریانس برای اثرات شوری، قارچ و باکتری بر محتوای آب نسبی برگ در جدول ۲ نشان داده شده است. اثر هر سه تیمار (قارچ، باکتری و شوری) و نیز اثر متقابل آنها بر میزان آب نسبی برگ معنی دار بود (جدول ۲). گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری از محتوای آب نسبی بیشتری تحت اعمال شوری برخوردار بودند (شکل ۶). بالاتر بودن میزان آب نسبی برگ در اثر کاربرد باکتری‌های القاء کننده رشد در مطالعات قبلی انجام



شکل ۶- تاثیر تلقیح با *آزوسپیریلوم* و *قارچ پیریفورموسپورا ایندیکا* بر میزان محتوای نسبی آب برگ گندم تحت اعمال تنش شوری

**Figure 6. The effect of inoculation with *Azospirillum* and *Piriformospora indica* on the leaf relative water content in wheat plants under salt stress**

(Bajji *et al.*, 2002). گزارش گردیده که شوری موجب

افزایش نشت یونی در گندم شده است (Pastuszak *et al.*, 2022).

کاهش میزان نشت الکترولیت و تولید مالون

دی آلدئید و افزایش فعالیت سیستم آنتی اکسیدانت در

کاربرد قارچ‌های همزیست ریشه قبلاً نیز مورد تایید قرار

گرفته است (Huang *et al.*, 2023). عنوان شده است

که تلقیح با باکتری *آزوسپیریلوم* به طور قابل توجهی

آسیب ناشی از تنش خشکی در گیاه گندم را کاهش داده

و این کاهش با نشت کمتر الکترولیت‌ها و تجمع کمتر

مالون دی آلدئید و پراکسید هیدروژن همراه بوده است

(Kasim *et al.*, 2021). بیان گردیده که اعمال شوری

۵۰ میکرومولار با استفاده از کلرید سدیم موجب افزایش

میزان نشت الکترولیت و مالون دی آلدئید

بر اساس نتایج جدول آنالیز داده‌ها (جدول ۲) تاثیر

شوری، قارچ و باکتری بر میزان نشت الکترولیت معنی‌دار

بود. تحت تنش شوری بیشترین میزان نشت الکترولیت را

گیاهان شاهد و کمترین آن را گیاهان تلقیح شده با قارچ

و باکتری نشان دادند (شکل ۷). نشت الکترولیت

شاخصی از میزان شدت تنش وارده شده بر گیاه را

منعکس می‌کند. تنش‌های محیطی مانند تنش خشکی و

شوری موجب افزایش نشت یونی از غشاهای سلولی

می‌گردد (Demidchik *et al.*, 2014). نشت الکترولیت

یک روش متداول برای ارزیابی از بین رفتگی یکپارچگی

غشای سلولی تحت تنش‌های مختلف مانند شوری است

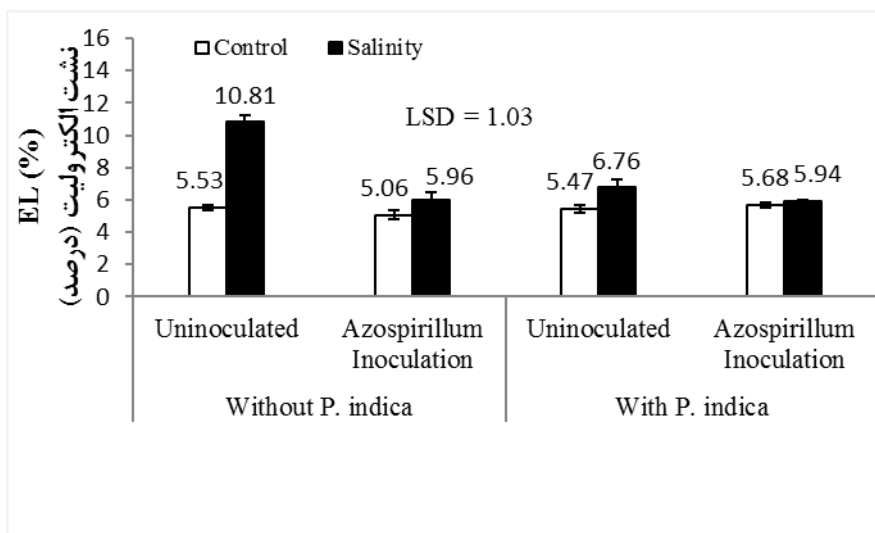


تولید زیاد مالون دی آلدئید در مقایسه با گیاهان شاهد شدند (شکل ۸). تنش‌های ثانویه مانند تنش اکسیداسیونی اغلب به دلیل تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال اتفاق می‌افتد. گزارش شده شوری موجب افزایش میزان گونه‌های اکسیژن فعال در گیاه گندم گردیده است (Kononenko *et al.*, 2020). بنابراین افزایش سطح گونه‌های فعال در گیاه به علت شوری باعث شکل‌گیری گونه‌های اکسیژن فعال شده که نتیجه آن اکسیداسیون لیپیدهای غشاء است (Sharma *et al.*, 2012; Zeeshan *et al.*, 2020). تولید مالون دی آلدئید در اثر اکسیداسیون لیپیدها در غشا اتفاق می‌افتد. بنابراین میزان مالون دی آلدئید می‌تواند نشانه‌ای از میزان شدت تنش وارده بر گیاه باشد. افزایش محتوای مالون دی آلدئید در اثر تنش شوری در گیاه گندم قبلاً نیز گزارش گردیده است (Zeeshan *et al.*, 2020). گزارش شده است افزایش محتوای مالون دی آلدئید به دلیل پیری برگ و افزایش سرعت پراکسیداسیون لیپیدی به دلیل تنش اکسیداتیو نیز اتفاق می‌افتد (Jakhar *et al.*, 2012). البته در آزمایش حاضر میزان افزایش مالون دی آلدئید هرچند تحت تاثیر کاربرد تیمار شوری افزایش یافت اما این مقدار افزایش چندان زیاد نبود که علت آن را می‌توان به کوتاه بودن طول دوره تنش مرتبط دانست. گزارش شده است تنش‌های طولانی مدت و تنش‌های شوری بالا موجب افزایش میزان مالون دی آلدئید در گیاه گندم گردید (Hnilickova *et al.*, 2021). مالون دی آلدئید یک محصول طبیعی پراکسیداسیون لیپیدی

نشت الکترولیت در گیاهچه گندم از ۱۰ درصد به بیش از ۲۰ درصد گردیده است؛ در حالیکه شوری ۱۵۰ میلی مولار میزان آن را تا بیش از ۷۰ درصد افزایش داده است (Ma *et al.*, 2015). البته میزان نشت الکترولیت می‌تواند تحت تاثیر ژنوتیپ گیاه و میزان سطح شوری اعمال شده نیز قرار گیرد (Pastuszek *et al.*, 2022). در این مطالعه شوری موجب افزایش معنی‌دار نشت الکترولیت در مقایسه با عدم اعمال شوری گردید. در این آزمایش هر چند شوری نشت الکترولیت را افزایش داد اما این میزان تغییر چندان زیاد نبود. تغییرات نه چندان بالای نشت الکترولیت در این آزمایش را می‌توان به مکانیسم‌های دفاعی گیاه (تولید آنتی‌اکسیدانت‌ها) و نیز مدت کم اعمال تنش شوری مربوط دانست. علت کمتر بودن نشت یونی در گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری می‌تواند به تاثیرات مثبت این دو میکروارگانیسم در کاهش اثرات سوء تنش شوری باشد. گزارش شده است که آزوسپیریوم گونه لیپوفرام موجب بهبود سیستم آنتی‌اکسیدانتی گیاه، کاهش کمتر رنگیزه‌ها و کاهش نشت الکترولیت و میزان مالون دی آلدئید در گیاه نخود تحت تنش شوری گردیده است (Pastuszek *et al.*, 2022). میزان مالون دی آلدئید تحت تاثیر تیمار شوری، تلقیح با باکتری و قارچ معنی‌دار بود (جدول ۲). همچنین اثر متقابل شوری، قارچ و باکتری نیز بر میزان مالون دی آلدئید معنی‌دار گردید (جدول ۲). شکل ۸ تاثیر تلقیح با قارچ و باکتری را بر میزان تولید مالون دی آلدئید تحت عدم شوری و شوری نشان می‌دهد. باکتری و قارچ مانع از

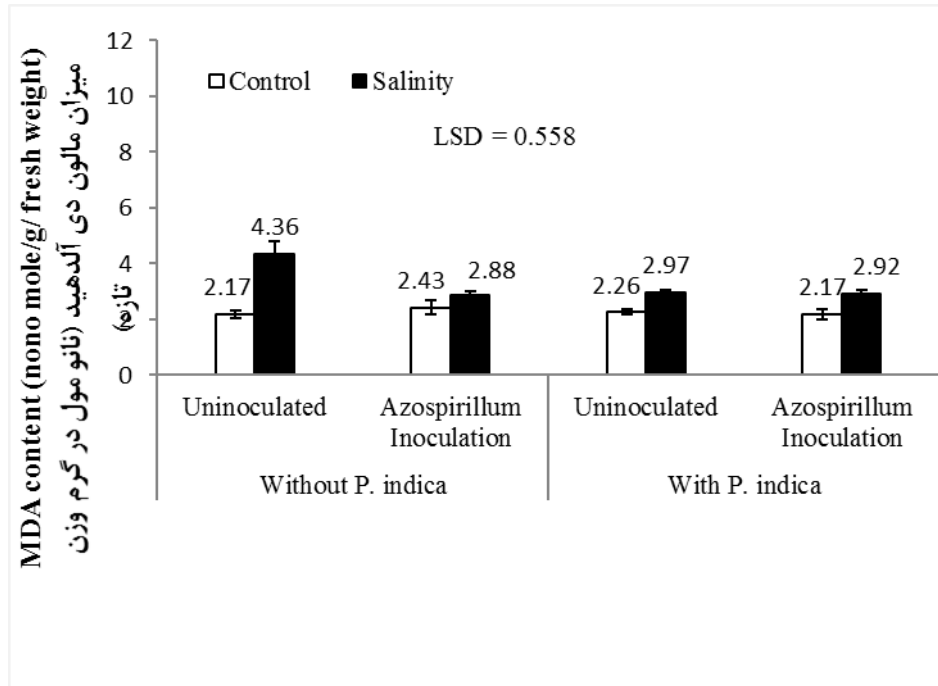
قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا محتوای نسبی آب گیاه را تحت تنش خشکی افزایش داده است و گیاهان تلقیح شده با قارچ میزان کمتری از تنش اکسیداتیو را نشان داده‌اند (Hosseini et al., 2017). در مطالعه‌های دیگر نشان داده شد که شوری نشت الکترولیت غشایی را تا ۷۰/۴ درصد در نعنای فلفلی افزایش داد اما تلقیح با قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا به طور قابل توجهی آسیب دیدگی غشاء را حتی تحت تنش شدید نمک کاهش داد (Khalvandi et al., 2021).

است و به طور معمولی به عنوان شاخصی از میزان آسیب ناشی از تنش به سلول‌ها استفاده می‌شود. باکتری آزوسپیریلوم از طریق تغییرات در رشد ریشه، تولید هورمون‌های رشد گیاهی و تعدیلات ژن‌های مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانت‌ها می‌تواند موجب کاهش شدت اثر سوء تنش بر گیاه گردند (Pastuszak et al., 2022). گزارش شده آزوسپیریلوم با افزایش رشد گندم موجب کاهش کاهش قابل توجه اثرات شوری بالا شده است (Mazhar et al., 2016; Yousefi et al., 2017). چنین اثرات مثبتی از کاربرد قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا قبلاً نیز گزارش گردیده است. بیان شده است که



شکل ۷- تاثیر تلقیح با آزوسپیریلوم و قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا بر میزان نشت الکترولیت گندم تحت اعمال تنش شوری

**Figure 7. The effect of inoculation with *Azospirillum* and *Piriformospora indica* on the electrolyte leakage (EL) content in wheat plants under salt stress**



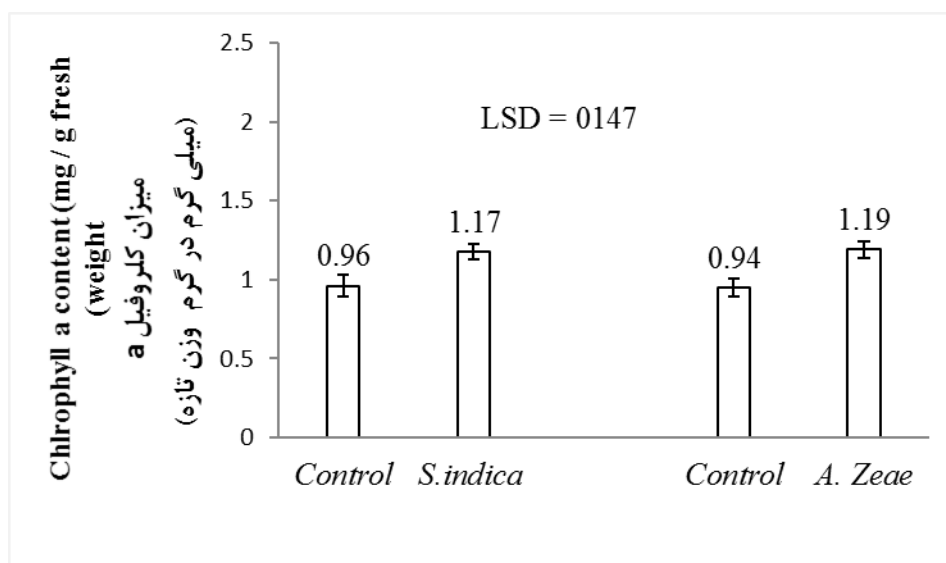
شکل ۸- تاثیر تلقیح با *آزوسپیریلیوم* و قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* بر میزان مالون دی آلدیید برگ گندم تحت شوری

Figure 8. The effect of inoculation with *Azospirillum* and *Piriformospora indica* on the malondeialdehyde (MDA) content in wheat plants under salt stress

در مطالعه حاضر از رقم گندم پیشگام استفاده گردید که جهت کشت آبی مناسب می‌باشد. شاید مدت زمان کم اعمال تنش شوری و یا مکانیسم‌های دفاعی گیاه در مراحل اولیه مواجهه با شوری، مانع از کاهش رنگیزه کلروفیلی در این آزمایش گردیده باشد. در آزمایش حاضر تلقیح با قارچ و باکتری موجب بهبود میزان کلروفیل a گردید. بیشتر بودن رنگیزه کلروفیلی در اثر کاربرد *آزوسپیریلیوم* (Kasim et al., 2021) و قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* (Hosseini et al., 2017) قبلاً نیز گزارش شده است.

#### رنگیزه های کلروفیلی

شوری موجب تغییر معنی‌دار در میزان کلروفیل a و b نگردید (جدول ۲). هر چند تاثیر باکتری و قارچ بر میزان کلروفیل a معنی‌دار بود (جدول ۲). گیاهان صرف نظر از تنش شوری در تلقیح با قارچ و باکتری از میزان بیشتر رنگیزه کلروفیل a برخوردار بودند (شکل ۹). کاهش رنگیزه‌های کلروفیلی در گندم در اثر تنش شوری بسته به نوع ژنوتیپ (Masarmi et al., 2023) و میزان سطح شوری (Haji nia et al., 2012) می‌تواند متفاوت باشد. رنگیزه‌های کلروفیلی و کارتنوئیدها در ارقام مقاوم به شوری گندم در مقایسه با ارقام حساس کمتر تحت تاثیر تنش شوری تغییر می‌کنند (Masarmi et al., 2023).



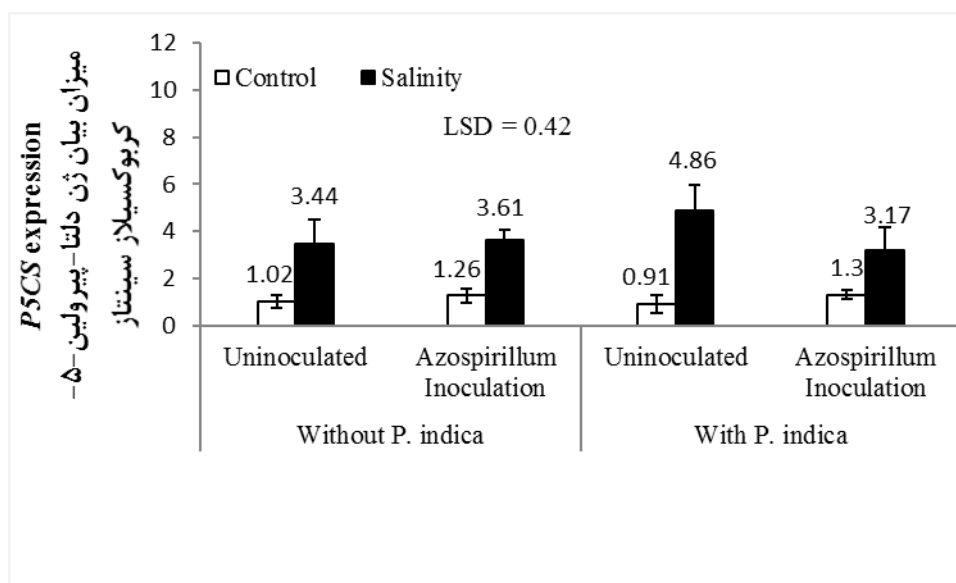
شکل ۹- تاثیر تلقیح با *Azospirillum* و قارچ *Piriformospora indica* بر میزان رنگیزه کلروفیل a برگ گندم در مقایسه با گیاهان شاهد خود

**Figure 9. The effect of inoculation with *Azospirillum* and *Piriformospora indica* on the chlorophyll a content in wheat plants under salt stress**

با روند تجمع پرولین تحت اعمال تنش شوری منطبق بود که بیانگر تاثیر القایی شوری بر میزان بیان این ژن بود. تجمع پرولین در گیاهان کنترل بیش از گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری بود که می‌تواند بیانگر این باشد که میکروارگانیسم‌های استفاده شده از طریق دیگری شدت تنش را بر گیاه میزبان کاهش داده‌اند. با توجه به بالا بودن میزان محتوای آب نسبی برگ در گیاهان تلقیح شده با باکتری و قارچ می‌توان چنین نتیجه گرفت که گیاه نیاز زیادی به تنظیم اسمزی از طریق تجمع پرولین و یا القاء ژن مسئول سنتز آن نداشته است.

#### بیان ژن P5CS

تاثیر تیمار شوری، قارچ و باکتری و اثر متقابل آنها بر میزان بیان دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتتاز ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase; P5CS) معنی‌دار بود (جدول ۲). بر اساس نتایج آزمون آنالیز کمی ژن P5CS، گیاهان شاهد سطوح بیشتری از بیان ژن را نشان دادند (شکل ۱۰). در حالیکه گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری از میزان بیان ژن کمتری برخوردار بودند. همچنین اثر متقابل باکتری و قارچ بر میزان بیان ژن P5CS معنی‌دار بود و موجب کاهش بیشتر آن در مقایسه با گیاهانی که فقط با قارچ تلقیح شده بودند گردید (شکل ۱۰). روند بیان ژن دلتا-پیرولین-۵-کربوکسیلات سینتتاز



شکل ۱۰- تاثیر تلقیح با *آزوسپیریوم* و قارچ *پیریفورموسپورا ایندیکا* بر میزان بیان ژن *P5CS* برگ گندم تحت اعمال تنش شوری

**Figure 10. The effect of inoculation with *Azospirillum* and *Piriformospora indica* on gene expression *P5CS* in wheat plants under salt stress**

(Moukhtari *et al.*, 2020). همچنین عنوان می‌گردد

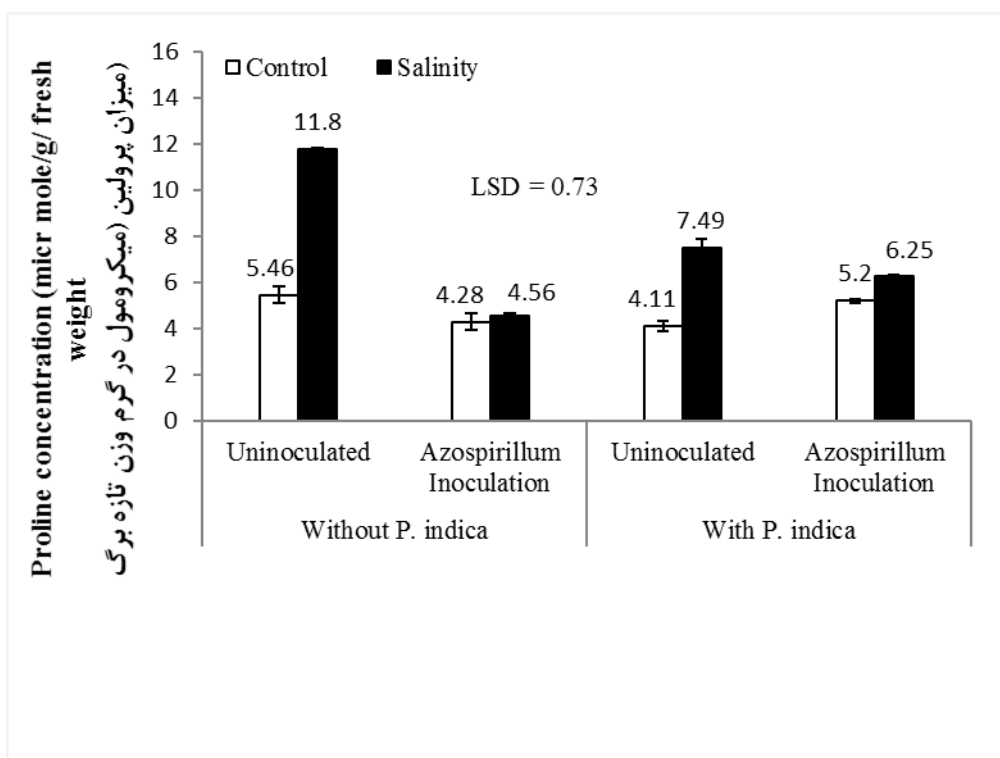
که پرولین قادر به بهبود فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی و کاهش جذب سدیم و کلر به گیاه می‌باشد؛ ضمن اینکه جذب پتاسیم به گیاه را تحت شوری افزایش می‌دهد (El Moukhtari *et al.*, 2020). در این مطالعه گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری سطوح کمتری از میزان تجمع پرولین را تحت شوری نشان دادند که علت آن می‌تواند به وضعیت بهتر محتوای آب داخل گیاه باشد. به عبارت دیگر هم باکتری و هم قارچ قادر به افزایش جذب آب به گیاه هستند؛ بنابراین گیاهان تلقیح شده به علت وضعیت بهتر جذب آب کمتر تحت تنش شوری قرار گرفته‌اند. این نتایج با نتایج گزارش شده اخیر (Kasim *et al.*

#### میزان پرولین

نتیجه تجزیه داده‌ها نشانگر تاثیر معنی‌دار شوری، قارچ، و باکتری و نیز اثرات متقابل آنها بر میزان پرولین بود (جدول ۲). نتایج این تحقیق نشان داد که تحت تنش شوری افزایش میزان پرولین در گیاهان تلقیح شده با قارچ کمتر از گیاهان شاهد بود (شکل ۱۱). چنین روندی نیز در گیاهان تلقیح شده با باکتری مشاهده گردید؛ به طوری که گیاهان تلقیح شده سطوح کمتری از پرولین را تحت تنش شوری نشان دادند. پرولین جزو اسمولیت‌های سازگار گیاهی محسوب می‌گردد که در تنظیم اسمزی سلول نقش دارد (Zarea 2023b). تنش‌های محیطی مانند شوری موجب تجمع پرولین در سلول می‌گردد (El

کامبود آب افزایش یابد (Asrar et al., 2012). در مطالعه دیگر انجام شده بیان گردید که وضعیت آبی گیاه برنج تلقیح شده با قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا در مقایسه با گیاهان شاهد تحت تنش خشکی بهبود یافته است (Tsai et al., 2021).

(al., 2021) مطابقت دارد. گزارش شده است که تلقیح با باکتری آزوسپیریلوم برازیلینس موجب کاهش میزان پرولین، نشت الکترولیت و مالون دی آلدئید در گندم تحت تنش خشکی گردید (Kasim et al., 2021). در ارتباط با قارچ‌های میکوریز، مشاهده شده که کلونیزاسیون گیاه با قارچ‌های آربوسکولار میکوریز موجب شده که پتانسیل آب گیاه حفظ و محتوای نسبی آب گیاه تحت



شکل ۱۱- تاثیر تلقیح با آزوسپیریلوم و قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا بر میزان پرولین برگ گندم تحت اعمال تنش شوری

Figure 11. The effect of inoculation with *Azospirillum* and *Piriformospora indica* on proline content in wheat plants under salt stress

نتیجه‌گیری گیاه توسط قارچ اخیر، و با مطالعات انجام شده نقش این قارچ‌ها در کاهش تنش (به‌ویژه تنش شوری) در اکثر گیاهان زراعی گزرش شده است.

سیستم‌های ریشه اکثر گیاهان خشکی‌زیست توسط قارچ‌های میکوریز کلون می‌شوند که نتیجه آن بهبود رشد

### تشکر و قدردانی

نویسنده اول از پروفسور دکتر فیلیپ فرانکن به جهت در اختیار قرار دادن قارچ پیریفورموسپورا/ ایندیکا، شناسایی ژنتیکی باکتری و فراهم آوردن امکانات مطالعه روابط متقابل بین قارچ و باکتری تشکر و قدردانی می‌نماید. از مطالعه دقیق و پیشنهادات ارزنده داوران محترم قدردانی می‌گردد.

### مشارکت نویسندگان

طراحی آزمایش، مطالعات و اندازه‌گیری‌های آزمایشگاهی تاثیر اثر متقابل قارچ و باکتری، سنتز cDNA از RNA کل، و انجام PCR توسط نویسنده اول؛ استخراج RNA، سنجش پرولین و کلروفیل و آماده‌سازی نمونه‌ها جهت qRT-PCR توسط نویسنده دوم انجام گرفت.

باکتری‌های جنس *آزوسپیریلوم* نیز از توانمندی کاهش اثرات سوء تنش‌های محیطی مانند شوری بر گیاه برخوردارند. در این مطالعه برخی صفات بیوشیمیایی، فیزیولوژی و مولکولی گندم در پاسخ به تلقیح با باکتری *آزوسپیریلوم*، و قارچ *پیریفورموسپورا/ ایندیکا* تحت تنش شوری مورد بررسی قرار گرفت. میزان مالون دی‌آلدئید و نشت یونی که از شاخص‌های ارزیابی میزان تنش بر گیاه است تحت کاربرد میکروارگانسیم‌های مورد مطالعه کاهش یافت. رنگیزه کلروفیلی در اثر کاربرد قارچ و باکتری افزایش یافت، و تجمع پرولین در گیاهان شاهد بیش از گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری بود که نشان‌دهنده آن بود که این دو میکروارگانسیم از طریق دیگری باعث کاهش شدت تنش شوری بر گیاه شده‌اند. همچنین میزان بیان ژن مسئول سنتز پرولین در اثر شوری افزایش اما این افزایش در گیاهان تلقیح شده با باکتری و قارچ کمتر بود.

### References

- Abdel-Fattah, G. M. 2001. Measurement of the viability of arbuscular-mycorrhizal fungi using three different stains; relation to growth and metabolic activities of soybean plants. *Microbiological research*, 156: 359-67. 10.1078/0944-5013-00121.
- Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24: 1-5. 10.1104/pp.24.1.1.
- 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: 157-162. 10.1007/s00374-004-0766-y.
- Asrar, A. A., Abdel-Fattah, G. M., & Elhindi K. M. 2012. Improving growth, flower yield, and water relations of snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) plants grown under well-watered and water-stress conditions using arbuscular mycorrhizal fungi. *Photosynthetica*, 50, 305-316. 10.1007/s11099-012-0024-8.
- Atouei M. T., Pourbabaee, A. A., & Shorafa, M. .2019. Alleviation of salinity stress on some growth parameters of wheat by exopolysaccharide-producing bacteria. *Iranian Journal of Science and Technology*, 43, 2725-2733. 10.1007/s40995-019-00753-x.
- Bajji, M., Kinet, J. M., & Lutts, S. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation*, 36, 61-70. 10.1023/A:1014732714549.

- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. D. 1973. Rapid Determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-207. <https://doi.org/10.1007/BF00018060>.
- Boorboori, M. R., Zhang, H. Y. 2022. The Role of *Serendipita indica* (*Piriformospora indica*) in improving plant resistance to drought and salinity stresses. *Biology (Basel)*, 11, 952. <https://doi.org/10.3390/biology11070952>.
- Cheng, Z., Woody, O. Z., Mcconkey, B. J., & Glick, B. R. 2012. Combined effects of the plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and salinity stress on the *Brassica napus* proteome. *Applied Soil Ecology*, 61: 255-263. [0.1016/j.apsoil.2011.10.006](https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.10.006).
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S. S., Pozhvanov, G. A., Sokolik, A., & Yurin V. 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K<sup>+</sup>-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 65: 1259-70. [10.1093/jxb/eru004](https://doi.org/10.1093/jxb/eru004). Epub 2014 Feb 11.
- Djighaly, P.I., Diagne, N., Ngom, M., Hoher, D., Fall, V., Diouf, D., Laplace, L., Svistoonoff, S., & Champion, A. 2018. Selection of arbuscular mycorrhizal fungal strains to improve *Casuarina equisetifolia* L. and *Casuarina glauca* Sieb. Tolerance to salinity. *Annals of Forest Science*, 75, 72. [10.1007/s13595-018-0747-1](https://doi.org/10.1007/s13595-018-0747-1).
- Domínguez-Núñez, J. A., Berrocal-Lobo, M., & Albanesi, A. S. 2015. Interaction of *Azospirillum* and Mycorrhiza. In: Cassán, F., Y. Okon and C. Creus. (eds) *Handbook for Azospirillum*. Springer, Cham.
- El Moukhtari, A., Cabassa-Hourton, C., Farissi, M., & Savouré, A. 2020. How does proline treatment promote salt stress tolerance during crop plant development? *Frontiers in Plant Science*, 11, 1127. doi: [10.3389/fpls.2020.01127](https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01127).
- Fukami, J., Cerezini, P., & Hungria, M. 2018. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. *AMB Express*, 8, 73. [10.1186/s13568-018-0608-1](https://doi.org/10.1186/s13568-018-0608-1).
- Ghorbani, A., Omran, V. O. G., Razavi, S. M., Pirdashti, H. & Ranjbar, M. 2019. *Piriformospora indica* confers salinity tolerance on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) through amelioration of nutrient accumulation, K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> homeostasis and water status. *Plant Cell Reports*, 38, 1151-1163. [10.1007/s00299-019-02434-w](https://doi.org/10.1007/s00299-019-02434-w).
- Gill, S. S., Gill, R., Trivedi, D. K., Anjum, N. A., Sharma, K. K., Ansari, M. W., Ansari, A. A., Johri, A. K., Prasad, R., Pereira, E., Varma, A., & Tuteja, N. 2016. *Piriformospora indica*: potential and significance in plant stress tolerance. *Frontiers in Microbiology*, 7, 332. [10.3389/fmicb.2016.00332](https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00332).
- Haji nia, S., Zarea, M. J., Rejali, F., & Varma, A. 2012. Yield and yield components of wheat as affected by salinity and inoculation with *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 11: 113-121. [10.1016/j.jssas.2012.02.001](https://doi.org/10.1016/j.jssas.2012.02.001).
- Hartmann A., Fischer, D., Kinzel, L., Chowdhury, S. P., Hofmann, A., Baldani, J. I., & Rothballer, M. 2019. Assessment of the structural and functional diversities of plant microbiota: Achievements and challenges - A review. *Journal of Advanced Research*, 19, 3-13. [10.1016/j.jare.2019.04.007](https://doi.org/10.1016/j.jare.2019.04.007).
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. 2022. Plant responses and tolerance to salt stress: Physiological and molecular interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 4810. [10.3390/ijms242115740](https://doi.org/10.3390/ijms242115740).
- Hill, T., & Kaefer, E. 2001. Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solution. *Fungal Genetics Reports*, 48, 20-21. [10.4148/1941-4765.1173](https://doi.org/10.4148/1941-4765.1173).
- Hnilickova, H., Kraus, K., Vachova, P., & Hnilicka, F. 2021. Salinity stress affects photosynthesis, malondialdehyde formation, and proline content in *Portulaca oleracea* L. *Plants (Basel)*, 10, 845. [10.3390/plants10050845](https://doi.org/10.3390/plants10050845).



- Hosseini, F., Mosaddeghi, M. R., & Dexter, A. R. 2017. Effect of the fungus *Piriformospora indica* on physiological characteristics and root morphology of wheat under combined drought and mechanical stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 118, 107-120. 10.1016/j.plaphy.2017.06.005
- Huang, S., Gill, S., Ramzan, M., Ahmad, M. Z., Danish, S., Huang, P., Al Obaid, S., and Alharbi, S. A. 2023. Uncovering the impact of AM fungi on wheat nutrient uptake, ion homeostasis, oxidative stress, and antioxidant defense under salinity stress. *Scientific Reports*, 13, 8249. 10.1038/s41598-023-35148-x.
- Jakhar, S., & Mukherjee, D. 2014. Chloroplast pigments, proteins, lipid peroxidation and activities of antioxidative enzymes during maturation and senescence of leaves and reproductive organs of *Cajanus cajan* L. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 20, 171-180. 10.1007/s12298-013-0219-x.
- Karimi, N., Zarea, M. J., and Mehnaz, S. 2018. Endophytic *Azospirillum* for enhancement of growth and yield of wheat. *Environmental Sustainability*, 1: 149-158. 10.1007/s42398-018-0014-2.
- Karimi, Z., Zarea, M. J., Fazeli, A., and Zarei, B. 2024. Role of sulfur in pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) gene expression, proline accumulation, and antioxidant enzyme activity of wheat under water deficit conditions. *Iran Agricultural Research*, 42: 83-98. 10.22099/iar.2023.48068.1552
- Kasim, W. A., Osman, M. E. H., Omar, M. N., & Salama, S. E. 2021. Enhancement of drought tolerance in *Triticum aestivum* L. seedlings using *Azospirillum brasilense* NO40 and *Stenotrophomonas maltophilia* B11. *Bulletin of the National Research Centre*, 45, 95. 10.1186/s42269-021-00546-6.
- Khalvandi, M., Amerian, M., Pirdashti, H., & Keramati, S. 2021. Does co-inoculation of mycorrhiza and *Piriformospora indica* fungi enhance the efficiency of chlorophyll fluorescence and essential oil composition in peppermint under irrigation with saline water from the Caspian Sea? *PLoS One*, 16: e0254076. 10.1371/journal.pone.0254076.
- Kononenko, N., Baranova, E., Dilovarova, T., Akanov, E., & Fedoreyeva, L. 2020. Oxidative damage to various root and shoot tissues of durum and soft wheat seedlings during Salinity. *Agriculture*, 10, 55. 10.3390/agriculture10030055.
- Kough, J. L., Gianinazzi-Pearson, V., & Gianinazzi, S. 1987. Depressed metabolic activity of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after fungicide application. *New Phytologist*, 106: 707-715. 10.1111/j.1469-8137.1987.tb00171.x.
- Kundu, A., & Vadassery, J. 2022. Molecular mechanisms of *Piriformospora indica* mediated growth promotion in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 17, 2096785. 10.1080/15592324.2022.2096785.
- Lichtenthaler, H. K., and Wellburn, A. R. 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, 11, 591-592. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25, 402-8. 10.1006/meth.2001.1262.
- Lutts, S., Kint, J. M., & Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oriza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78, 389-398. 10.1006/anbo.1996.0134.
- Jafarian, T., Zarea M. J., & Siosemardeh, A. 2017. Histological responses of two wheat species to *azospirillum* inoculation under dryland farming. *Journal of Plant Physiology and Breeding*, 7, 67-79.
- Ma, J., Du, G., Li, X., Zhang, C., & Guo, J. A. 2015. Major locus controlling malondialdehyde content under water stress is associated with fusarium crown rot resistance in Wheat. *Molecular Genetics and Genomics*, 290, 1955-1962. 10.1007/s00438-015-1053-3.

- Ma, Y., Dias, M. C., & Freitas, H. 2020. Drought and salinity tress responses and microbe-induced tolerance in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 591911. 10.3389/fpls.2020.591911.
- Maghsoudi, K., Emam, Y., Niazi, A., Pessarakli, M., & Arvin, M. J. 2018. P5CS expression level and proline accumulation in the sensitive and tolerant wheat cultivars under control and drought stress conditions in the presence/absence of silicon and salicylic acid. *Journal of Plant Interactions*, 13, 461-471. 10.1080/17429145.2018.1506516
- Masarmi, A. G., Solouki, M., Fakheri, B., Kalaji, H. M., Mahgdingad, N., Golkari, S., Telesiński, A., Lamlom, S. F., Kociel, H., & Yousef, A. F. 2023. Comparing the salinity tolerance of twenty different wheat genotypes on the basis of their physiological and biochemical parameters under NaCl stress. *PLoS One*, 18, e0282606. 10.1371/journal.pone.0282606.
- Mazhar, R., Ilyas, N., Saeed, M. R., Bibi, F., & Batool, N. 2016. Biocontrol and salinity tolerance potential of *Azospirillum lipoferum* and its inoculation effect in wheat crop. *International Journal of Agriculture and Biology*, 18, 494-500. 10.17957/IJAB/15.0115.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., & Swan, J. 1990. A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 115, 495-501. 10.1111/j.1469-8137.1990.tb00476.x.
- Molina, R. M., Rivera, D., Mora, V., López, G., Rosas, S. B., Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Cassan, F. D. 2018. Regulation of IAA biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. *Current Microbiology*, 75, 1408-1418. 10.1007/s00284-018-1537-6.
- Munns, R., & Gilliham, M. 2015. Salinity tolerance of crops – what is the cost? *New Phytologist*, 208, 668-673. 10.1111/nph.13519. Epub 2015 Jun 24.
- Pastuszak, J., Dziurka, M., Hornyák, M., Szczerba, A., Kopeć, P., & Płazek, A. 2022. Physiological and biochemical parameters of salinity resistance of three durum wheat genotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 8397. 10.3390/ijms23158397.
- Raffi, M. M., & Charyulu, P. B. 2021. *Azospirillum*-biofertilizer for sustainable cereal crop production: Current status. In: Viswanath B.(ed) *Recent developments in applied microbiology and biochemistry*. pp. 193-209.
- Rashid, U., Yasmin, H., Hassan, M. H., Naz, R., Nosheen, A., Sajjad, M., Ilyas, N., Keyani, R., Jabeen, Z., Mumtaz, S., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. 2021. Drought-tolerant *Bacillus megaterium* isolated from semi-arid conditions induces systemic tolerance of wheat under drought conditions. *Plant Cell Reports*, 41, 549-569. 10.1007/s00299-020-02640-x.
- Ribeiro, V. P., Gomes, E. A., de Sousa, S. M., de Paula Lana, U. J., Coelho, A. M., Marriel, I. E., & de Oliveira-Paiva, C. A. 2022. Co-inoculation with tropical strains of *Azospirillum* and *Bacillus* is more efficient than single inoculation for improving plant growth and nutrient uptake in maize. *Archives of Microbiology*, 204, 143. 10.1007/s00203-022-02759-3
- Ritchie, S. W., Nguyen, H. T., & Holaday, A. S. 1990. Leaf water content and gas-exchange parameters of two wheat genotypes differing in drought resistance. *Crop Science*, 30, 105-111. 10.2135/cropsci1990.0011183X003000010025x.
- Roy, S. J., Nagrao, S., & Tester, M. 2014. Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 115-124. doi: 10.1016/j.copbio.2013.12.004.
- Ruíz-Sánchez, M., Armada, E., Muñoz, Y., García de Salamone, I. E., Aroca, R., Ruíz-Lozano, J. M., Azcón, R. 2011. *Azospirillum* and arbuscular mycorrhizal colonization enhance rice growth and physiological traits under well-watered and drought conditions. *Journal of Plant Physiology*, 168, 1031-7. 10.1016/j.jplph.2010.12.019.
- Scharnagl, K., Sanchez, V., & von Wettberg, E. 2018. The impact of salinity on mycorrhizal colonization of a rare legume, *Galactiasmallii*, in south Florida pine rocklands. *BMC Research Notes*, 11, 2. 10.1186/s13104-017-3105-8
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pessarakli, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26. 10.1155/2012/217037.

- Stewart, R. R. C., & Bewley, J. D. 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology*, 65, 245-248. 10.1104/pp.65.2.245.
- Tavakoli, M., Poustini, K., & Alizadeh, H. 2016. Proline accumulation and related genes in wheat leaves. Under salinity stress. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 18, 707-716. 20.1001.1.16807073.2016.18.3.12.4.
- Tsai, H. J., Shao, K. H., Chan, M. T., Cheng, C. P., Yeh, K. W., Oelmüller, R., & Wang, S. J. 2020. Piriformospora indica symbiosis improves water stress tolerance of rice through regulating stomata behavior and ROS scavenging systems. *Plant Signaling and Behavior*, 15, 1722447. 10.1080/15592324.2020.1722447.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fisher, M., Heier, T., Hüchelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P., & Kogel, K. H. 2005. The endophytic fungus Piriformospora indica reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 13386-13391. 10.1073/pnas.0504423102
- Yousefi, S., Kartoolinejad, D., Bahmani, M., & Naghdi, R. 2017. Effect of Azospirillum lipoferum and Azotobacter chroococcum on germination and early growth of hopbush shrub (*Dodonaea viscosa* L.) under salinity stress. *Journal of Sustainable Forestry*, 36, 107-120. 10.1080/10549811.2016.1256220.
- Yu, Z., Zhang, Q., Yang, H., Tang, J. J., Weiner, J., & Chen, X. 2012. The effects of salt stress and arbuscular mycorrhiza on plant neighbour effects and self-thinning. *Basic and Applied Ecology*, 13, 673-680. 10.1016/j.baae.2012.09.009.
- Zarea M. J. 2017. *Azospirillum and wheat production*. Springer, Singapore.
- Zarea, M. J. 2023a. Effect of foliar application of Zinc and exogenous application of proline on yield and grain Zn and P content in a wheat durum cultivar Saji under drought stress condition. *Cereal Biotechnology and Biochemistry*, 2, 269-287. DOI: 10.22126/cbb.2024.9987.106.
- Zarea, M. J., & Karimi, N. 2023b. Zinc-Regulated P5CS and sucrose transporters SUT1B expression to enhance drought stress tolerance in wheat. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42, 5831-5841. 10.1007/s00344-023-10968-3.
- Zarea, M. J., & Karimi, N. 2023c. Grain yield and quality of wheat are improved through post-flowering foliar application of zinc and 6- benzylaminopurine under water deficit condition. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1068649. 10.3389/fpls.2022.1068649.
- Zarea, M. J., Hajinia, S., Karimi, N., Mohammadi Goltapeh, E., Rejali, F., & Varma, A. 2012. Effect of Piriformospora indica and Azospirillum strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. *Soil Biology and Biochemistry*, 45, 139-146. 10.1016/j.soilbio.2011.11.006.
- Zeeshan, M., Lu, M., Sehar, S., Holford, P., & Wu, F. 2020. Comparison of biochemical, anatomical, morphological, and physiological responses to salinity stress in Wheat and Barley genotypes deferring in salinity tolerance. *Agronomy*, 10, 127. 10.3390/agronomy10010127
- Zúñiga A, Poupin, M. J., & Donoso, R. 2013. Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of Arabidopsis thaliana by Burkholderia phytofirmans PsJN. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26, 546-553. 10.1094/MPMI-10-12-0241-R