Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Plant Production Research

Print ISSN: 2322-2050
Online ISSN: 2322-2778

In vitro characterization of the salt tolerance conferred by some plant growth promoting rhizobacteria to liquorice

Modarres Azadi[1], Setareh Amanifar[*2], Mohsen Sanikhani[3]

1. M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: modarresazadi@gmail.com
2. Corresponding Author, Dept. of Soil Science Engineering, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: amanifar@znu.ac.ir
3. Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran. E-mail: sani@znu.ac.ir

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 10.23.2022
Revised: 12.12.2022
Accepted: 01.28.2023

Keywords:
Antioxidant enzymes,
Osmolyte,
Plant growth-promoting microorganisms,
Salinity

ABSTRACT

Background and Objectives: Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) are soil bacteria that colonize the rhizosphere of plants, enhance plant growth and may alleviate environmental stress, thus constituting a powerful tool in sustainable agriculture. In the present study, we compared the effect of selected PGPR strains on growth promotion and alleviating the salinity stress in liquorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) plants.

Materials and Methods: An in vitro experiment was designed with two factors: salinity (control without salinity (NS), 60 mM (S1), 120 mM (S2) and 180 mM (S3)) and PGPR inoculation (control without inoculation, inoculated with *Pseudomonas fluorescens*, inoculated with *Pseudomonas putida* and inoculated with *Azotobacter chroococcum*). 15-day-old inoculated or non-inoculated seedlings were grown in jars containing MS plant growth medium and NaCl treatments. Plants were grown in the growth chamber for 35 days and then assessed. Fresh weight, dry weight, length of root and shoot, photosynthetic pigments, proline, malondialdehyde and some antioxidant enzymes were evaluated.

Results: Salinity decreased liquorice growth, regardless of the PGPR treatment and the salt stress level. The plants inoculated with *P. fluorescens* had significantly greater shoot biomass than the control plants at all salinity levels, whereas the *A. chroococcum* inoculation only was effective in increasing shoot biomass at the higher salinity level and *P. putida* had no significant effect on shoot growth. Root length decreased in all bacterial treatments under salinity. *P. fluorescens* treatment showed a significant and increasing effect on root length at all salinity levels. The salt tolerance index was significantly higher in PGPR-inoculated plants at 120 and 180 mM NaCl. The effect of *P. putida* was more significant in the improvement of total chlorophyll content rather than other species. Salt stress induced malondialdehyde (MDA) and proline production in both inoculated and non-inoculated plants, however inoculation with *Pseudomonas* species significantly reduced MDA content and increased proline content, especially at 60 and 120 mM NaCl treatments. Moreover, the activity of superoxide dismutase and guaiacol peroxidase raised significantly, as the salt level increased. PGPR inoculation induced a higher increase in these antioxidant enzyme activities at all salt levels. The salinity stress decreased the concentration of K and K/Na ratios. Bacterial inoculation significantly increased K concentration under severe salinity stress and promoted a higher K/Na ratio.

Conclusion: Inoculation with all PGPR species at 120 and 180 mM NaCl led to the enhancement of salinity tolerance of liquoric through increased production of proline and antioxidant enzymes and maintaining a higher K/Na ratio. Results indicate that inoculation with selected PGPR, especially *Pseudomonas* species could serve as a useful tool for alleviating salinity stress in liquorice.

Cite this article: Azadi, Modarres, Amanifar, Setareh, Sanikhani, Mohsen. 2023. *In vitro* characterization of the salt tolerance conferred by some plant growth promoting rhizobacteria to liquorice. *Journal of Plant Production Research*, 30 (2), 183-203.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20636.2973
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

شاپا چاپی: ۲۳۲۲-۲۰۵۰
شاپا آنلاین: ۲۳۲۲-۲۷۷۸

بررسی درون شیشه تحمل به شوری القا شده توسط برخی ریزوباکتری‌های محرک رشد در گیاه شیرین‌بیان

مدرس آزادی[۱]، ستاره امانی‌فر*[۲]، محسن ثانی‌خانی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان. ایران. رایانامه: modarresazadi@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: amanifar@znu.ac.ir
۳. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران. رایانامه: sani@znu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۱
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۰۹/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۰۸

واژه‌های کلیدی:
اسمولیت،
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت،
ریزجانداران محرک رشد،
شوری

چکیده

سابقه و هدف: ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) باکتری‌های خاک هستند که در ریزوسفر گیاهان حضور دارند و با سازوکارهای ویژه‌ای رشد گیاه را تقویت می‌کنند و تنش‌های محیطی را کاهش می‌دهند، بنابراین کاربرد این باکتری‌ها روشی سودمند در کشاورزی پایدار شمرده می‌شود. در این پژوهش، پتانسیل سویه‌های مختلف ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه برای تحریک رشد و تعدیل تنش شوری در گیاه شیرین‌بیان (*Glycyrrhiza glabra* L.) مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها: آزمایشی با دو عامل شامل شوری (شاهد بدون شوری (NS)، ۶۰ میلی‌مولار (S1)، ۱۲۰ میلی‌مولار (S2) و ۱۸۰ میلی‌مولار (S3) کلرید سدیم) و تلقیح ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (شاهد بدون تلقیح، تلقیح با *Pseudomonas fluorescens*، تلقیح با *Pseudomonas putida* و تلقیح با *Azotobacter chroococcum*) طراحی شد. گیاهچه‌های ۱۵ روزه تلقیح شده و یا بدون تلقیح در ظرف‌های شیشه‌ای حاوی محیط رشد گیاه MS و تیمارهای نمک NaCl کشت شدند. گیاهان در محفظه رشد به مدت ۳۵ روز رشد یافتند و سپس مورد ارزیابی قرار گرفتند. وزن تر، وزن خشک، طول ریشه و بخش هوایی، رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، مالون دی‌آلدهید و برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: شوری بدون در نظر گرفتن تیمار ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه و سطح تنش شوری باعث کاهش رشد شیرین‌بیان شد. گیاهان تلقیح شده با *P. fluorescens* به‌طور معنی‌داری زیست‌توده اندام هوایی بیش‌تری نسبت به گیاهان شاهد در تمام سطوح شوری داشتند، در حالی‌که تلقیح *A. chroococcum* تنها در افزایش زیست‌توده اندام هوایی در سطح شوری بالاتر مؤثر بود و *P. putida* تأثیر معنی‌داری بر رشد اندام هوایی نداشت. طول ریشه در

تمام تیمارهای باکتریایی تحت شوری کاهش یافت. تیمار *P. fluorescens* در تمام سطوح شوری اثر افزایشی و معنی‌داری بر طول ریشه نشان داد. شاخص تحمل به نمک در گیاهان تلقیح شده با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه در سطوح ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. اثر *P. putida* در بهبود محتوای کلروفیل کل نسبت به سایر گونه‌ها معنی‌دارتر بود. تنش شوری باعث تولید مالون دی آلدهید (MDA) و پرولین در گیاهان تلقیح‌شده و غیرتلقیح‌شده گردید، اما تلقیح با گونه‌های سودوموناس به‌طور قابل‌توجهی باعث کاهش محتوای MDA و افزایش محتوای پرولین به‌ویژه در تیمارهای ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم شد. علاوه بر این، با افزایش سطح نمک، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و گایاکول پراکسیداز به‌طور قابل‌توجهی افزایش یافت. تلقیح با هر سه گونه ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه باعث افزایش بیش‌تر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تمام سطوح نمک شد. تنش شوری باعث کاهش غلظت پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم گردید و تلقیح باکتریایی به‌طور معنی‌داری غلظت پتاسیم را تحت تنش شدید شوری افزایش داد و نسبت پتاسیم به سدیم را بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری: تلقیح با هر سه گونه ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه در سطوح ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم منجر به بهبود شاخص تحمل به تنش شوری شیرین‌بیان از طریق افزایش تولید پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و حفظ نسبت بالاتر پتاسیم به سدیم گردید. نتایج نشان می‌دهد که تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه منتخب به‌ویژه گونه‌های سودوموناس می‌تواند به‌عنوان ابزار مفیدی برای کاهش تنش شوری در شیرین‌بیان مدنظر قرار گیرد.

استناد: آزادی، مدرس، امانی‌فر، ستاره، ثانی‌خانی، محسن (۱۴۰۲). بررسی درون شیشه تحمل به شوری القا شده توسط برخی ریزوباکتری‌های محرک رشد در گیاه شیرین‌بیان. *نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی*، ۳۰ (۲)، ۲۰۳-۱۸۳.
DOI: 10.22069/JOPP.2023.20636.2973

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

در میان تنش‌های زیست‌محیطی، شوری خاک یک مشکل اساسی است تا آن‌جا که به گفته سازمان غذا و کشاورزی (FAO)، میزان تلفات زمین به علت شوری به ۵۰ درصد کل خاک‌های قابل کشت در سال ۲۰۵۰ خواهد رسید (۱ و ۲). خاک‌های متأثر از نمک از رشد گیاهان ممانعت کرده و منجر به کاهش بهره‌وری کشاورزی و بازده اقتصادی، عدم تعادل محیط‌زیست و فرسایش خاک می‌شوند. تنش شوری باعث انباشت یون سدیم و عدم تعادل غذایی در گیاه، از دست دادن محتوای آب و درنهایت توقف رشد و کاهش عملکرد می‌شود (۳). افزایش شوری خاک همچنین موجب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن می‌شود که باعث تخریب غشاء، پراکسیداسیون لیپیدها و سایر اختلالات فیزیولوژیک و تغییرات زیست شیمیایی دیگر در گیاهان شده و مرگ سلولی را رقم می‌زند (۴).

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[1]) برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ به گروهی از باکتری‌های سودمند گفته شد که با بهبود تغذیه، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، انحلال فسفات‌ها، تثبیت نیتروژن و تولید سیدورفور باعث تحریک رشد گیاه می‌شوند (۵). در طبیعت، ریزوباکتری‌ها نقش اساسی در سازگاری گیاهان با محیط را بازی می‌کنند و تعامل بین گیاهان و ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه تأثیر عمیقی بر رشد، توسعه و سلامت گیاهان دارند. ریزوباکتری‌های محرک رشد در ریزوسفر گیاهان استقرار می‌یابند و رشد آن‌ها را افزایش می‌دهند و یک ابزار قدرتمند در کشاورزی ارگانیک و بازسازی زمین‌های تخریب شده هستند (۶). این ریزجانداران می‌توانند سنتز متابولیت‌هایی را در گیاهان تحریک کنند که پس از قرار گرفتن آن‌ها در معرض تنش به‌طور کاراتری قادر به مواجهه با تنش باشند (۷). استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه مانند آزوسپریلیوم، آگروباکتریوم، سودوموناس‌ها و برخی گونه‌های باسیلوس، رویکردی سازگار با محیط‌زیست و اقتصادی برای احیای زمین‌های تحت‌تأثیر شوری و افزایش تولید زیست‌توده است (۸).

ریزوباکتری‌های محرک رشد تحمل گیاه نسبت به تنش‌های زیست محیطی مانند شوری را بهبود می‌بخشند. نقش ریزوباکتری‌های محرک رشد در کاهش تنش‌ها با پاکروبی رادیکال‌های آزاد تولید شده طی متابولیسم گیاه و افزایش تولید آنتی‌اکسیدان‌ها و آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو و به‌حداقل رساندن آسیب‌های ناشی از تنش در گیاهان گزارش شده است (۸ و ۹). هم‌چنین ریزوباکتری‌های محرک رشد با افزایش قابلیت جذب عناصر معدنی ضروری و انباشته شدن اسمولیت‌ها به کاهش تنش شوری در گیاهان کمک می‌کنند. کاهش علائم تنش شوری در گیاهان تلقیح شده با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای متصل‌شونده به Na^+، کاهش سطح اتیلن از طریق تولید آنزیم ACC-دآمیناز[2] و سنتز هورمون‌های گیاهی توسط این ریزجانداران نیز گزارش شده است (۱۰). مطالعات متعدد نشان داده است که استفاده از سویه‌های ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند باعث کاهش تنش شوری در گیاهان شود. پژوهش‌گران افزایش تولید پرولین و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی القا شده توسط گونه‌های باسیلوس را در حفظ رشد و توسعه *Capsicum annuum* L. تحت تنش شوری بسیار مهم دانسته‌اند (۱۱). هم‌چنین تلقیح سویا با سویه‌های سودوموناس ضمن بهبود رشد گیاه منجر به

1- Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)

2- 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase

افزایش فعالیت آنزیم‌های تنشی و پرولین در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح باکتریایی گردید (۱۲). پژوهش‌گران طی مطالعه‌ای نشان دادند که تلقیح برنج با گونه‌های سودوموناس و باسیلوس سبب کاهش سمیت ROS، افزایش پایداری غشاء سلولی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده گردید و باعث ایجاد مقاومت گیاه در برابر شوری شد (۱۳).

در شرایط کنترل شده مانند کشت درون‌شیشه‌ای می‌توان به طور دقیق و سریع روابط گیاه–ریزجانداران و سازوکار القای مقاومت توسط ارگانیسم‌های مفید از جمله باکتری‌های محرک رشد را در مقابل تنش‌های مختلف مانند شوری مورد مطالعه قرار داد. هدف از مطالعه حاضر، بررسی نقش احتمالی جدایه‌های باکتریایی در القای مقاومت به تنش شوری در گیاهان شیرین‌بیان بود. بدین‌منظور رشد، فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت و تجمع پرولین و مالون دی‌آلدهید به عنوان شاخص از پراکسیداسیون غشا و جذب سدیم و پتاسیم مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه سعی شده فرضیه اثر ریزجانداران محرک رشد بر افزایش مقاومت گیاه شیرین‌بیان تحت تنش شوری بررسی شود و امکان بهره‌برداری از این ریزجانداران به عنوان راهکاری برای کاهش تنش شوری در گیاه شیرین‌بیان به عنوان یک محصول با ارزش اقتصادی ارزیابی گردد.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی اثر ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه در شرایط شور و غیرشور آزمایشی فاکتوریل با دو فاکتور شامل (۱) گیاهان تلقیح‌شده با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه و یا تلقیح نشده، (۲) بدون تیمار شوری و تیمار شده با سطوح ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار نمک NaCl در سال ۱۳۹۶ درآزمایشگاه کشت بافت گروه علوم باغبانی دانشگاه زنجان اجرا شد. با توجه به پوشش سخت بذر گیاه شیرین‌بیان خراش‌دهی بذر توصیه شده است (۱۴). در یک آزمایش مقدماتی مدت زمان تیمار اسید سولفوریک و شرایط ضدعفونی بذر از نظر غلظت هیپوکلریت سدیم بهینه‌سازی شد. بر این اساس بذرها تحت تیمار اسید سولفوریک غلیظ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. هم‌چنین ضدعفونی سطحی بذرها با استفاده از اتانول ۷۰ درصد به‌مدت ۲ دقیقه انجام گردید و سپس بذرها به مدت ۱۲ دقیقه در محلول حاوی هیپوکلریت سدیم ۵ درصد قرار گرفتند و پس از آن به دفعات با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرها در ظرف‌های شیشه‌ای با حجم ۳۵۰ میلی‌لیتر که محیط رشد گیاه MS (۱۵) به‌علاوه ۰/۷۵ درصد (w/v) آگار و ۳ درصد ساکاروز به میزان یک‌چهارم آن‌ها پر شده بودند به‌مدت ۱۵ روز پرورش یافتند. برای کشت استریل نمونه‌های گیاهی و واکشت کردن آن‌ها از دستگاه لامینار ایرفلو (Beast bsc 126– هند) مخصوص کشت بافت استفاده گردید. ظروف کشت مانند پتری‌دیش‌ها و ظرف‌های شیشه‌ای خالی همراه با محیط‌های کشت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو (حرارت مرطوب تحت فشار) (Zirbus، LTA 400، آلمان) گردیدند. برای استریل کردن وسایلی مانند اسکالپل، پنس و غیره از حرارت خشک آون با دمای ۲۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ تا ۳ ساعت استفاده شد. دو هفته بعد از کشت اولیه گیاهچه‌ها در ظرف‌های شیشه‌ای اصلی حاوی تیمارهای نمک NaCl واکشت شدند. هنگام واکشت با افزودن سوسپانسیون حاوی ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه مربوطه به ریشه‌چه‌ها، تلقیح باکتریایی گیاه صورت گرفت.

گونه‌های ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه شامل *Pseudomonas fluorescens*، *Pseudomonas putida*، *Azotobacter chroococcum* از بانک میکروبی مؤسسه تحقیقات خاک و آب ایران تهیه و

استفاده شدند. برای تلقیح باکتریایی روش تلقیح ریشه‌چه‌ها قبل از انتقال به ظروف شیشه‌ای کشت اصلی استفاده شد. سوسپانسیون‌های باکتریایی با غلظت 10^{7} سلول در میلی‌لیتر سوسپانسیون تهیه شد و گیاهچه‌های ریشه‌دار با مقدار ۲۵۰ میکرولیتر کشت باکتریایی تلقیح شدند (۷). سطوح شوری در محیط کشت درون شیشه شامل شاهد بدون تیمار شوری (NS)، ۶۰ (S1)، ۱۲۰ (S2) و ۱۸۰ (S3) میلی‌مولار نمک NaCl در محیط کشت ایجاد شد. گیاهان در یک محفظه رشد تحت دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس تحت نور فلورسنت سفید با شدت نوری ۸۰ $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ با تناوب ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی به مدت ۳۵ روز رشد یافتند. ۳۵ روز پس از تلقیح باکتریایی، گیاهان پرورش یافته در محیط کشت تحت تیمارهای مختلف شوری و تلقیح با باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱).

شکل ۱- گیاهچه‌ها شیرین‌بیان رشد یافته در شرایط درون شیشه تحت سطوح مختلف شوری و تلقیح باکتریایی.
NS، S1، S2 و S3 به‌ترتیب عبارتند از تیمار بدون شوری و شوری ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم.

Fig. 1. Liquorice seedlings grown in vitro under different salinity levels and bacterial inoculation. NS, S1, S2, and S3 are non-saline, 60, 120, and 180 mM NaCl, respectively.

وزن تر، وزن خشک، طول ریشه و بخش هوایی، تعداد برگ، رنگیزه‌های فتوسنتزی، پرولین، مالون دی‌آلدهید و برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی پس از برداشت با سه تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌ها با استفاده از روش لیشتنتالر و بوشمن (۲۰۰۱) انجام شد (۱۶). بدین‌منظور ۰/۲ گرم بافت تر برگ در ۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد سائیده شد و محلول حاصل با کاغذ صافی، صاف گردید و حجم نهایی با استفاده از استن ۸۰ درصد به ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب محلول‌ها به‌طور جداگانه در طول موج‌های ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل *a* و ۶۴۷ نانومتر برای کلروفیل *b* توسط اسپکتروفتومتر (PG T60، انگلستان) قرائت شد و با استفاده از رابطه‌های زیر محتوای کلروفیل *a* (رابطه ۱)، کلروفیل *b* (رابطه ۲) و مجموع کلروفیل *a* و *b* (رابطه ۳) محاسبه شد.

$$\text{Chl } a\ (\mu g\ mL^{-1}) = (12.25\ A_{663} - 2.79\ A_{647}) \quad (۱)$$

$$\text{Chl } b\ (\mu g\ mL^{-1}) = (21.50\ A_{647} - 5.10\ A_{663}) \quad (۲)$$

$$\text{Chl } a{+}b\ (\mu g\ mL^{-1}) = \text{Chl a} + \text{Chl b} \quad (۳)$$

سنجش مقدار پرولین با استفاده از معرف نین‌هیدرین و بر اساس روش بیتس و همکاران (۱۹۷۳) انجام گرفت (۱۷) و مقدار پرولین هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد پرولین، بر حسب میکرومول پرولین بر گرم وزن تر محاسبه و ارائه شد. هم‌چنین مقدار مالون دی‌آلدهید (MDA) به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها براساس واکنش تیتوباربیتوریک اسید (TBA) تعیین شد (۱۸). برای عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی جهت استخراج آنزیم‌های مورد بررسی از بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷ حاوی ۰/۲ درصد پلی‌وینیل‌پیرولیدین (PVP) و ۰/۱ میلی‌مولار اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) در دمای ۴ درجه سلسیوس استفاده شد (۱۹). نمونه‌ها پس از همگن شدن سانتریفیوژ شدند و بعد از اتمام سانتریفیوژ، عصاره رویی جدا و از آن برای سنجش فعالیت آنزیم‌های مورد نظر استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت پراکسیداز (گایاکول پراکسیداز) به روش اسپکتروفتومتری با استفاده از گایاکول به عنوان بستردهنده الکترون انجام شد و افزایش جذب در نتیجه تشکیل تتراگایاکول مورد سنجش قرار گرفت. یک واحد پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیمی که باعث تشکیل ۱ میکرومول تتراگوایاکول در دقیقه می‌شود، تعریف شد (۲۰). فعالیت آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) نیز به‌صورت فتوشیمیایی براساس بازدارندگی آنزیم SOD از احیا نوری نیترو بلوتترازولیوم کلراید (NBT) اندازه‌گیری شد و میزان آنزیمی که باعث ممانعت ۵۰ درصدی از احیا NBT به فورمازان تحت شرایط آزمایش گردید، به‌عنوان یک واحد فعالیت آنزیم SOD درنظر گرفته شد (۲۱). برای تعیین شاخص تحمل به شوری از رابطه ۴ استفاده شد (۲۲):

$$\text{Salt Tolerance Index (STI)} = \text{DWS or DWH/DWC} \quad (۴)$$

که در آن، DWS وزن خشک گیاهان تحت شوری، DWH وزن خشک گیاهان تحت تنش و تلقیح‌شده با باکتری‌های محرک رشد، DWC وزن خشک گیاهان بدون تلقیح در شرایط بدون تنش شوری (شاهد).

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 تجزیه گردیدند. برای انجام تحلیل آماری در ابتدا با آزمون کولموگروف اسمیرنوف و آزمون لون به ترتیب نرمال بودن و همگن بودن واریانس داده‌ها بررسی شد و در صورت لزوم از تبدیل داده‌ها استفاده شد. تجزیه واریانس با استفاده از آزمون F و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

در میان تیمارهای دارای تلقیح باکتری، بیش‌ترین وزن خشک بخش هوایی با میانگین ۰/۲۵۷ گرم در تیمار باکتری *P. fluorescens* و در تیمار شاهد بدون شوری مشاهده شد که نسبت به تیمار شاهد بدون تلقیح تفاوت معنی‌داری داشت. تلقیح با باکتری *P. fluorescens* در سطوح ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم اثر معنی‌داری بر افزایش وزن خشک بخش هوایی در مقایسه با شاهد بدون تلقیح نشان داد. تلقیح با باکتری *A. Chroococcum* به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش وزن خشک بخش هوایی در سطوح شاهد بدون شوری و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در مقایسه با شاهد بدون تلقیح گردید (جدول ۱). هم‌چنین باکتری *P. fluorescens* اثر مثبت معنی‌داری بر طول بخش هوایی در سطوح شاهد بدون شوری، ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم نشان داد. باکتری *P. putida* در تمام سطوح شوری طول بخش هوایی را در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش داد ولی این افزایش در گیاهان تلقیح‌شده با *A. Chroococcum* در سطوح ۱۲۰ و ۱۸۰

میلی‌مولار کلرید سدیم معنی‌دار بود (جدول ۱). اثرهای اصلی و متقابل تیمارهای آزمایشی بر وزن خشک ریشه معنی‌دار نبود. وزن خشک کل گیاه در سطح بدون شوری در تیمارهای دارای تلقیح ریزوباکتری‌های محرک رشد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گیاهان بدون تلقیح بود. تحت تیمار ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم هر دو گونه سودوموناس منجر به افزایش معنی‌دار وزن خشک کل گردیدند. تحت تیمار ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم اثر تلقیح با هر سه گونه ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه بر وزن خشک کل گیاه افزایشی بود ولی افزایش مشاهده شده در گیاهان تلقیح شده با *P. putida* از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۱). اثرات نامطلوب تنش شوری به‌طور عمده ناشی از کاهش محتوای آب در گیاه، عدم تعادل تغذیه‌ای، سمیت یون‌های سمی مانند کلر و سدیم و تولید انواع گونه‌های اکسیژن فعال است. در این مطالعه تنش شوری موجب کاهش در صفات مربوط به رشد از جمله وزن خشک و ارتفاع بخش هوایی و طول ریشه گردید. مطالعات پژوهش‌گران نشان داده است که ریزوباکتری‌ها در محصولات مختلف تقویت‌کننده‌های بالقوه رشد هستند (۲۳ و ۲۴). نتایج حاصل از تلقیح گیاهچه‌های شیرین‌بیان با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه تأثیر معنی‌داری بر تمامی صفات ریخت‌شناسی مورد مطالعه نشان داد. هم‌چنین، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه بسته به نوع جدایه و سطح شوری به‌طور متفاوتی ویژگی‌های رشد گیاه را تحت‌تأثیر قرار داد و *P. fluorescens* اثرات نامطلوب تنش شوری بر زیست‌توده بخش هوایی گیاه را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. هم‌چنین تلقیح با هر سه جدایه در سطح شوری ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم منجر به افزایش وزن خشک کل گیاه گردید. در پژوهش حاضر تلقیح با گونه‌های محرک رشد گیاه به‌ویژه گونه‌های سودوموناس در سطوح ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم منجر به افزایش تولید پرولین (شکل ۲-A) و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت (شکل ۳) و حفظ نسبت بالاتر K/Na گردید (شکل ۵) که می‌تواند موجب بهبود تحمل به تنش شوری شیرین‌بیان و حفظ ویژگی‌های رشدی بهتر در مقایسه با تیمارهای بدون تلقیح باکتریایی گردد. از دیگر دلایل بهبود رشد گیاه در تیمارهای تلقیح شده با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه می‌تواند تولید IAA[1] که باعث افزایش طول و تکثیر سلول‌های گیاهی می‌شوند باشد. به‌طورکلی صفات باکتریایی مانند تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات، تولید IAA و سیدروفور با افزایش دسترسی به مواد مغذی و با تأثیرگذاری بر رشد گیاه، تأثیر مثبت بر رشد گیاه نشان داده‌اند. هم‌چنین القای تجمع اسمولیت‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها در بافت‌های گیاه و تنظیم ژن‌های واکنش‌دهنده به تنش و تغییر در ریخت‌شناسی ریشه می‌تواند باعث کاهش مهار رشد گیاه تحت تنش شوری گردد (۲۵). بنابراین، ارتقاء رشد توسط جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش ممکن است مرتبط با این صفات باکتریایی نیز باشد.

تلقیح باکتریایی و برهمکنش آن با شوری اثر معنی‌داری بر طول ریشه نشان داد (جدول ۱). طول ریشه در تمام تیمارهای باکتریایی تحت شوری کاهش یافت. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود باکتری *P. fluorescens* در تمام سطوح شوری اثر افزایشی و معنی‌داری بر طول ریشه نشان داد. تلقیح با باکتری *A. Chroococcum* نیز در تیمارهای ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم سبب افزایش معنی‌دار طول ریشه گردید. هم‌چنین گیاهان تلقیح شده با *P. putida* در سطح بالای تنش (۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) طول ریشه بالاتری نسبت به شاهد بدون تلقیح نشان دادند ($P\leq ۰/۰۵$) (جدول ۱). می‌توان گفت که ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه با

1- Indole-3-acetic acid

تولید انواع متابولیت‌های میکروبی مانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین، ریخت‌شناسی و فیزیولوژی ریشه را تغییر می‌دهند و با کمک به رشد و نمو ریشه و به‌خصوص ریشه‌های مویین منجر به جذب آب و عناصر غذایی بیش‌تر در شرایط تنش می‌شوند. هم‌چنین بسیاری از ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه با تولید ۱- آمینوسیکلوپروپان ۱- کربوکسیلیک اسید (ACC) دآمیناز، متابولیسم ACC، پیشساز اتیلن گیاهی را کاهش داده در نتیجه باعث کاهش مهار رشد ریشه توسط اتیلن ناشی از تنش می‌شوند (۲۶). بیش‌تر باکتری‌های محرک رشد IAA سنتز می‌کنند که باعث افزایش طول ریشه و در سطوح بالای IAA، باعث ایجاد ریشه‌های جانبی می‌شود (۲۷). پژوهش‌گران کاهش آثار منفی تنش شوری و افزایش طول بخش هوایی و ریشه را در گیاه نخودفرنگی تلقیح شده با سودوموناس و باسیلوس گزارش کرده‌اند که همسو با نتایج مطالعه حاضر است (۲۷).

جدول ۱- اثر سطوح شوری و تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه بر وزن خشک (DW)، شاخص تحمل به شوری (STI)، ارتفاع بخش هوایی، طول ریشه و محتوای کلروفیل *a* + *b* گیاه شیرین‌بیان.

Table 1. Effect of PGPR inoculation and salinity levels on dry weights (DW), salt tolerance index (STI), root and shoot height and chlorophyll *a* + *b* content of liquorice.

PGPR status	Salinity	Shoot DW (g)	Root DW (g)	Total DW (g)	STI (%)	Shoot height (cm)	Root length (cm)	Chlorophyll *a* + *b* (mg g^{-1} FW)
تلقیح PGPR	شوری	وزن خشک بخش هوایی	وزن خشک ریشه	وزن خشک کل	شاخص تحمل به شوری	ارتفاع بخش هوایی	طول ریشه	کلروفیل *a* + *b*
Control	NS	0.197 BCDE	0.061 AB	0.257 BCD	-	15.23 BCD	20.13 BC	1.62 C
	S1	0.177 CDEFG	0.060 AB	0.236 CDE	90.09 ABC	11.77 FG	13.40 G	1.41 F
	S2	0.110 HI	0.053 AB	0.163 GH	56.66 EF	11.17 G	13.80 FG	1.54 EF
	S3	0.090 I	0.051 B	0.141 H	46.86 F	11.70 FG	11.70 H	1.14 H
P. fluorescens	NS	0.257 A	0.067 AB	0.323 A	-	16.40 A	22.17 A	1.71 C
	S1	0.207 BC	0.060 AB	0.267 BC	104.99 AB	14.17 BCD	20.73 AB	1.57 DE
	S2	0.160 DEFG	0.063 AB	0.223 CDEF	85.08 ABC	14.57 CDE	19.90 BC	1.36 G
	S3	0.147 FGH	0.067 AB	0.213 DEF	79.93 CD	12.83 EFG	17.47 DE	1.03 H
P. putida	NS	0.233 AB	0.067 AB	0.300 AB	-	17.77 A	17.13 DE	2.31 A
	S1	0.200 BCD	0.070 AB	0.270 BC	106.92 A	15.27 BCD	17.53 DE	1.97 B
	S2	0.153 EFGH	0.065 AB	0.218 DEF	82.57 BCD	16.17 ABC	15.20 F	1.68 C
	S3	0.123 GHI	0.061 AB	0.184 FGH	66.15 DE	15.13 BCD	14.07 FG	1.75 C
A. Chroococcum	NS	0.250 A	0.073 A	0.324 A	-	16.97 A	17.67 DE	1.62 CDE
	S1	0.180 CDEF	0.059 AB	0.237 CDE	91.28 ABC	13.10 EF	18.70 CD	1.37 FG
	S2	0.150 FGH	0.055 AB	0.205 EFG	76.18 CD	13.90 DE	17.90 DE	1.10 H
	S3	0.145 FGH	0.056 AB	0.200 EFG	74.05 CD	14.10 DE	16.77 E	1.27 G
					Significance			
PGPR		***	ns	***	***	***	***	***
Salinity		***	ns	***	***	***	***	***
PGPR×Salinity		ns	ns	ns	ns	ns	***	***
CV (%)		11.56	14.53	12.73	13.88	6.44	5.40	4.64

حروف لاتین غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، ۰/۰۵ > P). NS، S1 ، S2 و S3 به‌ترتیب عبارتند از تیمار بدون شوری و شوری ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی مولار کلرید سدیم. – نشان‌دهنده عدم آزمون آماری است. ^{ns}، *** و * به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ می‌باشد

Values labeled with the different letters are significantly different (P<0.05) according to the Duncan test. NS, S1, S2, and S3 are non-saline, 60, 120, and 180 mM NaCl, respectively. – is not tested. ^{ns} non-significant. *** P<0.001. * P<0.05

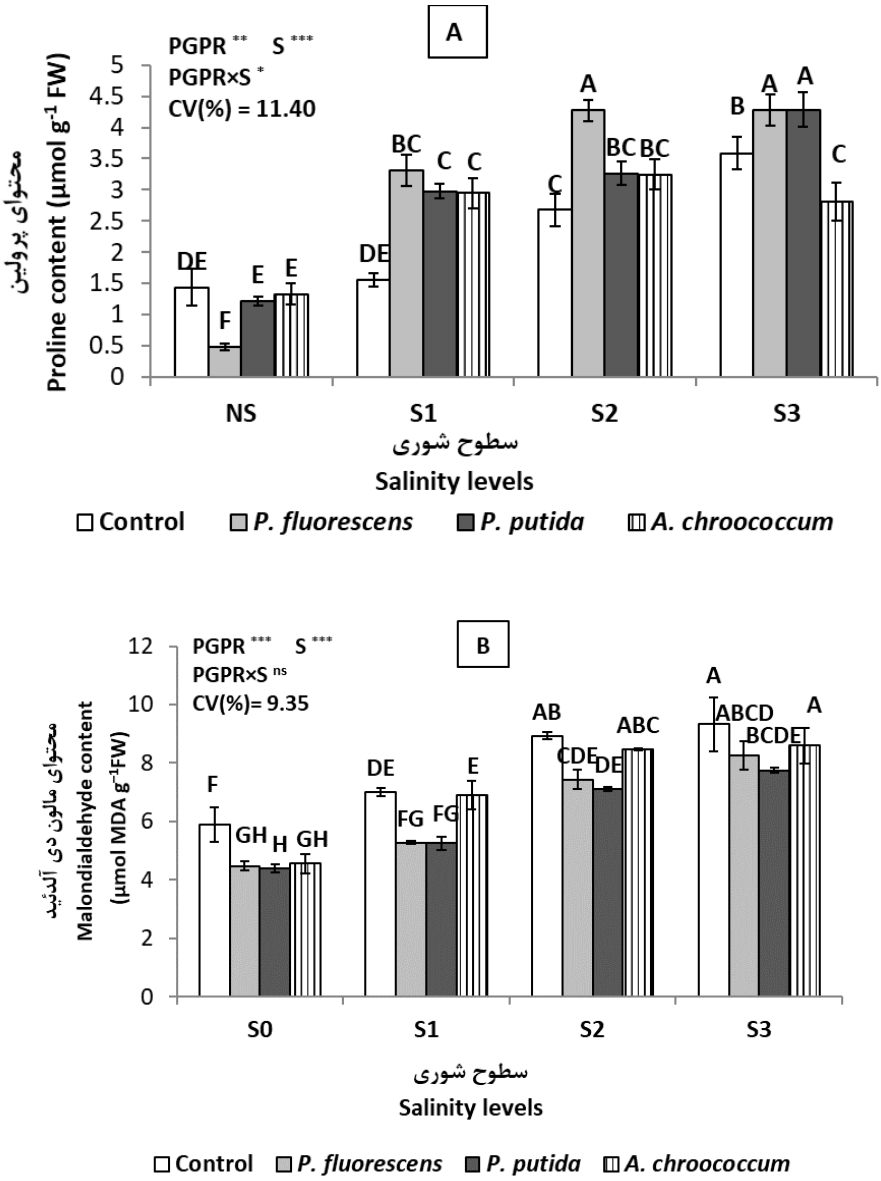
نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر اصلی شوری و باکتری‌های محرک رشد و برهمکنش آن‌ها بر محتوای کلروفیل $a + b$ گیاه معنی‌دار بود ($P\leq ۰/۰۰۱$) (جدول ۱). با افزایش سطح شوری محتوای کلروفیل $a + b$ کاهش یافت و کاربرد *P. putida* در تمام سطوح شوری اثر افزایشی و معنی‌داری بر این پارامتر نشان داد. تلقیح با باکتری *A. Chroococcum* در تیمار ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم سبب افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل $a + b$ گردید، درحالی‌که گیاهان تلقیح‌شده با *P. fluorescens* در سطح ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم محتوای کلروفیل $a + b$ بالاتری نسبت به شاهد بدون تلقیح نشان دادند ($P\leq ۰/۰۵$) (جدول ۱). همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است. شاخص تحمل گیاه به شوری در گیاهان تلقیح شده با باکتری در مقایسه با شاهد بدون تلقیح در سطوح ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌طور معنی‌داری بالاتر است ولی در سطح شوری ۶۰ میلی‌مولار کلرید سدیم تفاوتی میان تیمارهای با یا بدون تلقیح باکتری مشاهده نشد. تنش شوری از نظر فیزیولوژیکی روی سلول‌های گیاهی تأثیر می‌گذارد و در اثر فشار اسمزی، سلول‌ها کم آب می‌شوند که منجر به بسته شدن روزنه‌ها، کاهش رشد سلولی و کاهش محتوای کلروفیل در گیاهان می‌شود. هم‌چنین مطالعات اولیه نشان داده است که سنتز و فعالیت رنگدانه‌های فتوسنتزی در شرایط غلظت بالای سدیم به‌طور منفی تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد (۲۵). اثر مثبت باکتری‌های ریزوسفری بر محتوای کلروفیل و توانایی فتوسنتزی گیاه میزبان در شرایط تنش شوری در گیاه ذرت (۲۵)، لوبیا (۲۸) و برنج (۲۹) گزارش شده است. به‌نظر می‌رسد که باکتری‌های محرک رشد با تولید فیتوهورمون به رشد ریشه گیاهان کمک می‌کنند تا آب و مواد مغذی بیش‌تری برای قسمت‌های رویشی فراهم کنند و در نتیجه میزان تولید رنگدانه را افزایش داده و انتقال مواد فتوسنتزی در گیاه را تسهیل می‌کنند. هم‌چنین تیمار باکتری‌های محرک رشد ممکن است منجر به سنتز پروتئین‌ها و آنزیم‌های مرتبط با ثبات رنگدانه شود (۲۶).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که شوری سبب افزایش معنی‌دار پرولین بخش هوایی گیاهان گردید (شکل ۲-A). کاربرد هر سه گونه ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه در سطح ۶۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌طور معنی‌داری سبب افزایش پرولین شد. گونه *P. fluorescens* در سطوح ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم منجر به افزایش معنی‌دار محتوای پرولین در مقایسه با شاهد بدون باکتری شد (شکل ۲-A). تجمع پرولین مکانیسم مقاومت در برابر تنش شوری با تنظیم فشار اسمزی داخل سلولی است و یکی از ویژگی‌های رایج در بسیاری از گیاهان در شرایط شور است. پرولین یک ایمینو اسید محلول در آب است که به‌عنوان یک ترکیب سازگارکننده[1] طبقه‌بندی می‌شود، یعنی در غلظت‌های بالا به ساختارهای سلولی آسیب نمی‌رساند، اما پتانسیل اسمزی سلول را کاهش می‌دهد (۳۰). سطح بالای پرولین گیاهان را قادر می‌سازد تا هنگام رشد در پتانسیل‌های آبی کم، تعادل اسمزی را حفظ کنند (۳۱). برخی پژوهش‌گران نشان داده‌اند که پرولین در از بین بردن رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق چرخه پرولین-پرولین بدون مصرف پرولین کمک می‌کند (۳۲). هم‌چنین پرولین تجمع نیتروژن قابل استفاده را تنظیم می‌کند و از نظر اسمزی بسیار فعال است در

1- Compatible compound

نتیجه به پایداری غشاء کمک می‌کند و اثر کلرید سدیم بر اختلال در عملکرد غشای سلولی را کاهش می‌دهد (۳۳). مطالعه حاضر افزایش تجمع پرولین را در شرایط تنش شوری نشان می‌دهد و گیاهانی که با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه تلقیح‌شده بودند در مقایسه با شاهد تلقیح‌نشده تجمع بالاتری را نشان دادند؛ بنابراین می‌توان گفت که تجمع پرولین باعث تحمل نمک در گیاه شیرین‌بیان می‌شود. گزارش شده است که تلقیح سویه‌های باکتریایی ریزوبیوم و سودوموناس در غلظت‌های مختلف شوری به گیاه ذرت باعث افزایش درصد پرولین همراه با مقدار نسبی آب شد (۳۴).

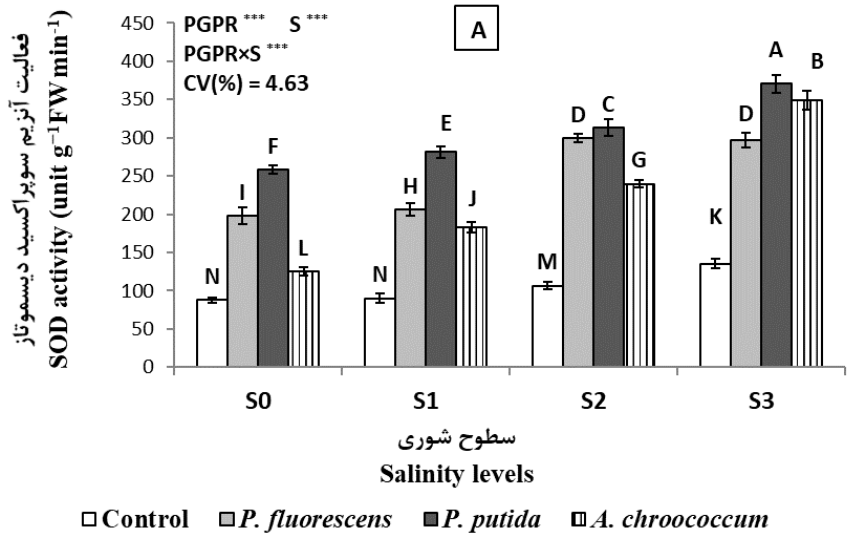
اثر اصلی شوری و باکتری‌های محرک رشد بر غلظت MDA معنی‌دار بود ولی اثر متقابل این دو عامل اثر معنی‌داری بر محتوای مالون‌دی‌آلدهید نشان نداد (شکل ۲-B). با افزایش سطح شوری MDA در گیاه افزایش یافت و تلقیح شیرین‌بیان با باکتری‌های محرک رشد به‌ویژه گونه‌های سودوموناس در سطح ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم تولید MDA را کاهش داد که بیانگر تأثیر مثبت تلقیح با باکتری در گیاه شیرین‌بیان بود (شکل ۲-B). هم‌چنین در سطح ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم فقط تلقیح با *P. putida* موجب کاهش معنی‌دار محتوای MDA گردید (شکل ۲-B). مالون‌دی‌آلدهید حاصل تجزیه اسیدهای چرب غیراشباع است که به‌عنوان شاخص زیستی پراکسیداسیون لیپیدها زمانی که در معرض ROS قرار گرفته‌اند، شناخته می‌شود و آسیب بیش‌تر غشا باعث تولید بیش‌تر مولکول‌های MDA می‌شود. کاهش سطح MDA در گیاهان تلقیح‌شده با افزایش تحمل به تنش در گیاهان با کاهش پراکسیداسیون لیپیدی مرتبط است (۳۵). در این پژوهش تولید کم‌تر MDA در گیاه تلقیح‌شده با باکتری در مقایسه با گیاه بدون باکتری تحت تنش شوری مشاهده شد. پژوهش‌گران نتایج مشابهی را در گندم (۳۶) و بادام‌زمینی (۳۷) تلقیح‌شده با باکتری‌های محرک رشد تحت شرایط تنش گزارش کرده‌اند.

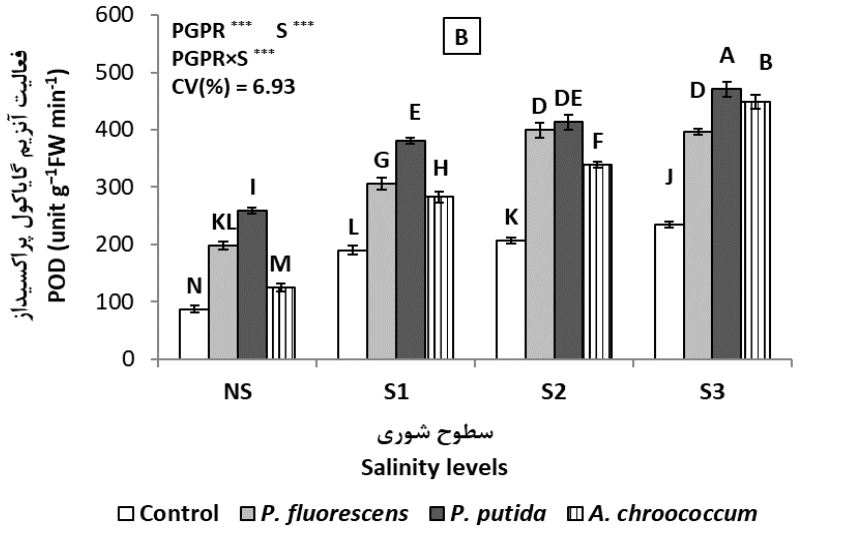


شکل ۲- اثر سطوح شوری و باکتری‌های محرک رشد بر محتوای پرولین (**A**) و مالون دی آلدهید (**B**) گیاه شیرین‌بیان. NS، S1، S2 و S3 به‌ترتیب عبارتند از تیمار بدون شوری و شوری ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشند. حروف لاتین غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، $P < ۰/۰۵$).

Fig. 2. Effect of PGPR inoculation and salinity levels on proline (A) and malondialdehyde (B) content of liquorice. NS, S1, S2, and S3 are non-saline, 60, 120, and 180 mM NaCl, respectively. The error bars represent the standard error (SE). Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که شوری سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاهان بدون تلقیح و تلقیح‌شده با باکتری گردید (شکل ۳-A). همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود باکتری‌های محرک رشد در تمام سطوح شوری اثر افزایشی و معنی‌داری بر این پارامتر نشان دادند. در شرایط تنش‌های محیطی برای کاهش ROS تولید شده در کلروپلاست و میتوکندری سنتز آنزیم‌هایی مانند سوپر اکسید دیسموتاز افزایش می‌یابد. افزایش سطح فنل‌ها و سایر آنزیم‌های دفاعی، اجزای اصلی مقاومت به نمک و خشکی در گیاهان است (۳۸). نتایج مطالعه حاضر نیز بیانگر آن است که تلقیح گیاه با گونه‌های سودوموناس به‌طور معنی‌داری فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز را در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح و تلقیح‌شده با ازتوباکتر افزایش دادند. هم‌چنین نتایج مقایسه میانگین نشان داد که شوری سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم گایاکول پروکسیداز در گیاهان بدون تلقیح و تلقیح‌شده با باکتری گردید (شکل ۳-B). تحت تمام سطوح شوری تیمارهای باکتری به‌کار رفته سبب افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم گایاکول پروکسیداز در گیاه شیرین‌بیان شدند و در میان آن‌ها باکتری *P. putida* بیش‌ترین اثر را در افزایش میزان تولید آنزیم گایاکول پروکسیداز از خود نشان داد (شکل ۳-B). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در واکنش بافت‌های گیاهی نسبت به پیری و تنش نقش دارند. فعالیت این آنزیم‌ها برای جلوگیری از صدمات وارده از طریق گونه‌های فعال اکسیژن ضروری می‌باشد. افزایش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز در *Catharanthus roseus* تلقیح‌شده با باکتری محرک رشد *Achromobacter xylosoxidans* (۳۹) و *Solanum melongena* تلقیح‌شده با سودوموناس (۴۰) در شرایط تنش شوری گزارش شده است که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد. هم‌چنین گزارش‌هایی که نشان‌دهنده افزایش فعالیت آنزیم پروکسیداز در کاهوی تلقیح‌شده با سودوموناس (۳۱) و ذرت تلقیح‌شده با سودوموناس (۴۱) هستند وجود دارد. برخی پژوهش‌گران بیان نموده‌اند که پاسخ آنتی‌اکسیدانی گیاه به تلقیح باکتریایی با افزایش تولید زیست‌توده گیاهی مرتبط می‌باشد و نشان می‌دهد که این فعالیت‌ها به کاهش آسیب اکسیداتیو مولکول‌های زیستی در سلول‌های گیاهی کمک می‌کند (۴۲).

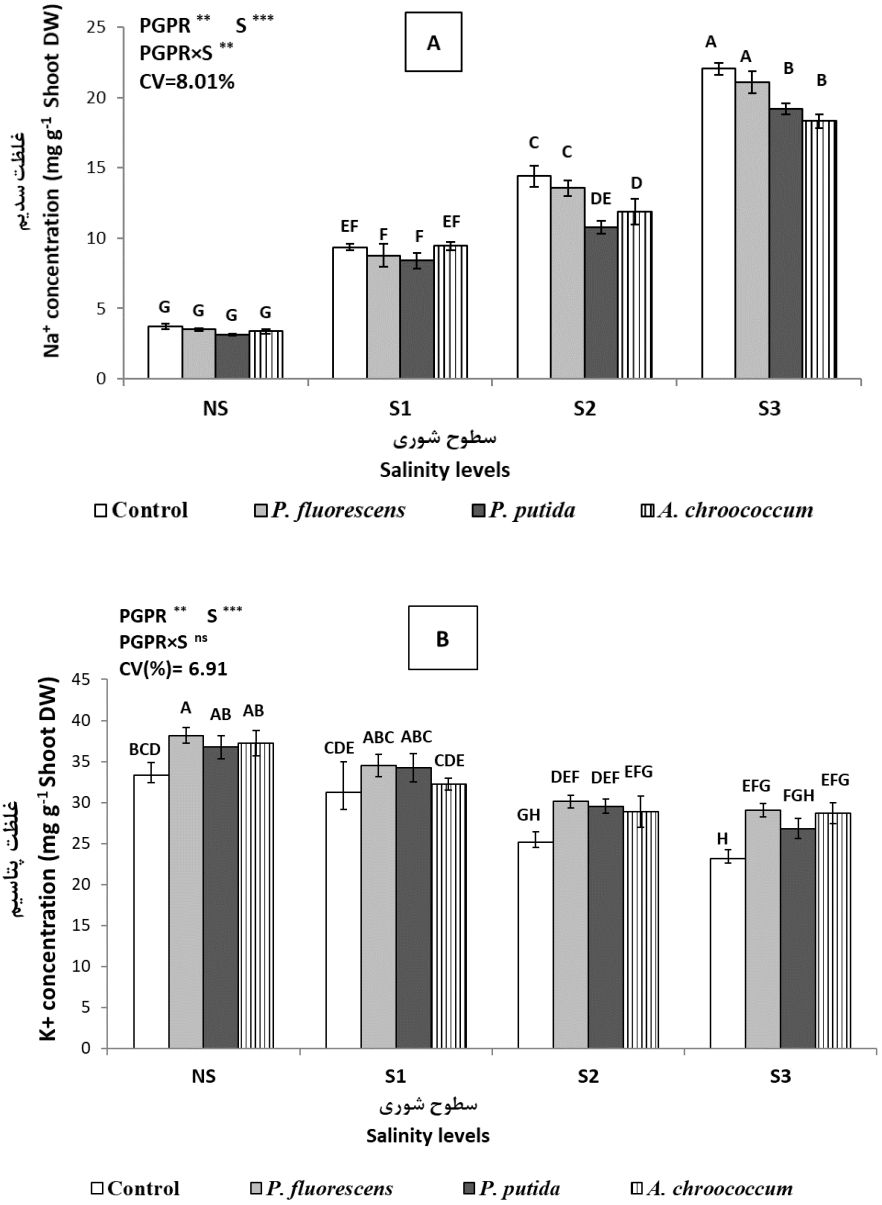




شکل ۳- اثر سطوح شوری و باکتری‌های محرک رشد بر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) (A) و گایاکول پراکسیداز (POD) (B) گیاه شیرین‌بیان. NS، S1، S2 و S3 به‌ترتیب عبارتند از تیمار بدون شوری و شوری ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشند. حروف لاتین غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، P<۰/۰۵).

Fig. 3. Effect of PGPR inoculation and salinity levels on superoxide dismutase (SOD) (A) and guaiacol peroxidase (POD) (B) activities of liquorice. NS, S1, S2, and S3 are non-saline, 60, 120, and 180 mM NaCl, respectively. The error bars represent the standard error (SE). Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که شوری سبب افزایش معنی‌دار سدیم بخش هوایی گیاهان گردید (شکل ۴-A). همان‌طور که در شکل ۴-A مشاهده می‌شود باکتری‌های محرک رشد تحت تنش شوری S1 اثر معنی‌داری بر جذب سدیم نشان ندادند. *A. chroococcum* و *P. putida* در سطح ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم منجر به کاهش جذب سدیم در گیاه شیرین‌بیان شدند و *P. fluorescens* در هیچ‌یک از سطوح شوری اثر معنی‌داری بر جذب سدیم نشان نداد (شکل ۴-A).

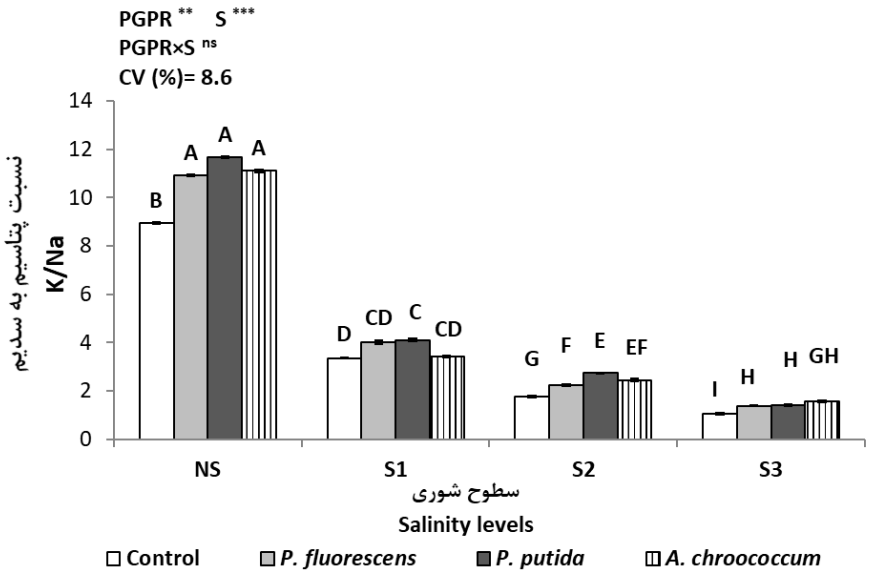


شکل ۴- اثر سطوح شوری و باکتری‌های محرک رشد بر غلظت سدیم (A) و پتاسیم (B) شیرین‌بیان. NS، S1، S2 و S3 به‌ترتیب عبارتند از تیمار بدون شوری و شوری ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشند. حروف لاتین غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، P<۰/۰۵).

Fig. 4. Effect of PGPR inoculation and salinity levels on Na (A) and K (B) concentrations of liquorice. NS, S1, S2, and S3 are non-saline, 60, 120, and 180 mM NaCl, respectively. The error bars represent the standard error (SE). Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که شوری سبب کاهش معنی‌دار پتاسیم بخش هوایی گیاهان بدون تلقیح باکتری گردید (شکل B-۴). در تیمار بدون شوری در میان تیمارهای دارای تلقیح باکتری، فقط *P. fluorescens* اثر افزایشی معنی‌داری بر جذب پتاسیم در مقایسه با شاهد بدون تلقیح نشان داد (P≤۰/۰۵). همان‌طور که در شکل B-۴ مشاهده می‌شود در سطح ۶۰ میلی‌مولار کلرید سدیم تلقیح با

ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه اثر معنی‌داری بر غلظت پتاسیم نشان نداد و در سطح ۱۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم گونه‌های سودوموناس اثر مثبت و افزایشی معنی‌داری را بر این پارامتر داشتند. در سطح بالای شوری (۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) تلقیح با هر سه گونه ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه سبب افزایش غلظت پتاسیم در گیاه شیرین‌بیان گردید. هم‌چنین تلقیح با گونه‌های ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه در سطح شاهد بدون شوری، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم منجر به افزایش معنی‌دار K/Na گردید (شکل ۵).



شکل ۵- اثر سطوح شوری و باکتری‌های محرک رشد بر نسبت پتاسیم به سدیم (K/Na) شیرین‌بیان. NS، S1، S2 و S3 به‌ترتیب عبارتند از تیمار بدون شوری و شوری ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم. بارها نشان‌دهنده خطای استاندارد (SE) می‌باشند. حروف لاتین غیرمشابه بیانگر تفاوت معنی‌دار می‌باشد (آزمون چنددامنه‌ای دانکن، P<۰/۰۵).

Fig. 5. Effect of PGPR inoculation and salinity levels on K/Na of liquorice. NS, S1, S2, and S3 are non-saline, 60, 120, and 180 mM NaCl, respectively. The error bars represent the standard error (SE). Different letters indicate significant differences according to the Duncan's Multiple Range Test (P<0.05).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که شوری باعث افزایش غلظت Na و کاهش غلظت K شد. با این حال تیمار ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه بسته به نوع گونه و سطح شوری موجب کاهش جذب Na و یا افزایش جذب K در مقایسه با گیاهان شاهد بدون تلقیح و تحت تنش شوری گردیدند، بنابراین نسبت K/Na را افزایش دادند. باکتری‌های محرک رشد به هوموستازی یون سمی کمک می‌کنند که باعث افزایش رشد و تحمل گیاه تحت تنش شوری می‌شود. در سال‌های اخیر، ترکیبات آلی فرار (VOCs) به‌عنوان روش جدیدی از سیگنالینگ بین باکتری‌های محرک رشد و گیاهان یافت شده است که در آن VOCs برخی از سویه‌های خاص باکتری باعث افزایش رشد گیاه با تنظیم فرآیندهای زیستی مختلف از جمله توزیع هورمون، جذب مواد مغذی، هوموستازی سدیم و تولید زیستی اسموپروتکتانت می‌شوند (۴۳). پژوهش‌گران گزارش کرده‌اند که تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه با مهار جذب سدیم

و کلر باعث افزایش رشد جو در شرایط تنش شوری در مقایسه با شاهد بدون تلقیح می‌شود (۴۴). پژوهش‌گران بیان نموده‌اند که وجود سویه‌های ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه به دلیل تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، کاهش جذب یون‌های سمی و تشکیل پروتئین‌های خاص تنش باعث بهبود رشد گیاه در شرایط تنش می‌شود (۴۴ و ۴۵). هم‌چنین سویه‌های ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه ممکن است اگزوپلی‌ساکاریدهایی تولید کنند که می‌تواند باعث کاهش دسترسی و جذب سدیم توسط ریشه‌ها و انتقال آن‌ها به برگ‌ها شود و در نتیجه تنش شوری را کاهش می‌دهد (۴۶).

مطالعات نشان می‌دهد که افزایش غلظت پتاسیم در گیاهان تحت تنش شوری می‌تواند اثرات مضر شوری بر رشد و عملکرد را بهبود بخشد (۳۱). در طول تنش شوری، یون‌های Na^+ با یک درشت مغذی اصلی دیگر مانند K^+ رقابت می‌کنند که منجر به عدم تعادل تغذیه‌ای و هم‌چنین اختلالات متابولیک می‌شود و بنابراین تأثیر منفی بر گیاهان می‌گذارد. پژوهش‌گران بیان نموده‌اند که ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه می‌تواند هموستاز یونی را با بهبود جذب N، P و K گیاه حفظ کند. تیمار ریزوباکتری‌های محرک رشد می‌تواند رشد گیاه را با تغییر در جذب انتخابی یون K^+ و حفظ غلظت پتاسیم بالاتر در برابر Na^+ ارتقا دهد. نسبت K/Na بالا یکی از شاخص‌های پاسخ مؤثر گیاهان برای دفاع در برابر تنش شوری است که در پژوهش حاضر به‌طور معنی‌داری در سطوح بالای شوری (۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) تحت‌تأثیر گونه‌های ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه به‌کار رفته قرار گرفته است.

نتیجه‌گیری کلی

شاخص تحمل به نمک در گیاهان تلقیح‌شده با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه در سطوح ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم به‌طور معنی‌داری بالاتر از گیاهان بدون تلقیح بود. اثر *P. putida* در بهبود محتوای کلروفیل کل نسبت به سایر گونه‌ها معنی‌دارتر بود. به‌طورکلی گونه‌های سودوموناس منجر به افزایش محتوای پرولین و کاهش MDA در مقایسه با شاهد بدون باکتری شدند. علاوه‌بر این، تلقیح ریزوباکتری‌های محرک رشد باعث افزایش بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در تمام سطوح نمک شد و به‌طور معنی‌داری غلظت پتاسیم را تحت تنش شدید شوری (۱۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) افزایش داد و نسبت K/Na را بهبود بخشید. نتایج نشان می‌دهد که تلقیح با ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه منتخب به‌ویژه گونه‌های سودوموناس می‌تواند به‌عنوان راهکاری مفیدی برای کاهش تنش شوری در شیرین‌بیان مدنظر قرار گیرد. نتایج این پژوهش اثر استفاده از ریزوباکتری‌های محرک رشد را در ارتقای رشد و تحمل به تنش شوری گیاه دارویی شیرین‌بیان نشان می‌دهد و اطلاعات مفید برای تولید این گیاه با کیفیت بهتر در اراضی شور یا خشک را فراهم می‌کند. بهبود رشد و تحمل به تنش شوری در گیاهان شیرین‌بیان در ارتباط با ریزوباکتری‌های محرک رشد به‌کار رفته نشان‌دهنده امکان بهره‌برداری از این ریزجاندارن برای تولید شیرین‌بیان در خاک‌های شور به عنوان یک محصول با ارزش اقتصادی می‌باشد.

منابع

1.Ilangumaran, G. & Smith, D. L. (2017). Plant growth promoting rhizobacteria in amelioration of salinity stress: a systems biology perspective. *Front. Plant Sci*. 8, 1768.

2.Dodd, I. C. & Pérez-Alfocea, F. (2012). Microbial amelioration of crop salinity stress. *J. Exp. Bot.* 63 (9), 3415-3428.

3.Hu, Y. & Schmidhalter, U. (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil Sci*. 168 (4), 541-549.

4.Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7 (9), 405-410.

5.Singh, R. P. & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). Plos One. 11, 6.e0155026.

6.Cordero, I., Balaguer, L., Rincon, A. & Pueyo, J. J. (2018). Inoculation of tomato plants with selected PGPR represents a feasible alternative to chemical fertilization under salt stress. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 181 (5), 694-703.

7.Salomon, M. V., Bottini, R., de Souza Filho, G. A., Cohen, A. C., Moreno, D., Gil, M. & Piccoli, P. (2014). Bacteria isolated from roots and rhizosphere of Vitis vinifera retard water losses, induce abscisic acid accumulation and synthesis of defense-related terpenes in vitro cultured grapevine. *Physiol. Plant.* 151 (4), 359-374.

8.Upadhyay, S. & Singh, D. (2015). Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. *Plant Biol.* 17 (1), 288-293.

9.Khan, M. & Hemalatha, S. (2016). Biochemical and molecular changes induced by salinity stress in *Oryza sativa* L. *Acta Physiol. Plant*. 38 (7), 167.

10.Ha-Tran, D. M., Nguyen, T. T. M., Hung, S. H., Huang, E. & Huang, C. C. (2021). Roles of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in stimulating salinity stress defense in plants: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (6), 3154.

11.Wang, W., Wu, Z., He, Y., Huang, Y., Li, X. & Ye, B. C. (2018). Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by *Bacillus* isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. 164, 520-529.

12.Kasotia, A., Varma, A. & Choudhary, D. K. (2015). *Pseudomonas*-mediated mitigation of salt stress and growth promotion in *Glycine max. Agric. Res.* 4 (1), 31-41.

13.Jha, Y. & Subramanian, R. (2014). PGPR regulate caspase-like activity, programmed cell death, and antioxidant enzyme activity in paddy under salinity. *Physiol. Mol. Biol*. 20 (2), 201-207.

14.Ghadiri, H. & Bagherian, T. N. (2000). Effects of scarification and temperature on germination of licorice (*Glycyrrhiza glabra* L.) seeds. *J. Agric. Sci. Technol.* 2, 257-262.

15.Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15 (3), 473-497.

16.Lichtenthaler, H. K. & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. P 431-438, In: R.E., Wrolstad, T.E. Acree, H. An, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker and P. Sporns (eds.), Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Chapter F4. Chlorophylls, John Wiley and Sons, New York, NY, USA.

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

18.Heath, R. L. & Packer, L. (1968). Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys*. 125 (1), 189-198.

19.Bacelar, E. A., Santos, D. L., Moutinho-Pereira, J. M., Lopes, J. I., Gonçalves, B. C., Ferreira, T. C. & Correia, C. M. 2007. Physiological behaviour, oxidative damage and antioxidative protection of olive trees grown under different irrigation regimes. *Plant Soil.* 292 (1), 1-12.

20.Chance, B. & Maehly, A. (1955). Assay of catalase and peroxidase. Methods in Enzymology, Pp: 764-775.
21.Giannopolitis, C. N. & Ries, S. K. (1977). Superoxide dismutases: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. *Plant Physiol*. 59 (2), 315-318.
22.Siddikee, M. A., Glick, B. R., Chauhan, P. S., Jong Yim, W. & Sa, T. (2011). Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiol. Biochem*. 49 (4), 427-434.
23.Hamdia, M., Shaddad, M. & Doaa, M. M. (2004). Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions. *Plant Growth Regul*. 44 (2), 165-174.
24.Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem*. 42 (6), 565-572.
25.Rojas-Tapias, D., Moreno-Galván, A., Pardo-Díaz, S., Obando, M., Rivera, D. & Bonilla, R. (2012). Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Appl. Soil Ecol*. 61, 264-272.
26.Abdel Latef, A. A. H., Abu Alhmad, M. F., Kordrostami, M., Abo-Baker, A. B. A. E. & Zakir, A. (2020). Inoculation with *Azospirillum lipoferum* or *Azotobacter chroococcum* reinforces maize growth by improving physiological activities under saline conditions. *Plant Growth Regul*. 39 (3), 1293-1306.
27.Gupta, A., Rai, S., Bano, A., Sharma, S., Kumar, M., Binsuwaidan, R., Suhail Khan, M., Upadhyay, T. K., Alshammari, N. & Saeed, M. (2022). ACC Deaminase Produced by PGPR mitigates the adverse effect of osmotic and salinity stresses in *Pisum sativum* through modulating the antioxidants activities. *Plants*. 11 (24), 3419.
28.Abdelmoteleb, A. & Gonzalez-Mendoza, D. (2020). Isolation and identification of phosphate solubilizing *Bacillus* spp. from *Tamarix ramosissima* rhizosphere and their effect on growth of *Phaseolus vulgaris* under salinity stress. *Geomicrobiol. J*. 37 (10), 901-908.
29.Yoolong, S., Kruasuwan, W., Thanh Phạm, H. T., Jaemsaeng, R., Jantasuriyarat, C. & Thamchaipenet, A. (2019). Modulation of salt tolerance in Thai jasmine rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML105) by *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 expressing ACC deaminase. *Sci. Rep*. 9 (1), 1-10.
30.Naliwajski, M. & Skłodowska, M. (2021). The relationship between the antioxidant system and proline metabolism in the leaves of cucumber plants acclimated to salt stress. *Cells*. 10 (3), 609.
31.Kohler, J., Hernández, J. A., Caravaca, F. & Roldán, A. (2009). Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environ. Exp. Bot*. 65 (2-3), 245-252.
32.Signorelli, S., Coitiño, E. L., Borsani, O. & Monza, J. (2014). Molecular mechanisms for the reaction between •OH radicals and proline: insights on the role as reactive oxygen species scavenger in plant stress. *J. Phys. Chem. B*. 118 (1), 37-47.
33.Patel, D. & Saraf, M. (2013). Influence of soil ameliorants and microflora on induction of antioxidant enzymes and growth promotion of *Jatropha curcas* L. under saline condition. *Eur. J. Soil Biol*. 55, 47-54.
34.Bano, A. & Fatima, M. (2009). Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biol. Fertil. Soils*. 45 (4), 405-413.
35.Samaddar, S., Chatterjee, P., Choudhury, A. R., Ahmed, S. & Sa, T. (2019). Interactions between *Pseudomonas* spp.

and their role in improving the red pepper plant growth under salinity stress. *Microbiol. Res*. 219, 66-73.

36. Singh, R. P. & Jha, P. N. (2017). The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants. *Front. Microbiol*. 8, 1945.
37. Alexander, A., Singh, V. K. & Mishra, A. (2020). Halotolerant PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* BJ01 induces salt tolerance by modulating physiology and biochemical activities of *Arachis hypogaea*. *Front. Microbiol*. 11, 568289.
38. Sharma, S., Kulkarni, J. & Jha, B. (2016). Halotolerant rhizobacteria promote growth and enhance salinity tolerance in peanut. *Front. Microbiol*. 7, 1600.
39. Karthikeyan, B., Joe, M. M., Islam, M. & Sa, T. (2012). ACC deaminase containing diazotrophic endophytic bacteria ameliorate salt stress in *Catharanthus roseus* through reduced ethylene levels and induction of antioxidative defense systems. *Symbiosis*. 56 (2), 77-86.
40. Fu, Q., Liu, C., Ding, N., Lin, Y. & Guo, B. (2010). Ameliorative effects of inoculation with the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* sp. DW1 on growth of eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings under salt stress. *Agric. Water Manage*. 97 (12), 1994-2000.
41. Fazal, A. & Bano, A. (2016). Role of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), biochar, and chemical fertilizer under salinity stress. Commun. *Soil Sci. Plant Anal*. 47 (17), 1985-1993.
42. Chiboub, M., Jebara, S. H., Saadani, O., Fatnassi, I. C., Abdelkerim, S. & Jebara, M. (2018). Physiological responses and antioxidant enzyme changes in *Sulla coronaria* inoculated by cadmium resistant bacteria. *J. Plant Res*. 131 (1), 99-110.
43. Bhattacharyya, D., Yu, S. M. & Lee, Y. H. (2015). Volatile compounds from *Alcaligenes faecalis* JBCS1294 confer salt tolerance in *Arabidopsis thaliana* through the auxin and gibberellin pathways and differential modulation of gene expression in root and shoot tissues. *Plant Growth Regul*. 75 (1), 297-306.
44. Suarez, C., Cardinale, M., Ratering, S., Steffens, D., Jung, S., Montoya, A.M.Z., Geissler-Plaum, R. & Schnell, S. (2015). Plant growth-promoting effects of *Hartmannibacter diazotrophicus* on summer barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress. *Appl. Soil Ecol*. 95, 23-30.
45. Krishnamoorthy, R., Kim, K., Subramanian, P., Senthilkumar, M., Anandham, R. & Sa, T. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi and associated bacteria isolated from salt-affected soil enhances the tolerance of maize to salinity in coastal reclamation soil. *Agric. Ecosyst. Environ*. 231, 233-239.
46. Masmoudi, F., Tounsi, S., Dunlap, C. A. & Trigui, M. (2021). Endophytic halotolerant *Bacillus velezensis* FMH2 alleviates salt stress on tomato plants by improving plant growth and altering physiological and antioxidant responses. *Plant Physiol. Biochem*. 165, 217-227.