**Crop Biotech.**
Spring (2016) 13: 57-68.

**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی**
سال پنجم، شماره سیزدهم، بهار ۱۳۹۵ (۶۸-۵۷)

# بررسی تأثیر متقابل استرپتومایسس‌های تولید کننده اکتوئین(ها) و گندم در شرایط تنش شوری

**علیرضا اکبری[۱]، شاهرخ قرنجیک[۲]، پریسا کوباز[۳]، ابراهیم کریمی[٤]، اکرم صادقی[۵*]**
۱. دانش آموخته کارشناس‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه شاهرود، شاهرود
۲. استادیار اصلاح نباتات مولکولی، دانشکده مهندسی کشاورزی، دانشگاه شاهرود، شاهرود
۳. استادیار فیزیولوژی گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
٤. کارشناس‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۵. استادیار ژنتیک مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۹/۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۳/۲۰)

# Evaluation of Mutual Effect of Ectoine(s) producing *Streptomyces* and wheat at salt conditions

**Ali Reza Akbari[1], Shahrokh Gharanjik[2], Parisa Koobaz[3], Ebrahim Karimi[4], Akram Sadeghi[5*]**
1. Former M.Sc. Student, Agricultural Biotechnology, Shahrood University, Shahrood, Iran; 2. Assistant Professor of Molecular Plant Breeding, Shahrood University, Shahrood, Iran; 3. Assistant Professor of Plant Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; 4. Former M.Sc. Student, Plant Pathology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; 5. Assistant Professor of Molecular Genetics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
(Received: Nov. 27, 2015 -Accepted: Jun. 9, 2016)

**Abstract**

Soil microorganisms with potential for alleviation of salt stress in combination with plant growth promotion would be a promising approach in sustainable agriculture. In the present study, interaction of two varieties of bread wheat (*Triticum aestivum* L.), Pishtaz and Zarrin and three salt tolerant ectoines producing bacteria including *S. Cellulosae*, *S. rimosus C-2012* and *Streptomyces* Strain S2 was undertaken in normal and salt conditions. Diversity and distribution of 16S rRNA gene of rhizospheric bacteria in soil inoculated with *Streptomyces* in salt and normal conditions were studied by denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method. Results showed that bacterial cell free extract of all strains reduced root length but S2 and C-2012 increased plant dry weight related to control. Soil treatment with strain C-2012 increased Pishtaz root and shoot fresh and dry weight and Zarrin root fresh and dry weight in normal conditions. At salt conditions, plant growth promotion of C-2012 limited to increase Pishtaz root fresh and dry weight and Zarrin leaf area. Root extract of wheat plantlets increased C-2012 population (cfu) and decreased mycellial aggregation. The effect of Pishtaz root extract on bacterial cfu was more than Zarrin. Based on PCR-DGGE data, the diversity of 16S rRNA gene in rhizosphere changed when *Streptomyces* or salt was added to soil. PCR-DGGE profiles of 16S rRNA gene in rhizosphere of wheat varieties were also different. Our observations certify that beneficial role of salt tolerant *Streptomyces* for wheat growth promotion at normal or saline conditions is plant variety dependent.

**Keywords:** Ectoine, *Streptomyces*, salt, wheat, DGGE.

**چکیده**

میکروارگانیسم‌های خاک با توانایی تخفیف اثرات تنش شوری و تحریک رشد گیاه می‌توانند راهکاری امیدبخش در کشاورزی پایدار باشند. در این مطالعه رابطه متقابل دو رقم گندم نان (پیشتاز و زرین) و سه گونه استرپتومایسس مقاوم به نمک تولید کننده اکتوئین(ها) در شرایط تنش شوری و بدون تنش بررسی شد. با استفاده از روش PCR-DGGE تنوع و توزیع ژن‌های 16S rRNA باکتری‌های رایزوسفری در خاک تلقیح شده و نشده با استرپتومایسس در شرایط شور و غیر شور مطالعه شد. نتایج نشان داد عصاره بدون سلول هر سه باکتری طول ریشه را کاهش و عصاره باکتری S2 و ۲۰۱۲ -C وزن خشک گیاه را نسبت به شاهد افزایش داد. تیمار خاک با باکتری ۲۰۱۲ -C وزن تر و خشک ریشه و ساقه رقم پیشتاز و وزن تر و خشک ریشه رقم زرین را در شرایط غیر تنش افزایش داد. در شرایط تنش اثر محرک رشدی این باکتری به افزایش وزن تر و خشک ریشه پیشتاز و سطح برگ زرین محدود شد. عصاره ریشه گندم موجب افزایش جمعیت باکتری ۲۰۱۲ -C و کاهش تجمع میسلیوم‌های باکتری شد. تأثیر عصاره ریشه پیشتاز بر جمعیت باکتری بیشتر از زرین بود. بر اساس نتایج PCR-DGGE تنوع ژن16S rRNA رایزوسفری با افزودن باکتری و یا نمک به خاک تغییر کرد. پروفایل ژنی حاصل در رایزوسفر ارقام مختلف گندم نیز متفاوت بود. نتایج نشان داد نقش مثبت استرپتومایسس مقاوم به نمک برای تحریک رشد گندم در شرایط تنش و غیر تنش به رقم وابسته است.

**واژه‌های کلیدی:** اکتوئین، استرپتومایسس، نمک، گندم، DGGE.

* نویسنده مسئول: اکرم صادقی
E-mail: aksadeghi@abrii.ac.ir

## مقدمه

گونه‌های استرپتومایسس (*Streptomyces*) به عنوان باکتری‌های کلونیزه کننده ریزوسفر که خاصیت زیست کنترلی قارچ‌ها را دارند و عواملی مفید در کنترل بیماری‌های قارچی و همچنین تحریک‌کننده رشد گیاه هستند معرفی می‌شوند (Tokala *et al.,* 2002). بسیاری از موجودات زنده برای مقابله با تنش اسمزی اقدام به تولید و تجمع تنظیم کننده‌های اسمزی آلی می‌کنند. این مواد تنظیم کننده اسمزی شامل پرولین، بتائین‌ها، پولیول‌ها، الکل‌های قندی و قندهای محلول هستند (Chinnusamy *et al.,* 2005). افزایش پرولین آزاد در کشت باکتری استرپتومایسس با افزایش نمک مشاهده شده است (Killhamt and Firestone, 1984a). همچنین تولید و عملکرد سایر متابولیت‌های سازگار تحت تنش شوری در استرپتومایسس‌ها بررسی شده است. این متابولیت‌های سازگار استرپتومایسس‌ها را قادر می‌سازند که در فشار اسمزی بالا زنده بمانند (Killhamt and Firestone, 1984b). طیف وسیعی از مقاومت به نمک در میان گونه‌های استرپتومایسس دیده می‌شود. برخی از این گونه‌ها قادرند تا ۱۳٪ نمک را تحمل و رشد کنند (Tresner *et al.,* 1968). شواهدی وجود دارد که نشان دهنده اهمیت ویژه این گروه از باکتری‌ها در خاک‌های شور و قلیایی است. در شرایط استرس مانند خشکی طولانی مدت این باکتری‌ها به صورت جنس غالب خاک پدیدار می‌شوند (Killhamt and Firestone, 1984b). از طرف دیگر نتایج برخی مطالعات نشان دهنده حضور بیشتری از گونه‌های آنتاگونیست در خاک‌های شور است (Basilio *et al.,* 2003). گونه‌هایی از استرپتومایسس توانایی تولید اسمولیت‌های به خصوصی به نام اکتوئین (ectoine) را دارند. اکتوئین تحت تأثیر شرایط نامناسب محیطی مانند سرما، گرما، شوری و خشکی از ساختار DNA و آنزیم‌های باکتری حفاظت می‌کند (Pastor *et al.,* 2010). جذب اکتوئین خارج سلولی توسط باکتری‌های حساس (مانند اشرشیا کولی) در شرایط تنش شوری و همچنین تحریک سنتز بیشتر اکتوئین و سایر محلول‌های سازگار توسط اکتوئین خارجی مسئله‌ای است که نقش مثبت این ماده را در بالا بردن تحمل سلول‌های زنده تحت تنش شوری بیان می‌کند (Sadeghi *et al.,* 2014; Prabhu *et al.,* 2004; Malin and Lapidot, 1996). از طرف دیگر نقش این ماده به عنوان یک حد واسط شیمیایی در تحمل شوری رایزوبیوم‌ها مطالعه شده است (Talibart *et al.,* 1994). مطالعاتی به منظور مقابله با تنش شوری از طریق تلقیح بذر و یا گیاهچه گیاهان زراعی با باکتری‌های تحریک کننده رشد (Mayak *et al.,* 2004) و آزوسپیریلوم (Bacilio *et al.,* 2004) انجام شده است. همچنین در مطالعه دیگری با استفاده از اگروباکتریوم، اپرن *ectABC* به کلروپلاست گیاهچه‌های توتون منتقل شد. پس از بیان این ژن‌ها اکتوئین در سلول‌های گیاه توتون تولید و تجمع یافت. در نهایت میزان تحمل گیاهان تراریخته نسبت به نمک تا ۳ برابر افزایش پیدا کرد (Rai *et al.,* 2006). تا اکنون گزارشی دال بر بررسی تأثیر مستقیم استرپتومایسس مقاوم به شوری تولید کننده اکتوئین بر گیاه دیده نشده است. خواص محرک رشدی گونه‌های بومی استرپتومایسس بر گیاهان زراعی قبلا گزارش شده است (Sadeghi *et al.,* 2012) با این پیش زمینه تأثیر این جدایه‌ها که از نظر تولید اکتوئین متفاوت هستند بر رشد گندم تحت تنش شوری بررسی شد. همچنین به منظور درک بهتر اثر متقابل گیاه و باکتری تأثیر عصاره ریشه ارقام مختلف گندم بر رشد استرپتومایسس و تأثیر کشت گیاه و تلقیح آن با استرپتومایسس در شرایط شور و غیر شور بر تنوع فلور ریزوسفر نیز مطالعه شد.

## مواد وروش‌ها

### باکتری‌ها و شرایط کشت

در این مطالعه از سه گونه باکتری استرپتومایسس *S. cellulosae* 62، *S. rimosus* C-2012 و *Streptomyces* Strain S2 موجود در بانک ژن بخش بیوتکنولوژی میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران استفاده شد. خصوصیات محرک رشدی (Sadeghi *et al.,* 2012)، بیوکنترلی (Karimi *et al.,* 2012) و مقاومت به شوری، حرارت و تولید دو اسمولیت اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین (Sadeghi *et al.,* 2014) این باکتری‌ها قبلا گزارش شده بود. مشخصات این باکتری‌ها در جدول ۱ آورده شده است. باکتری‌ها بر روی پلیت حاوی محیط ISP2 (۱۰ گرم در لیتر عصاره مالت، ۴ گرم در لیتر عصاره مخمر، ۴ گرم در لیتر گلوکز و ۱۸ گرم در لیتر آگار با اسیدیته ۷/۲) کشت شد و به مدت پنج روز در دمای ۲۹°C نگهداری شد. برای تهیه کشت مایع سوسپانسیون کشت جوان باکتری در سرم فیزیولوژی (کلرید سدیم ۰/۹٪) استریل با غلظت $۱۰^{۶}$ cfu/ml تهیه شد. یک میلی لیتر از این سوسپانسیون در ۵۰ میلی لیتر محیط کشت ISP2 مایع در فلاسک‌های کشت ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی غلظت‌های صفر و ۰/۳ مولار کلرید سدیم کشت شد. فلاسک‌ها به مدت ۷۲ ساعت درون شیکر انکوباتوردار و در شرایط ۲۹° C و ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. محتوای فلاسک‌ها در دمای ۴° C به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل به ماسه بادی اسید شور شده و استریل اضافه شد. غلظت باکتری با استفاده از مقدار مناسب ماسه در حدود $۱۰^{۶}$ cfu/g تنظیم شد (Karimi and Sadeghi, 2015). در تمام آزمایش‌ها اسیدیته محیط کشت پس از افزودن نمک در حد ۷/۲ تنظیم شد. جهت تعیین نرخ رشد، میسلیوم و اسپور باکتری توسط پمپ خلاء بر روی کاغذ صافی جمع‌آوری و سپس در دمای ۶۰° C به مدت ۴۸ ساعت خشک شد.

جدول ۱. مشخصات استرپتومایسس‌های استفاده شده در این مطالعه

| باکتری | *S. rimosus* C-2012 | *S. cellulosae* 62 | Strain S2 |
|---|---|---|---|
| رشد در حضور نمک (۰/۷ مولار) | + | + | + |
| رشد در دمای ۴۵ درجه سلسیوس | + | + | - |
| تولید اکتوئین در حضور نمک (µmol/mg dw) | ۷ | ۲ | ۲/۵ |
| تولید هیدروکسی اکتوئین در حضور نمک (µmol/mg dw) | ۶۰ | ۰/۸ | ۰/۶ |

### تأثیر عصاره صاف شده باکتری بر رشد جوانه گندم

این آزمایش بر روی بذر گندم نان (*Triticum aestivum* L.) رقم پیشتاز و به صورت طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل ۳ گونه باکتری مطابق بخش اول مواد و روش‌ها و به اختصار به نام‌های ۶۲، S2، ۲۰۱۲ -C وآب مقطر به عنوان شاهد بود. تعداد ۲۵ عدد بذر از هر رقم پس از ضد عفونی سطحی (۳۰ ثانیه الکل۷۰ درصد، ۵ بار آبشویی، ۵ دقیقه هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد، ۵ بار آبشویی) در پتری دیش بر روی کاغذ صافی قرار داده شد. سپس ۳ میلی لیتر از عصاره صاف شده کشت هر کدام از سویه‌ها با جمعیت ml/ $۱۰^{۹}$cfu به طور روزانه به پتری حاوی بذرها اضافه شد. بعد از ۷ روز صفات مورد نظر شامل درصد جوانه زنی، طول ریشه و ساقه و وزن تر و خشک گیاهچه‌ها اندازه گیری شد.

**تهیه عصاره آبی ریشه گندم و تأثیر آن بر رشد و جمعیت باکتری**

تعداد ۵۰ عدد بذر پس از ضدعفونی سطحی (مطابق بخش قبل) در هر پتری دیش کشت شد. پس از یک هفته ۴۵ گیاهچه که در حدود ۱۵ سانتیمتر طول داشت انتخاب شد. ریشه گیاهچه‌ها جدا و در هاون چینی همراه با ازت مایع پودر شد. برای تهیه عصاره آبی ۴۵ میلی لیتر آب مقطر به پودر حاصل اضافه و به مدت یک ساعت توسط دستگاه شیکر در دمای $^{o}$ ۴C به خوبی مخلوط و سپس مایع بدست آمده توسط فیلتر (با قطر ۰/۲ میکرون) صاف و استریل شد. جهت بررسی تأثیر عصاره ریشه بر جمعیت باکتری، یک میلی لیتر عصاره ریشه استریل به هر فلاسک کشت شده اضافه و به مدت ۴ روز در دستگاه شیکر انکوباتور دار با دور ۱۵۰ در دقیقه و دمای $^{o}$ C ۲۹ نگهداری شدند. سپس سری رقت میکروبی در سرم فیزیولوژی (کلرید سدیم ۰/۹ درصد) تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در پلیت حاوی محیط کشت جامد کشت و پس از دو روز نگهداری در دمای $^{o}$C ۲۹ جمعیت میکروبی (cfu) حاصل شمارش شد. توده میسلیومی از هر تیمار بر روی لام شیشه‌ای گسترده و پس از تثبیت به روش گرم (Austrian, 1960) رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری بررسی شد.

**بررسی تأثیر محرک رشدی استرپتومایسس بر گندم در شرایط گلخانه**

این آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۲ فاکتور و در ۳ تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل دو رقم گندم پیشتاز و زرین و فاکتور دوم در ۴ سطح خاک شامل خاک نرمال وخاک نرمال با باکتری (C- ۲۰۱۲)، خاک شور و خاک شور با باکتری بود که در شرایط کاملا مشابه محیطی شامل ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای روز ۳۰ درجه سانتی گراد و دمای شب ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی ۵۵ درصد انجام شد. بذور گندم ارقام پیشتاز و زرین پس از ضدعفونی سطحی (مطابق بخش قبل) در خاک ضدعفونی شده (دو بار اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد و فشار lbs ۱۵ هر بار به مدت ۲۰ دقیقه) کشت شد. خاک استفاده شده از مزارع گندم جمع آوری و قبل از ضدعفونی به نسبت ۱به ۲۰ کوکوپیت به آن اضافه شد. ده کیلو خاک آماده شده به جعبه‌های کشت با ابعاد ۳۵ در ۵۰ منتقل شد. برای تیمار باکتری سطح خاک با ۴۰ گرم ماسه حاوی باکتری با غلظت cfu/g $۱۰^{۶}$ پوشیده و سپس کشت بذر انجام شد (Sadeghi *et al.,* 2012) جهت اعمال تنش شوری، پس از سبز شدن بذور و رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله ۳ برگی محلول نمک (NaCl) به تدریج به خاک اضافه شد و تا رسیدن هدایت الکتریکی خاک (EC) به ۲۰ میلی زیمنس ادامه یافت. دو هفته پس از اعمال تنش شوری نمونه برداری انجام شد. وزن و طول اندام‌های هوایی و ریشه (پس از شستشو و آبگیری سطحی) اندازه گیری و سپس در داخل پاکت کاغذی به مدت ۴۸ ساعت در آون $^{o}$ C ۵۰ خشک شد. وزن خشک نمونه‌ها اندازه‌گیری و ثبت شد. برای محاسبه سطح برگ از برگ سوم نمونه‌های گیاهی استفاده شد. طول بیشترین پهنای برگ اندازه گیری و در رابطه زیر قرار داده شد که در آن L طول ساقه و B پهنای برگ است:

$$LA= L\times B\times ۰/۷۵$$

**آنالیز PCR-DGGE**

نمونه‌های خاک از فضای ریزوسفری هر تیمار و در سه تکرار تهیه شد. استخراج DNA از ۱ گرم خاک با استفاده از Ultra Clean soil DNA kit (MO BIO Laboratories, Inc) و بر اساس دستورالعمل آن انجام شد. برای آنالیز PCR-DGGE از جفت آغازگر اختصاصی ژن 16s rRNA با توالی GCF357:5'CCTACGGGAGGCAGCAG-

3'; R518:5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3 و کلمپ: GC CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTC CCGCCGCCCCCGCCCG برای آغازگر رو به جلو استفاده شد (Saito *et al.,* 2007).

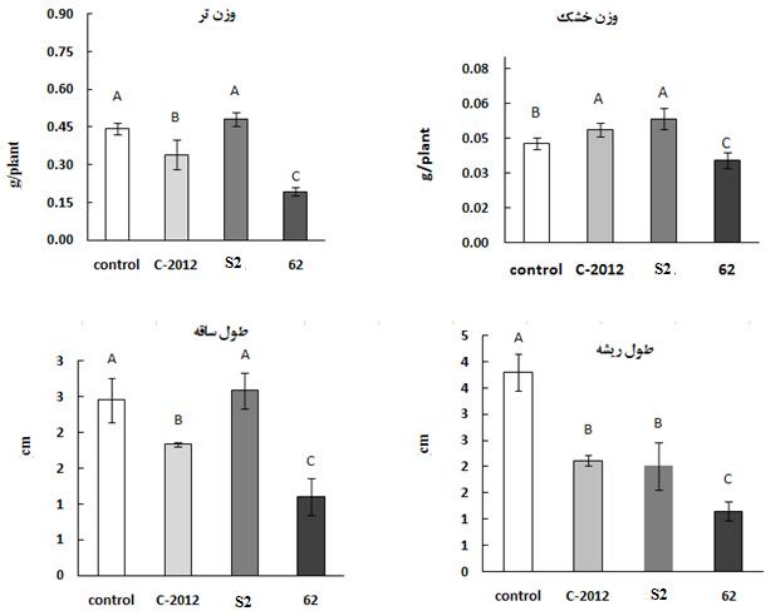
**آنالیز آماری**

تجزیه واریانس داده‌ها بر اساس طرح آماری بکار رفته و به وسیله نرم افزار SAS 9.4 انجام شد. مقایسه میانگن تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی داری ۵٪ انجام شد.

## نتایج

**تأثیر عصاره کشت سه گونه *Streptomyces* بر رشد جوانه گندم در شرایط آزمایشگاه**

نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره سه گونه باکتری مقاوم به شوری شامل *S. rimosus* C-2012، Strain S2 و *S. cellulosae* 62 بر رشد جوانه‌های گندم رقم پیشتاز (شکل ۱) نشان داد که عکس العمل گیاه در پاسخ به نوع باکتری متفاوت است. عصاره هر سه گونه باکتری موجب کاهش معنی‌دار طول ریشه گیاهچه در مقایسه با آب شیر به عنوان شاهد شد. تأثیر منفی عصاره کشت سویه ۶۲ بر طول ریشه بیشتر از دو سویه دیگر بود. ارزیابی صفات دیگر گیاهچه شامل طول ساقه و وزن تر و خشک کل گیاه نیز نشان دهنده تأثیر منفی این گونه در مقایسه با شاهد و دو گونه دیگر بود. از میان دو باکتری دیگر تأثیر باکتری C- ۲۰۱۲ بر وزن خشک و طول ریشه مشابه با باکتری S2 و از نظر وزن تر و طول ساقه کمتر از آن بود. از آنجا که صفت وزن خشک یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی رشد گیاهچه است از میان دو باکتری فوق الذکر باکتری C- ۲۰۱۲ که در شرایط شور مقادیر بیشتری از اکتوئین و هیدروکسی اکتوئین تولید کرد برای مرحله دوم مطالعه انتخاب شد.




شکل ۱. تأثیر عصاره بدون سلول سه گونه استرپتومایسس بر رشد بذور گندم رقم پیشتاز. باکتری‌های استفاده شده شامل *S. Cellulosae* 62، *S. rimosus* C-2012 و Strain S2 است که به ترتیب با علائم اختصاری 62، C-2012 و S2 نشان داده شده است.

تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن در سطح p< ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

**تأثیر محرک رشدی *S. rimosus* C-2012 بر رشد گندم در شرایط تنش و بدون تنش شوری در شرایط گلخانه**

نتایج این قسمت از مطالعه (جدول ۲) نشان داد باکتری *S. rimosus* C-2012 بر برخی از صفات فیزیولوژیک گندم در شرایط نرمال (بدون تنش) و شرایط تنش شوری تأثیر مثبت دارد. تأثیر باکتری بر هر یک از ارقام پیشتاز و زرین در شرایط تنش و بدون تنش متفاوت بود. وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی، طول اندام‌های هوایی و سطح برگ رقم پیشتاز در تیمار باکتری در شرایط بدون تنش به طور معنی دار از تیمار بدون باکتری بیشتر بود. افزایش وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی در تیمار باکتری به ترتیب ۶۴ و ۱۵ درصد بود. تأثیر مثبت و معنی‌دار باکتری استرپتومایسس بر رقم زرین در شرایط بدون تنش تنها بر وزن تر و خشک و طول ریشه مشاهده شد. افزایش وزن خشک ریشه در تیمار باکتری برای این رقم ۷۸ درصد بود. ارزیابی تأثیر باکتری در تنش شوری نشان داد که در این شرایط وزن تر و خشک ریشه رقم پیشتاز به ترتیب ۴۰ و ۶۲ درصد و سطح برگ رقم زرین ۷۲ درصد افزایش یافت.

جدول ۲. تأثیر تلقیح خاک با باکتری (*S. rimosus* C-2012) بر رشد دو رقم (پیشتاز و زرین) گندم نان در شرایط نرمال (بدون تنش) و تنش شوری

| رقم | تیمار | ریشه | | | اندام هوایی | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | وزن تر (mg/plant) | وزن خشک (mg/plant) | طول (cm) | وزن تر (mg/plant) | وزن خشک (mg/plant) | طول ساقه (cm) | سطح برگ (cm) |
| پیشتاز | نرمال | ۲/۲۵b | ۰/۷۴b | ۹/۲۰a | ۶۸/۶۶b | ۶/۳۴b | ۳۳/۴۶b | ۹/۰۴b |
| | نرمال+ باکتری | ۳/۸۰ a | ۱/۲۲a | ۹/۲۱a | ۸۱/۸۶a | ۷/۳۰a | ۳۶/۲۶a | ۱۱/۷۹a |
| | شوری | ۲/۷۰b | ۰/۸۰b | ۹/۲۰a | ۴۶/۲۰a | ۵/۶۰b | ۳۰/۲۶b | ۶/۰۰b |
| | شوری+ باکتری | ۳/۸۰a | ۱/۳۰a | ۱۰/۵۰a | ۴۶/۷۰a | ۵/۵۰b | ۳۱/۲۰b | ۷/۶۰b |
| زرین | نرمال | ۳/۲۰b | ۰/۸۳b | ۸/۲۶b | ۶۵/۲۶a | ۶/۷۹a | ۳۱/۴۶a | ۸/۶۷a |
| | نرمال+ باکتری | ۶/۰۲a | ۱/۴۸a | ۱۱/۶۰a | ۶۸/۸۶a | ۸/۰۳a | ۳۲/۸۶a | ۸/۶۲a |
| | شوری | ۲/۵b | ۰/۹۰b | ۹/۲۰b | ۴۰/۳۰b | ۴/۵۰b | ۲۹/۲۰a | ۴/۷۰b |
| | شوری+ باکتری | ۳/۱۰b | ۱/۰۰b | ۱۰/۳۰b | ۴۲/۱۰b | ۵/۹۰b | ۳۰/۸۰a | ۸/۱۰a |

مقایسه میانگین اجزای عملکرد بین نرمال و نرمال+باکتری و شوری و شوری+شوری باکتری و برای هر رقم به طور جداگانه انجام شده است.
تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن در سطح $p< ۰/۰۵$ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.

**تأثیر عصاره آبی ریشه گندم بر رشد و جمعیت باکتری**

عصاره آبی ریشه دو رقم پیشتاز و زرین تأثیری متفاوت بر وزن و جمعیت (cfu) باکتری *S. rimosus* C-2012 داشت (شکل ۲). افزودن نمک به میزان ۳۰۰ میلی مولار به کشت مایع موجب افزایش معنی دار وزن خشک و جمعیت باکتری شد. در تیمار باکتری با عصاره آبی ریشه گندم اگرچه وزن خشک در حضور و عدم حضور نمک کمتر از محیط بدون عصاره ریشه بود اما اثر مثبت نمک بر وزن خشک همچنان مشاهده شد. افزایش قابل توجه جمعیت باکتری در تیمارهای حاوی عصاره ریشه در حضور و عدم حضور نمک مشاهده شد. افزایش جمعیت باکتری در تیمار با عصاره ریشه زرین و پیشتاز به ترتیب ۲۸ و ۳۵ درصد بود.

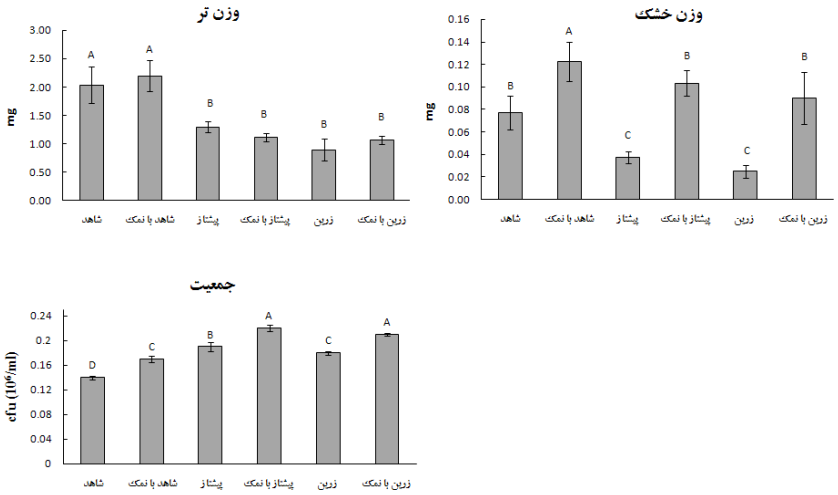
**تأثیر عصاره آبی ریشه گندم بر میسلیوم‌های باکتری**

میسلیوم‌های باکتری *S. rimosus* C-2012 در کشت مایع حاوی عصاره آبی ریشه گندم نسبت به

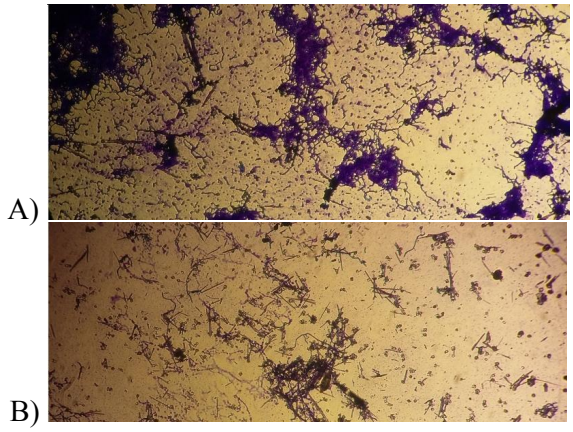
شاهد (محیط کشت بدون عصاره ریشه) شکننده‌تر بود و تمایل کمتری برای تشکیل توده‌های مدور و کلاف مانند داشت (شکل ۳). بر خلاف کشت شاهد که پس از قطع هوادهی میسلیوم‌ها به سرعت ته نشین و مایع رویی شفاف گشت، تیمارهای حاوی عصاره ریشه پس از قطع هوادهی مدت زمان بیشتری کدورت داشت و به سرعت ته‌نشین نشد.

## تأثیر تلقیح باکتری و تنش شوری بر پروفایل DGGE

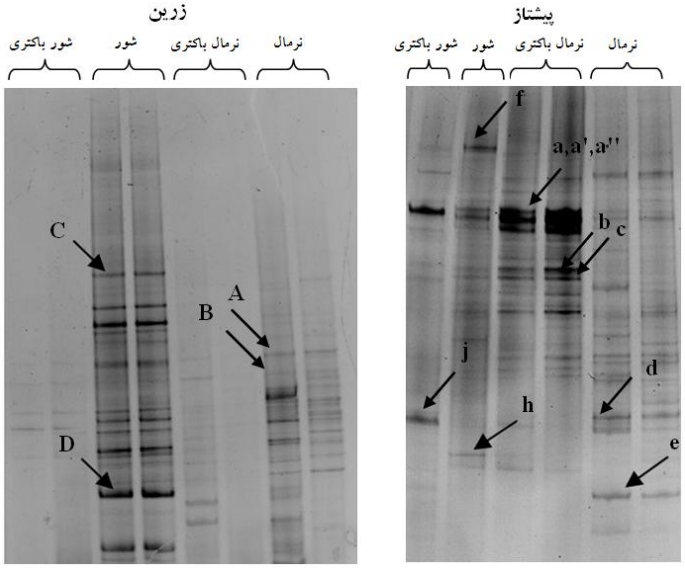
پروفایل PCR-DGGE ژن 16s rRNA باکتری‌های ریزوسفری دو رقم پیشتاز و زرین تلقیح شده و نشده با باکتری در شرایط شور و نرمال در شکل ۴ نشان داده شده است. بیش از ۱۵ باند در شرایط نرمال در اطراف ریشه هر دو رقم گندم قابل تشخیص بود که نشان دهنده حضور تعداد قابل توجهی از گونه‌های مختلف باکتری‌های ریزوسفری در اطراف ریشه است. افزایش قابل توجه باندهای a،a'،a"، b وc در پروفایل ریزوسفر رقم پیشتاز تلقیح شده با باکتری و کاهش دو باند d و e نشان داد که باکتری استرپتومایسس پس از استقرار در اطراف ریشه گیاه فلور میکروبی ریزوسفر را تحت تأثیر قرار داده است. نتایج آنالیز DGGE تأثیر تنش شوری بر فلور میکروبی رایزوسفر را نیز نشان داد. افزایش باندهای a،a'، f و h در شرایط تنش به خوبی نشان دهنده این تأثیر است. تلقیح گیاه با باکتری توام با تنش شوری تأثیر بیشتری بر فلور ریزوسفر داشت. تعداد باندهای تکثیر شده در این تیمار نسبت به حالت نرمال به شدت کاهش پیدا کرد. در صورتیکه افزایش در باندهای 'a و j به خوبی مشاهده شد. این نتایج نشان داد تلقیح باکتری و تنش شوری و تلفیق توام این دو تیمار تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر فلور ریزوسفری این رقم گندم داشت. نتایج آنالیز DGGE رقم زرین نشان داد که تلقیح گیاه با باکتری فلور ریزوسفری را در شرایط شور و نرمال به شدت کاهش داد. باندهای A و B با وجود کاهش در تیمارهای باکتری از معدود باندهای ثابت در تمامی تیمارها بود. افزایش دو باند C و D در تیمار شوری نشان داد که احتمالا گونه‌هایی از باکتری‌های موجود در فضای رایزوسفری شور پسند هستند و تنها در این شرایط فرصت مشاهده اثار آن‌ها وجود دارد.




شکل ۲. تأثیر عصاره آبی ریشه دو رقم گندم نان (پیشتاز و زرین) بر رشد (وزن تر و خشک) و جمعیت باکتری *S. rimosus* C-2012 (cfu)
تیمارهایی که با حروف یکسان نشان داده شده‌اند بر اساس آزمون دانکن در سطح p< ۰/۰۵ دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند.




شکل ۳. کاهش بهم پیوستگی توده‌های میسلیومی در کشت مایع باکتری *S. rimosus* C-2012.
A) تیمار شاهد B) تیمار عصاره آبی ریشه گندم رقم پیشتاز




شکل ۴. پروفایل DGGE ژن 16S rRNA در ریزوسفر دو رقم گندم پیشتاز و زرین تلقیح شده با باکتری *S. rimosus* C-2012 در شرایط نرمال (بدون تنش) و تنش شوری

**بحث و نتیجه‌گیری**

تحریک رشد توسط استرپتومایسس‌ها بر روی گیاهان مختلف شامل گوجه فرنگی (El-Tarabily, 2008) گندم (Sadeghi *et al.,* 2012) برنج (Gopalakrishnan *et al.,* 2014) لوبیا (Nassar *et al.,* 2003) و نخود (Tokala *et al.,* 2002) گزارش شده است. در مطالعات قبلی تأثیر تیماری باکتری *S. rimosus* C-2012 بر افزایش جوانه زنی، ارتفاع، وزن خشک اندام هوایی و ریشه گندم نان (رقم چمران) در شرایط نرمال و افزایش ارتفاع و وزن خشک اندام هوایی در شرایط شوری مشاهده شد (Sadeghi *et al.,* 2012). همچنین خصوصیات محرک رشدی این باکتری شامل انحلال فسفات معدنی، ایندول استیک اسید و سیدروفور نه تنها در شرایط نرمال بلکه در حضور نمک نیز گزارش شده بود. پاسخ متفاوت ارقام مختلف گندم به این باکتری در مطالعه حاضر می‌تواند نشان دهنده وجود مکانیسم‌های دیگری غیر از کارآیی باکتری و خصوصیات محرک رشدی آن جهت افزایش عملکرد گیاه پس از تلقیح با باکتری‌های محرک رشد باشد.

همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود تأثیر مثبت باکتری بر صفات رشدی رقم پیشتاز در شرایط نرمال و شوری بیشتر از رقم زرین است. این اثر متفاوت در شرایط نرمال بر اندام‌های هوایی و در شرایط شوری بر ریشه مشاهده می‌شود. اگر چه تفاوت تأثیر محرک رشدی استرپتومایسس‌های مختلف بر یک رقم گندم در مطالعه حاضر (شکل ۱) و مطالعات دیگر (Jog *et al.,* 2014) گزارش شده است اما مکانیسم‌هایی که موجب پاسخ متفاوت ارقام مختلف گندم به یک استرپتومایسس محرک رشد می‌شود هنوز ناشناخته است. توانایی متفاوت استرپتومایسس‌ها برای تحریک رشد گیاه را می‌توان به میزان کارآیی آن‌ها در رابطه با آزادسازی آهن و فسفات و یا تولید هورمون‌هایی مانند اکسین در اطراف ریشه و یا بر روی آن نسبت داد. اما درک رابطه متقابل گیاه و پاسخ آن به یک باکتری محرک رشد نیازمند شناخت مکانیسم‌های دیگری نیز است. مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر (Broeckling *et al.,* 2008) ثابت کرد که دو گونه گیاهی مدل شامل *Medicago truncatula* و *Arabidopsis thaliana* قادرند جمعیت قارچ‌های مقیم را در اطراف خود حفظ کنند در صورتیکه این تأثیر را بر قارچ‌های غیر مقیم ندارند. این تجربه نشان می‌دهد که ترشحات ریشه قادر به تنظیم برخی از جمعیت‌های میکروبی خاک هستند. در همین راستا محققین دیگر (Micallef *et al.,* 2009) نشان دادند که جمعیت‌های میکروبی تحت تأثیر ترشحات ریشه هستند و هر گونه و یا حتی لاین *A. thaliana* با جمعیت باکتریایی مجزا و منحصر به فردی برای خود مرتبط است. این مطلب که ریشه گیاهان به طور انتخابی مواد ارگانیکی را برای جذب باکتری‌های مفید ریزوسفری ترشح می‌کنند توسط محققین گزارش شده است (Rudrappa *et al.,* 2008).

در این مطالعه عصاره آبی ریشه گیاه موجب افزایش معنی‌دار جمعیت باکتری (cfu) شد. اگر چه تأثیر عصاره ریشه رقم پیشتاز بیشتر از رقم زرین بود اما نتایج نشان داد به طور کلی عصاره آبی ریشه جمعیت باکتری را در محیط کشت در حضور و عدم حضور نمک افزایش داد (شکل ۲). با توجه به آنکه وزن تر و خشک باکتری در تیمار عصاره ریشه در حضور و عدم حضور نمک کمتر از شاهد (محیط بدون عصاره ریشه بود) افزایش جمعیت باکتری از طریق افزایش رشد زیست توده و سنتز یا تجمع مواد آلی نبود. مشاهدات میکروسکوپی (شکل ۳) نشان داد عصاره ریشه پیوستگی توده میسلیوم‌های رویشی باکتری را کاهش داده و آن را به قطعات کوچک تبدیل کرده است. از آنجا که هر قطعه میسلیومی می‌تواند مانند یک سلول مجزا یک کلنی بسازد لذا علت افزایش cfu در تیمارهای حاوی عصاره ریشه را می‌توان به این خصوصیت عصاره ریشه نسبت داد. اگر چه علت قطعه قطعه شدن میسلیوم‌های باکتری در تیمارهای حاوی عصاره ریشه مشخص نیست اما تأثیر عصاره ریشه رقم پیشتاز بر افزایش جمعیت باکتری بیش از رقم زرین بود. مطالعات بیشتر جهت درک رابطه گیاه و باکتری *S. rimosus* C-2012 لازم است. بررسی‌های مولکولی به ویژه در سطح بیان ژن می‌تواند علل پاسخ متفاوت دو رقم گندم به این باکتری را که صفات محرک رشدی آن ثابت شده است نشان دهد. در مطالعه‌ای که بر روی پاسخ متفاوت دو رقم نیشکر Chunee و SP70-1143 به باکتری محرک رشد *Gluconacetobacter diazotrophicus* انجام شد (Lery *et al.,* 2011) نتایج نشان داد که رقم اول بر عکس رقم دوم نسبت به باکتری محرک رشد پاسخ مثبت نشان نداد. بررسی پروتئوم اندام‌های هوایی نشان داد در رقم SP70-1143 پس از تیمار با باکتری بیان پروتئین‌های مربوط به مقاومت به استرس و انتقال پیام که در کلونیزاسیون باکتری نقش دارند افزایش

پیدا کرده است. در حالیکه مکانیسم‌های تخصصی مربوط به پاسخ دفاعی در برابر باکتری در این رقم دیده نشد. بر عکس، در رقم Chunee بیان پروتئین‌های مربوط به پاسخ‌های دفاعی گیاه افزایش پیدا کرد. به عبارتی رقم SP70-1143 باکتری محرک رشد *G. diazotrophicus* را به عنوان یک عامل مفید و رقم Chunee آن را به عنوان یک عامل غیرمفید که باید با آن مقابله شود شناسایی کرد.

بر اساس نتایج PCR-DGGE تنوع ژن 16S rRNA ریزوسفری با افزودن باکتری و یا نمک به خاک تغییر کرد. پروفایل ژنی حاصل در رایزوسفر ارقام مختلف گندم نیز متفاوت بود. افزایش و یا کاهش باکتری های ریزوسفری می‌تواند نقش به سزایی در رابطه با رشد و نمو گیاه در شرایط تنش و نرمال باشد. کاهش جمعیت میکروبی در رایزوسفر گندم رقم زرین پس از تیمار با باکتری استرپتومایسس در مقایسه با رقم پیشتاز می‌تواند عاملی توجیه کننده برای عدم پاسخ مثبت این گیاه به باکتری محرک رشد باشد. تغییر فلور میکروبی گیاه برنج در شرایط استرس و غلبه برخی جنس‌های باکتریایی در تنش شوری که توسط محققین دیگر گزارش شده است (Lucas *et al.,* 2013) نتایج حاصل از این مطالعه را تائید می‌کند.

## REFERENCES


Austrian R (1960) The Gram stain and the etiology of lobar pneumonia, an historical note. Bacteriol. Rev. 24: 261-265.

Bacilio M, Rodriguez H, Moreno M, Hernandez JP, Bashan Y (2004) Mitigation of salt stress in wheat seedlings by a *gfp*-tagged *Azospirillum lipoferum*. Biol. Fert. Soils. 40: 188-193.

Basilio A, Gonzalez I, Vicente MF, Gorrochategui J, Cabello A, Gonzalez A, Genilloud O (2003) Patterns of antimicrobial activities from soil Actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. J. Appl. Microbiol. 95: 814–823.

Broeckling CD, Broz AK, Bergelson J, Manter DK, Vivanco JM (2008) Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. Appl. Environ. Microbiol. 74: 738-744.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu JK (2005) Understanding and improving salt tolerance in plants. Crop Sci. 45: 437-448.

El-Tarabily KA (2008) Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growthby rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing Streptomycete actinomycetes. Plant Soil. 308: 161-174.

Gopalakrishnan S, Vadlamudi S, Bandikinda P, Sathya A, Vijayabharathi R, Rupela O, Kudapa H, Katta K, Varshney RK (2014) Evaluation of *Streptomyces* strains isolated from herbal vermicompost for their plant growth-promotion traits in rice. Microbiol. Res. 169: 40-48.

Jog R, Pandya M, Nareshkumar G, Rajkumar S (2014) Mechanism of phosphate solubilization and antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from wheat roots and rhizosphere and their application in improving plant growth. Microbiol. 160: 778-788.

Karimi E, Sadeghi A (2015) Study on optimum growth condition and designing formulation for increasing shelf life of *Streptomyces rimosus* strain C-2012 as biocontrol agent. Biol. J. Microorganism. 4: 109-122.

Karimi E, Sadeghi A, Abbaszade Dehajib P, Dalvanda Y, Omidvarib M, Kakuei Nezhad M (2012) Biocontrol activity of salt tolerant *Streptomyces* isolates against phytopathogens causing root

rot of sugar beet. Biocontrol. Sci. Technol. 22: 333-349.

Killhamt K, Firestone MK (1984) Proline transport increases growth efficiency in salt stressed *Streptomyces griseus*. Appl. Environ. Microbiol. 48: 239-241.

Killhamt K, Firestone MK (1984) Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomycetes indigenous* to saline soils. Appl. Environ. Microbiol. 47: 301-306.

Lery LMS, Hemerly AS, Nogueira EM, Von Krüger WM, Bisch PM (2011) Quantitative proteomic analysis of the interaction between the endophytic plant-growth-promoting bacterium *gluconacetobacter diazotrophicus* and sugarcane. Mol. Plant-Microbe Interact. 24: 562-576.

Lucas JA1, Garcia-Villaraco A, Ramos B, García-Cristobal J, Algar E, Gutierrez-Manero J (2013) Structural and functional study in the rhizosphere of *Oryza sativa* L. plants growing under biotic and abiotic stress. J. Appl. Microbiol. 115: 218-35.

Malin G, Lapidot A (1996) Induction of synthesis of tetrahydropyrimidine derivatives in *Streptomyces* strains and their effect on *Escherichia coli* in response to osmotic and heat stress. J. Bacteriol. 178: 385-395.

Mayak S, Tirosh T, Glick BR (2004) Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant Physiol. Biochem. 42: 565-572.

Micallef SA, Shiaris MP, Colon-Carmona A (2009) Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. J. Exp. Bot. 60: 1729-1742.

Nassar AH, El-Tarabily KA, Sivasithamparam K (2003) Growth promotion of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a polyamine-producing isolate of *Streptomyces griseoluteus*. Plant Growth Reg. 40: 97-016.

Pastor JM, Salvador M, Argandoña M, Bernal V, Reina-Bueno M, Csonka LN, Iborra JL, Vargas C, Nieto JJ, Canovas M (2010) Ectoines in cell stress protection: Uses and Biotechnological Production. Biotech. Adv. 28: 782-801.

Prabhu J, Schauwecker F, Grammel N, Keller U, Bernhard M (2004) Functional expression of the ectoine hydroxylase gene (*thpD*) from *Streptomyces chrysomallus* in *Halomonas elongata.* Appl. Environ. Microbiol. 70: 3130-3132.

Rai M, Pal M, Sumesh KV, Jain V, Sankaranarayanan A (2006) Engineering for biosynthesis of ectoine (2-methyl 4-carboxy tetrahydro pyrimidine) in tobacco chloroplasts leads to accumulation of ectoine and enhanced salinity tolerance. Plant Sci. 170: 291-306.

Rudrappa T, Czymmek KJ, Pare PW, Bais HP (2008) Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. Plant Physiol.148:1547-1556.

Sadeghi A, Karimi E, Dahaji PA, Javid MG, Dalvand Y, Askari H (2012) Plant growth promoting activity of an auxin and siderophore producing isolate of *Streptomyces* under saline soil conditions. World J. Microbiol. Biotechnol. 28: 1503-1509.

Sadeghi A, Soltani BM, Salehi Jouzani G, Hadavand H, Khayam Nekouei M, Sadeghizadeh M (2014) Diversity of the ectoines biosynthesis genes in salt tolerant *Streptomyces* and evidence for inductive effect of ectoines on their accumulation. Microbiol. Res. 169: 699-708.

Saito A, Ikeda S, Ezura H, Minamisawa K (2007) Microbial community analysis of the phytosphere using culture-independent methodolofies. Microbes Environ. 22:

93-105.

Talibart R, Jebbar M, Gouesbet G, Himdi-Kabbab S, Wroblewski H, Blanco C, Bernard T (1994) Osmoadaptation in Rhizobia: Ectoine induced salt tolerance. J. Bacteriol. 176: 5210-5217.

Tokala RK, Strap JL, Jung CM, Crawford DL, Salove MH, Deobald LA, Bailey JF, Morra MJ (2002) Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). Appl. Environ. Microbiol. 68: 2161-2171.

Tresner HD, Hayes JA, Backus EJ (1968) Differential tolerance of *Streptomycetes* to sodium chloride as a taxonomic aid. Appl. Microbiol. 16: 1134-113.