نشریه علمی پژوهشی دانش کشاورزی و تولید پایدار
جلد ۳۲ شماره۱ / سال ۱۴۰۱ صفحات ۱۸۵-۱۷۵

Isolation and Identification of Halophilic Bacteria from Saline Soils and their effect on Salinity Tolerance at Wheat Seedling Stage

Afsaneh Fallahi[1], Reza Khakvar*[2], Ali Bandehagh[3]

Received: 21 February 2021 Accepted: 19 September 2021
1-Ex-Master Student of Plant Pathology, Plant Protection Dept. Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
2-Assoc. Prof., Plant Protection Dept. Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3-Assoc. Prof., Dept. of Plant Breeding and Biotechnology, University of Tabriz, Iran.
*Corresponding Author Email: khakvar@gmail.com

Abstract:
Objectives: This study was performed to find halophilic bacteria that have the ability to increase salinity resistance in wheat seedlings, so that any type of wheat cultivar can be grown in saline areas by inoculation with these bacteria without the need for genetic manipulation.

Materials and Methods: A number of highly saline farm soils from several areas around Tabriz and Urmia Lake were screened to isolate bacterial isolates. A total of six highly halophilic isolates were isolated for the study. The effect of bacteria on salinity tolerance in wheat was determined as factorial of two factors (salinity and bacteria) based on a randomized complete block design with three replications. The effect of six bacterial isolates at three high concentrations of salt (NaCl) (0.5, 1, and 1.5%) on wheat seed growth under standard laboratory conditions for four weeks was evaluated. Two bacterial isolates that had the best performance - in most growth indices such as fresh and dry size and weight of roots and stems - were selected and their effect was assayed under greenhouse conditions. Finally, the best bacteria in terms of function were selected and identified by molecular methods

Results: From the six highly halophilic bacterial isolates, two bacteria were selected for greenhouse studies, one of which, caused a 50% increase in most growth factors, was selected for identification. Molecular identification based on barcoding 16S rDNA region showed that this bacterium belongs to *Oceanbacillus picturae* with 99% probability.

Conclusion: This is the first report of the presence of *Oceanbacillus picturae* in the soils of Azerbaijan and also the first report of the ability of this bacterium to enhance salinity resistance in wheat seedlings in the world. The nativeness, rapid and easy growth of this bacterium in the saline media and soils of Azerbaijan raises the hope that by inoculating wheat seeds with this type of bacterium at a low cost, natural resistance to salinity can be created in wheat seedlings.

Keywords: Halophile, Induce Resistance, Urmia Lake, *Oceanbacillus picturae*, PCR

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مقاوم به شوری از خاک‌های شور و بررسی اثر آنها بر ایجاد مقاومت به شوری در مرحله گیاهچه‌ای گندم

افسانه فلاحی[۱]، رضا خاک ور[۲*]، علی بنده حق[۳]

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۲۸

۱-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۲-دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
۳-دانشیار گروه به نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
*مسئول مکاتبه: Email: khakvar@gmail.com

چکیده

اهداف: این تحقیق به منظور یافتن باکتری‌های شورپسند جهت بالا بردن مقاومت به شوری در گیاهچه گندم انجام گردید تا بتوان توسط این باکتری‌ها بدون نیاز به دستکاری ژنتیکی، هر نوع رقم گندم را در مناطق شور کشت و پرورش داد.

مواد و روش‌ها: شماری از خاک مزارع بسیار شور چند منطقه در اطراف تبریز و دریاچه ارومیه برای جداسازی جدایه‌های باکتریایی غربال‌گری شدند. در مجموع شش جدایه به شدت شورپسند برای انجام پژوهش انتخاب شد، آزمایش بررسی تاثیر باکتری‌ها بر ایجاد تحمل به شوری در گندم بصورت فاکتوریل با دو فاکتور (شوری و باکتری) بر پایه‌ی طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام گردید. اثر شش جدایه باکتریایی در سه غلظت بالای نمک (NaCl) (نیم، یک و یکم و نیم درصد نمک) بر روی رشد بذور گندم در شرایط استاندارد آزمایشگاهی طی مدت چهار هفته مورد ارزیابی قرار گرفت. دو جدایه باکتریایی که بهترین عملکرد را – در اکثر شاخص‌های رشدی نظیر اندازه و وزن تر و خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه – داشتند انتخاب و در شرایط گلخانه تاثیر آن مورد آزمایش قرار گرفت. در نهایت بهترین باکتری از لحاظ عملکرد انتخاب و به روش مولکولی مورد شناسایی قرار گرفت

یافته‌ها: از بین شش جدایه باکتری بسیار شورپسند جداسازی و آزمایش شده، دو باکتری برای مطالعات گلخانه ای انتخاب گردید که یکی از آن‌ها که باعث افزیش ۵۰ درصدی در اکثر فاکتورهای رشدی شده بود. شناسایی با روش مولکولی مبتنی بر بارکدینگ ناحیه 16S rDNA نشان داد که این باکتری با احتمال ۹۹٪ متعلق به گونه *Oceanbacillus picturae* می باشد.

نتیجه‌گیری: این اولین گزارش از وجود باکتری *Oceanbacillus picturae* در خاک‌های آذربایجان و همچنین اولین گزارش از توان این باکتری در ایجاد مقاومت به شوری در گیاهچه گندم در دنیا می‌باشد. بومی بودن و رشد سریع و راحت این باکتری در محیط کشت و خاک های شور آذربایجان این امید را ایجاد می کند که بتوان با هزینه‌ی کم با تلقیح بذور گندم با این نوع باکتری یک نوع مقاومت طبیعی به شوری در گیاهچه‌های گندم ایجاد کرد.

واژه های کلیدی: شورپسند، القا مقاومت، دریاچه ارومیه، PCR، *Oceanbacillus picturae*

مقدمه

تنش‌های غیرزیستی مهم‌ترین عوامل محیطی هستند که با تاثیر بر فرآیندهای مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی نقش مهمی در تعیین پتانسیل عملکرد و تولید گیاهان دارند (پساراکلی ۲۰۱۴، توته‌جا و ژیل ۲۰۱۲). شوری بعد از خشکی، مهم‌ترین و گسترده‌ترین مشکل کشاورزی در اکثر مناطق دنیا به‌خصوص خشک و نیمه خشک جهان محسوب می-شود و کشور ایران با داشتن بین ۲۳ الی ۳۴ میلیون هکتار زمین شور، بعد از روسیه، چین، هندوستان و پاکستان، دارای بیشترین سطح خاک‌های شور در آسیا می‌باشد (جعفری ۲۰۱۳). از نظر میزان حساسیت به شوری زیاد خاک، گیاه گندم با نام علمی (*Triticum aestivum* L.) بخصوص در مرحله رویشی از جمله گیاهان حساس محسوب می‌گردد؛ به همین دلیل شناسایی و ایجاد راه حل‌های مناسب برای رشد این گیاه در مناطق شور اهمیت فراوان دارد. تنش شوری نه تنها باعث تفاوت معنی‌داری در ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و زیست توده کل و تعداد گره در گیاهان زراعی می‌شود، بلکه باعث افزایش حساسیت گیاهان به انواع آفات و بیماری‌ها نیز می گردد (کوک و وسس ۱۹۹۱).

گیاه گندم خود به طور طبیعی راهکارهای متفاوتی برای مقابل با شوری کم دارد که با مطالعه و شناخت آن‌ها و افزایش مصنوعی آن‌ها، می‌توان توان طبیعی گیاه گندم را برای مقابله با شوری افزایش داد. یکی از مکانیسم های طبیعی گیاه گندم برای مقابله به تنش‌های محیطی (خشکی و شوری) و بیولوژیک (آفات و بیماری‌ها) ایجاد همزیستی درونی (Endophyte) با میکروارگانیسم‌های مختلف و استفاده از توان ذاتی این همیاران در مقابله به شرایط سخت می‌باشد (دیمکپا و همکاران ۲۰۰۹). باکتری‌های هم‌زیست و اندوفیت با تولید انواع مختلفی از متابولیت‌ها –نظیر هورمون‌های گیاهی، سیدرفور و ...– می‌توانند قدرت تحمل گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی را افزایش دهند، لذا جستجو و یافتن چنین میکروارگانیسم‌های در اولویت تحقیقاتی موسسات کشاورزی قرار دارد (وایشناو و همکاران ۲۰۱۹، لودویکاکس و همکاران ۲۰۲۰، دویرس و همکاران ۲۰۲۰). یکی از شایع‌ترین تنش‌ها، تنش ناشی از شوری خاک است، املاح و عناصر مختلفی در خاک ممکن است باعث بالا رفتن درجه شوری خاک و به تبع آن باعث ایجاد مشکلات مختلف برای گیاهان در جذب آب و املاح گردند. یکی از فراوان‌ترین املاح ناشی از شوری کلرید سدیم (NaCl) می باشد که در خاکهای منطقه به فراوانی و در درصدهای بالا یافت می شود. با توجه به اینکه گیاه گندم یک محصول استراتژیک برای ایران محسوب شده و خود کفایی در تولید آن از اهداف عمده‌ی کشور می‌باشد؛ لذا یافتن روش‌های نوینی که بتوانند برای کاهش حساسیت گندم به شوری زیاد خاک ناشی از کلرید سدیم استفاده گردند از توصیه شده ترین اقدامات و تلاش های وزارت کشاورزی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای جمع‌آوری باکتری‌های شورپسند نمونه‌های مختلف خاک از عمق ۵ تا۳۰ سانتی متری خاک از مناطق بسیار شور اطراف تبریز (جاده اهر) و خاک‌های اطراف دریاچه ارومیه (جزیره اسلامی) در تابستان سال ۱۳۹۸ جمع‌آوری گردید. این خاک‌ها عموماً بایر و فاقد زراعت خاصی بوده و فقط پوشش تنک علف‌های هرز داشتند. هدایت الکتریکی (EC) همه ی نمونه های خاک جمع‌آوری شده بالای ۲۵ dS/m بود و وجود غلظت‌های بالایی از کلرید سدیم در این خاک‌ها توسط آزمایشگاه خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تایید شده بود. نمونه‌های خاک در داخل کیسه‌های نایلونی بلافاصله به آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه تبریز انتقال یافتند و در دمای ۴ درجه ی سانتی گراد در داخل یخچال نگهداری شدند. به منظور جداسازی باکتری‌های موجود در خاک، از روش کشت مستقیم (رقیق سازی) استفاده شد. نمونه‌های خاک با بهره‌گیری

از روش سری‌های رقت تا غلظت 10^{-8} رقیق سازی و سپس در محیط کشت آماده نوترینت آگار(NA) حاوی ۱۵ درصد نمک (NaCl) (شرایط شوری بسیار بالا) کشت داده شدند (شاد و همکاران ۲۰۰۱) بعد از چند روز مهلت دادن به باکتری‌ها برای رشد، کلونی‌های متفاوت مشاهده شده داخل پتری، انتخاب شده و در داخل محیط کشت نوترینت آگار حاوی ۱۰ درصد نمک به صورت خطی کشت داده شدند. پس از رشد، تک کلونی‌ها مجددا به محیط کشت جدید که همان نوترینت آگار حاوی ۱۰ درصد نمک بود، منتقل شدند و برای رشد و تکثیر در انکوباتور(با دمای ۲۶ الی ۲۷ سانتی گراد) قرار داده شدند. باکتری‌های شورپسند رشد کرده از محیط جداسازی و کشت خالص سازی گردیده و در داخل گلیسرول (به منظور نگهداری طولانی مدت) در دمای منفی ۲۰ درجه تا زمان انجام آزمایشات اصلی نگهداری شدند.

شکل ۱- نواحی نمونه برداری شده از خاک برای جمع‌آوری باکتری‌های شورپسند

برای آزمایش توان باکتری‌های جمع‌آوری شده در افزایش تحمل به شوری در گندم؛ ابتدا بذرهای گندم رقم امید (بعنوان متداول ترین رقم گندم در شمال‌غرب ایران و حساس به شوری) در آب مقطر خیسانده و ابتدا با سم بنومیل در غلظت دو در هزار و سپس با الکل ۹۵٪ و محلول هیپوکلریت سدیم هر کدام به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سه سطح شوری (نیم، یک و ۱/۵ درصد نمک (NaCl)) برای آزمایش انتخاب گردید (مایاک و همکاران ۲۰۰۴). در داخل جعبه‌های پلاستیکی (۳۰×۱۵×۱۵ سانتی متری) استریل مفروش با کاغذ صافی، تعداد ۵۰ عدد از بذر (بعنوان یک تکرار از یک تیمار) قرار داده شد. سپس به هر ظرف به میزان ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه باکتریایی به غلظت 10^{6} سلول در میلی لیتر اضافه، پس ۱۵ ساعت و اطمینان از خیس شدگی کامل بذور با باکتریها (اطمینان از آغشتگی بذر با باکتری) ظروف با سه سطح آب شور آبیاری و در شرایط استریل در دمای ۲۵ درجه نگهداری شد. برای تهیه غلظت‌های مناسب باکتری از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل UV-3600 Plus) در طول موج ۶۵۰ نانومتر استفاده گردید (شاد و همکاران ۲۰۰۱). به منظور جلوگیری از خشک شدن سطح کاغذ صافی داخل ظروف پلاستیکی، هر روز دوبار اندکی آب

مقطر به تیمارهای های شوری تهیه شده اضافه گردید. بذرها به مدت چهار هفته در داخل ظروف، روند رشدی خود را طی کردند. پس از پایان دو هفته اندازه گیری-هایی از طول ساقه چه و ریشه چه (بلند ترین ساقه چه به عنوان ساقه چی اصلی و میانگین اندازه سه ریشه چه ی بلند به عنوان معیار اندازه گیری در نظر گرفته شد) و همچنین وزن تر و خشک ساقه چه و ریشه چه ی بذور رشد یافته صورت گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی پیاده و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن انجام شد.

به منظور بررسی گلخانه ای توان باکتری‌ها برای القای مقاومت به شوری – بر اساس نتایج آزمایشگاهی – از بین شش جدایه استفاده شده، تنها دو جدایه باکتریایی که در آزمایشگاه توان القای مقاومت به شوری خوبی از خود نشان داده بودند برای بررسی گلخانه‌ای انتخاب گردیدند. آزمایش در گلخانه تحقیقاتی گروه گیاه پزشکی دانشگاه تبریز انجام گرفت. مراحل تهیه تیمارها در گلخانه نیز مانند کار در آزمایشگاه بود، با این تفاوت که در گلخانه برای اطمینان از آغشته شدن کامل بذور گندم به جدایه‌های باکتری، بذور به مدت ۳۰ دقیقه قبل از کاشت در گلدانها، در داخل سوسپانسیون باکتریایی قرار گرفتند. در بررسی گلخانه ای نیز آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار و مقایسه میانگین تیمارها به روش دانکن انجام شد. جدایه ی باکتریای که بطور معنی داری در فاکتورهای مختلف رشدی گیاه گندم تحت شوری باعث افزایش شده بود انتخاب و برای شناسایی مورد آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی قرار گرفت.

برای شناسایی جدایه‌ی باکتریایی منتخب از آغازگرهای عمومی 8F و 1492R استفاده شد. این جفت آغازگرهای عمومی برای تشخیص باکتری‌ها بر اساس جایگاه هدف ناحیه 16S rDNA طراحی شده بودند (شاد و همکاران ۲۰۰۱). بدین منظور، تکثیر ناحیه کدکننده 16S rRNA در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر و با برنامه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه در یک تکرار، برنامه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه و ۴۵ ثانیه در ۳۵ تکرار و سرانجام مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه در یک تکرار انجام گردید (اینترا و همکاران ۲۰۱۱). قطعه ۱۴۰۰ جفت بازی حاصل از جفت آغازگرهای 8F & 1492R جهت شناسایی و توالی‌یابی به شرکت دانش بنیان توپاز ژن کاوش فرستاده شد. نتایج حاصل از توالی یابی در وب سایت NCBI بارگذاری شده و با داده‌های توالی نوکلئوتیدی موجود در بانک ژن مقایسه شدند. با کمک نرم افزار Mega-X درختچه فیلوژنتیک ترسیم شد و موقعیت فیلوژنتیک و هویت گونه ی مورد نظر از طریق مقایسه با توالی جدایه‌های مرجع تایید گردید.

نتایج و بحث

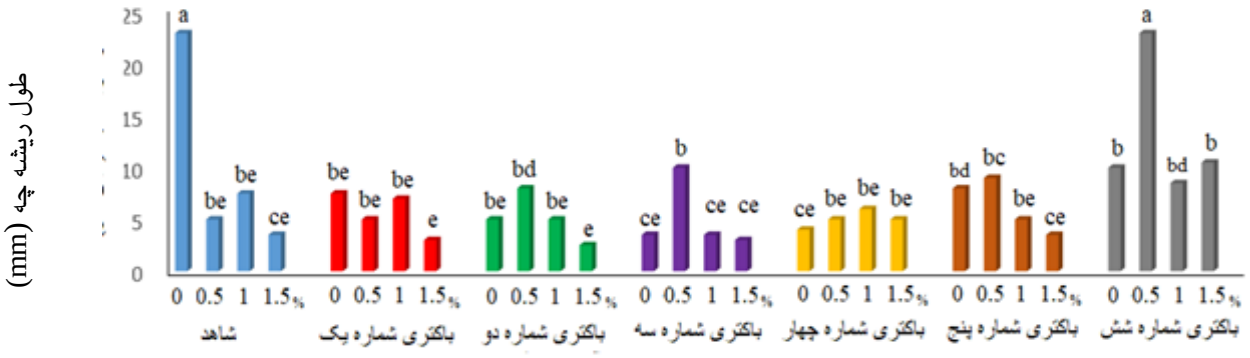
در کل ۴۲ جدایه باکتریایی که از لحاظ شکل و ظاهر کلونی متفاوت بودند و قادر به رشد در محیط کشت شور (۱۵٪ نمک) بودند از خاک‌های مورد بررسی جداسازی و خالص سازی گردید. در غربال اولیه از بین این جدایه های باکتریایی جمع‌آوری شده، فقط شش جدایه باکتریایی که تغییر مثبت در یکی از فاکتورهای رشدی گیاهچه گندم ایجاد کردند انتخاب و مابقی بعلت بی تاثیر بودن یا تاثیر منفی در رشد از ادامه بررسی حذف گردید. این شش جدایه که نسبت به شاهد بطور معنی‌داری در حداقل یکی از شاخص‌های رشدی باعث بهبود رشد گیاه گندم گردیده بودند نگهداری و با همدیگر مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج آماری حاصل از بررسی تحمل بذر امید به درصدهای شوری در حضور باکتری‌های منتخب مطابق جدول ۱ می‌باشد. جدول تجزیه واریانس که بر اساس مقایسه دانکن صورت گرفت، نشان می‌دهد که باکتری‌های شور پسند جمع آوری شده اثر معنی داری در میزان رشد بذر امید داشتند (شکل۲ و ۳) (جدول ۱).

جدول۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاهی

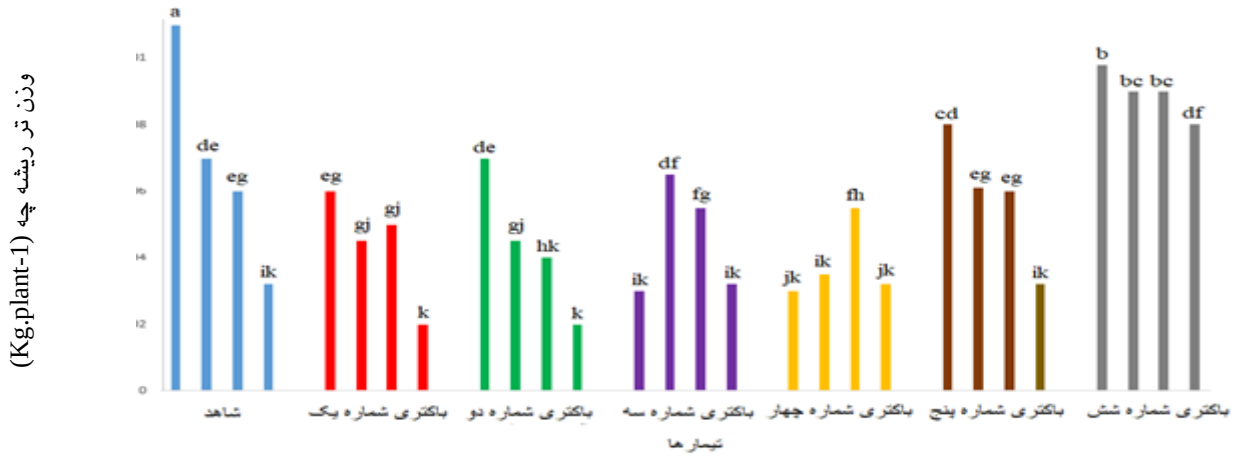
منابع تغییر	درجات آزادی	مجموع مربعات					
		طول ساقه چه	طول ریشه چه	وزن تر ساقه چه	وزن خشک ساقه چه	وزن تر ریشه چه	وزن خشک ریشه چه
تکرار	۲	۲۰/۱۵۵ ns	۱۹/۹۶۴ ns	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۰۰۱۴**	۰/۰۰۱**
شوری	۳	۱۲۰/۰۴۴**	۳۸۹/۲۷۰**	۰/۰۰۶**	۰/۰۰۰۰۲۹**	۰/۰۰۰۰۴۵**	۰/۰۰۴**
باکتری	۶	۱۱۴/۴۶۴**	۴۵۸/۱۸۷**	۰/۰۰۲**	۰/۰۰۰۰۰۹۴**	۰/۰۰۰۰۳۵**	۰/۰۰۳**
شوری×باکتری	۱۸	۵۵/۳۵۸**	۱۰۹/۷۴۲**	۰/۰۰۱**	۰/۰۰۰۰۲۶**	۰/۰۰۰۰۰۸۱**	۰/۰۰۱**
خطا	۵۴	۷/۸۳۴	۷/۸۳۴	۰/۰۰۰۰۱۲	۰/۰۰۰۰۰۱۷	۰/۰۰۰۰۰۰۱۳	۰/۰۰۰۰۱۱

ns، * و **: به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد می‌باشند.

در تحقیق حاضر شش جدایه‌ی باکتریایی جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی به بذور گندم رقم امید تلقیح شدند، از میان شش باکتری، جدایه‌ی باکتریایی MF15 بیشترین اثر را بر بهبود اکثر فاکتورهای رشدی (رشد طول ساقه چه و ریشه چه و نیز وزن تر و خشک ساقه چه و ریشه چه) از خود نشان داد(شکل ۱ و ۲).

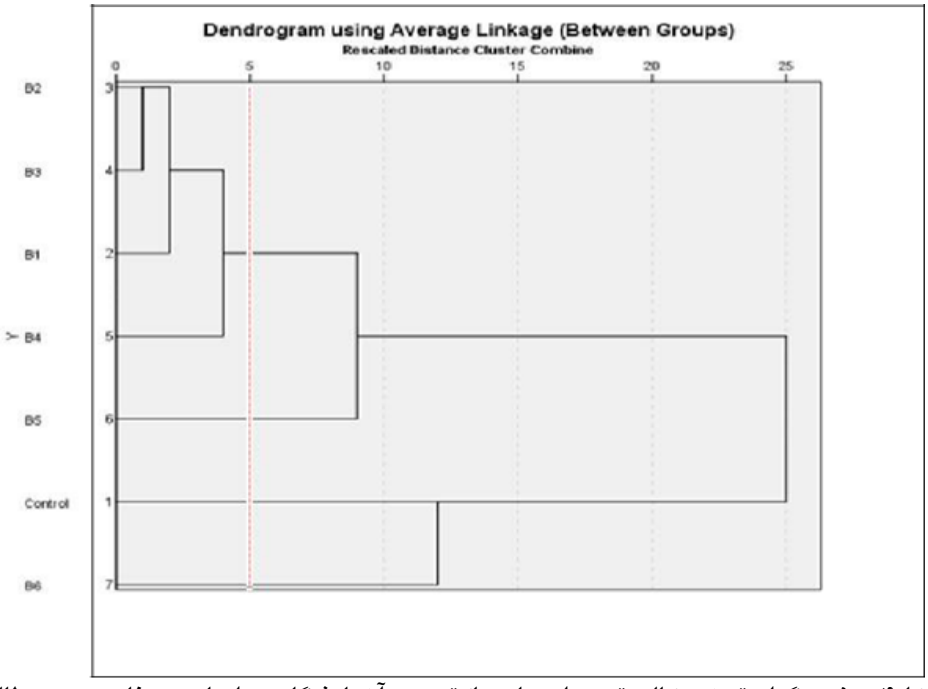


شکل۲- میزان رشد ساقه چه بذور گندم امید در حضور شش جدایه باکتری شور پسند در سه میزان مختلف شوری در شرایط آزمایشگاه



شکل۳- وزن ترریشه چه بذور گندم امید در حضور شش جدایه باکتری شورپسند در سه میزان مختلف شوری در شرایط آزمایشگاه

برای تایید انتخاب باکتری‌های منتخب برای بررسی گلخانه ای و نیز گروه بندی کلی این شش باکتری منتخب در آزمایشگاه، تجزیه کالستر به روش UPGMA (متوسط فاصله ها) با استفاده از معیار فاصله‌ی اقلیدوسی انجام گرفت. براساس این تجزیه و برش دندروگرام مربوطه، دو باکتری‌های بنام‌های شماره شش و پنج در کلاس جداگانه‌ای قرار گرفته و مابقی باکتری‌ها در یک گروه طبقه بندی شدند(شکل ۴).

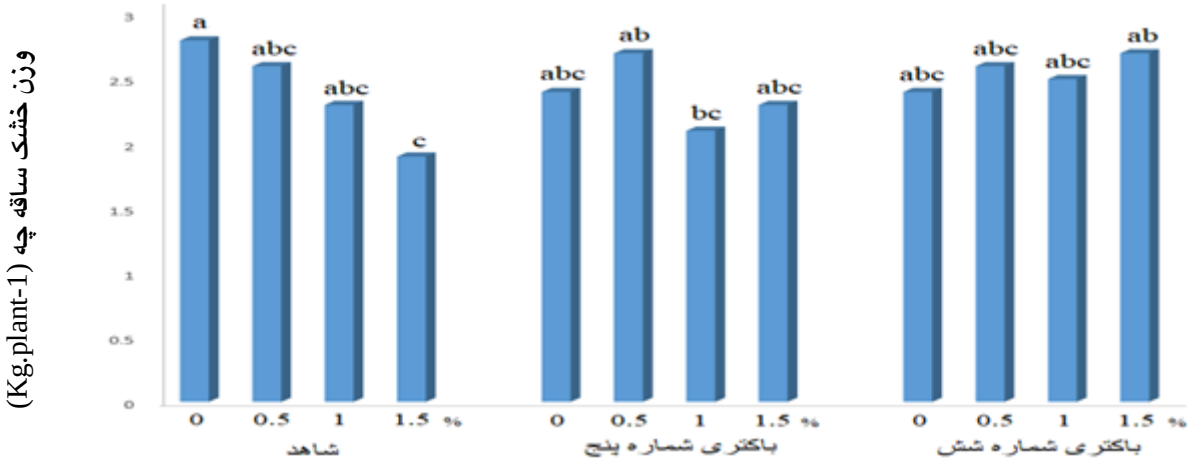


شکل۴- دندروگرام تجزیه کالستر جدایه‌های باکتری درآزمایشگاه بر اساس صفات مورد مطالعه

جدول۲- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در گلخانه

منابع تغییر	درجات آزادی	مجموع مربعات					
		طول ساقه چه	طول ریشه چه	وزن تر ساقه چه	وزن خشک ساقه چه	وزن تر ریشه چه	وزن خشک ریشه چه
تکرار	۲	۱۱۲۵۵/۰۲۸**	۲۸۸۶/۸۶۱*	۰/۰۱۶**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۰۰۱۹**	۰/۰۰۰۰۰۴۳**
شوری	۳	۷۴۶/۸۴۳ns	۲۳۹/۶۳ns	۰/۰۰۵**	۰/۰۰۰۰۲۹**	۰/۰۰۰۰۱۸**	۰/۰۰۰۰۰۱۱**
باکتری	۲	۲۶۹/۶۹۴ns	۲۹۵/۴۴۴ns	۰/۰۰۰۱*	۰/۰۰۰۰۰۹۴**	۰/۰۰۰۱**	۰/۰۰۰۰۰۴۴**
شوری*باکتری	۶	۵۰۱/۹۵۴ns	۶۸۴/۸۵۲ns	۰/۰۰۵**	۰/۰۰۰۰۲۶**	۰/۰۰۰۰۲۶**	۰/۰۰۰۰۰۱۲**
خطا	۲۲	۱۲۶۳/۳۶۱	۵۹۷/۱۶۴	۰/۰۰۰۰۲۹	۰/۰۰۰۰۰۰۱۷	۰/۰۰۰۰۰۰۱۷	۰/۰۰۰۰۰۰۰۱۲

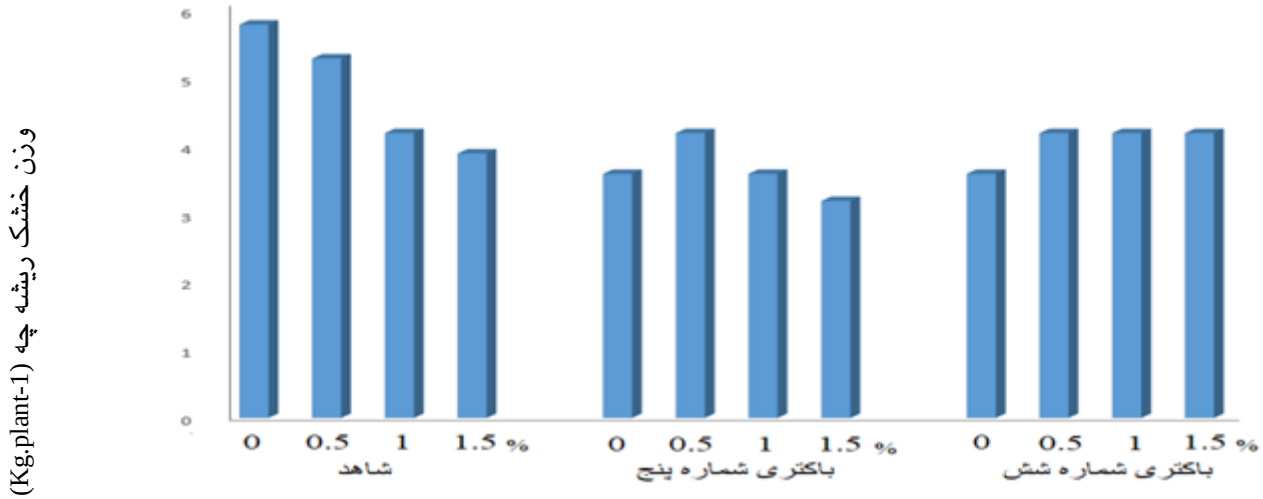
ns، * و **: به ترتیب بیانگر عدم اختلاف معنی دار و اختلاف معنی دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد میباشند



شکل۵- وزن خشک ساقه چه بذور گندم امید در حضور دو جدایه باکتری شورپسند در سه میزان مختلف شوری در شرایط گلخانه

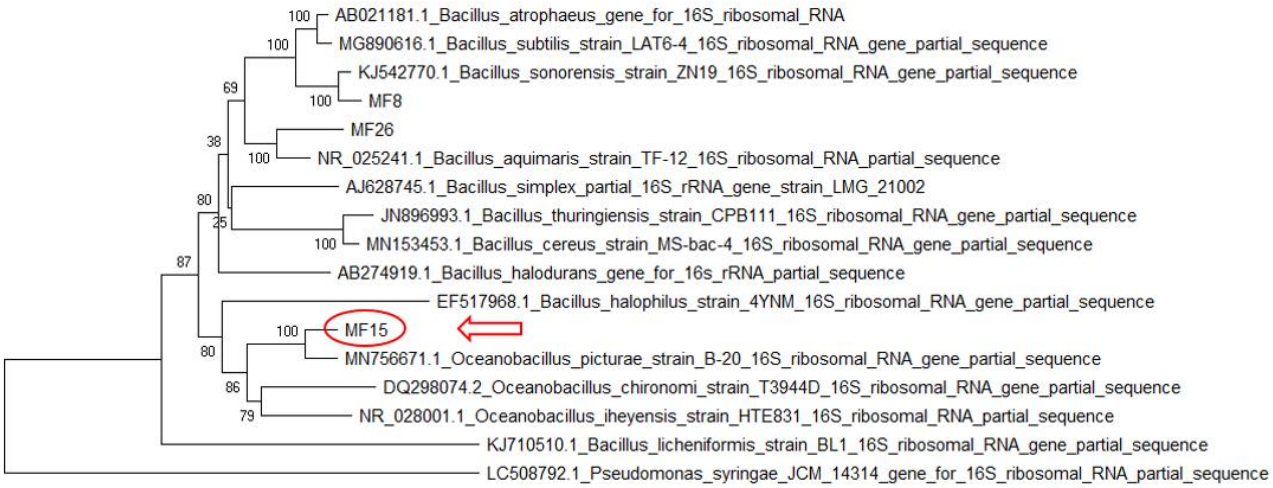
در گلخانه نیز مانند بخش آزمایشگاه، جدول تجزیه واریانس بر اساس آزمون دانکن نشان داده شده است که باکتری‌های مورد آزمایش فقط در وزن تر و خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه معنی دار شدند (جدول ۲). معنی دار شدن وزن خشک و تر در حالیکه افزایش معنا داری در طول ریشه چه و ساقه چه دیده نشد، می‌تواند بیانگر این مسئله باشد که باکتری‌ها بدون تاثیر در فنوتیپ و فیزیک گیاهان (طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه) باعث افزایش عملکرد گیاه گندم در شرایط شوری می‌شوند.

طبق جدول فوق (جدول ۲)، تنها صفات دارای اختلاف معنی‌دار که تحت تاثیر باکتری بودند عبارت بودند از: وزن تر و خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه. لذا مقایسات میانگین برای این صفات در قالب شکل‌های زیر ترسیم شد. در شرایط گلخانه‌ای و در داخل گلدان، باکتری شماره شش، هرچند از لحاظ آماری اثر معناداری بر رشد وزن تر ساقه‌چه نشان نداد، لیکن تا حدی باعث بهبود رشد گیاه گندم در شرایط شور شد. ولی در صفت وزن خشک ساقه‌چه، باکتری شماره شش حتی در شوری بسیار بالا (یک ونیم درصد) اثر معنا داری بر مقاومت گیاه به شوری از خود نشان داده است. (شکل۵). در وزن خشک ریشه‌چه تنها در بالاترین شوری (یک و نیم درصد) افزایش معنی‌دار (ده درصد) نسبت به شاهد در اثر تلقیح با باکتری شماره شش مشاهده گردید (شکل ۶).



شکل۶- وزن خشک ریشه چه بذور گندم امید در حضور دو جدایه باکتری شورپسند در سه میزان مختلف شوری در شرایط گلخانه

بر اساس نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای جدایه شماره شش به عنوان جدایه مناسب برای القای مقاومت به شوری انتخاب و مورد شناسایی مولکولی قرار گرفت. در آزمون PCR با پرایمرعمومی 16S rDNA باند واضح ۱۴۰۰ نوکلئوتیدی مشاهده و برای توالی یابی به شرکت توپاز ژن ارسال گردید. هم ردیف سازی توالی حاصل با داده‌های بانک اطلاعاتی NCBI نشان داد که با اطمینان ٪۹۹ جدایه منتخب به گونه *Oceanobacillus picturae*، تعلق داشت. بررسی روابط فیلوژنتیک توالی جدایه شماره شش و توالی های بانک اطلاعاتی با استفاده از الگوریتم تجزیه خوشه‌ای Neighbor Joining در نرم افزار Mega-X در شکل ۷ آورده شده است. در گروه‌بندی این جدایه (که با کد MF15 در درخت نشان داده شده است) با توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داده که توالی بدست آمده در این آزمایش متعلق به گونه *Oceanobacillus picturae*می تواند گروه بندی شود.



شکل۷- درخت فیلوژنتیک توالی جدایه شماره شش با توالی های بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از الگوریتم تجزیه خوشه ای Neighbor Joining با Bootstrap1000

این جدایه بعد از شناسایی مولکولی مشخص شد که به احتمال زیاد (٪۹۹) یک گونه جدید برای ایران باشد که از خاک شور اطراف استان آذربایجان‌شرقی جداسازی شد. این گونه‌ی شناسایی شده برای اولین بار جهت القای مقاومت به شوری به گیاه گندم تلقیح شد. این گونه گرم مثبت، میله ای شکل، هوازی، دارای اسپور و اندوسپور، نسبتا شورپسند میباشد.pH و دمای مناسب برای رشد این گونه به ترتیب ۷ و ۲۵ درجه سانتی گراد میباشد.

گونه *Oceanobacillus picturae* از محیط‌ها و در زمان‌های مختلف توسط محققین مختلف گزارش شده است از جمله: اورهان و گلوچه در سال(۲۰۱۴) از خاک شور ریزوسفر گیاهان در ارزوروم (Erzurum) ترکیه این گونه را جداسازی کردند. در پژوهش انجام شده توسط اورهان علاوه بر جنس *Oceanobacillus*، جنس‌های *Bacillus*، *Staphylococcus*، Halobacillus، *Zhihengliuella*، *Virgibacillus* و تعدادی جنس دیگر را جداسازی کردند که همه این جنس ها تحمل به میزان نمک زیاد را داشتند، فعالیت های آنزیمی قابل توجهی را دارا بودند و باعث بهبود چرخه مواد مغذی خاک و باروری خاک شدند. سانجای و همکاران (۲۰۱۴) این گونه را از برگ گیاهان متحمل به شوری از گوجارات (Gujarat) واقع در هندوستان جداسازی کردند، که نتایج مثبتی در تولید آمونیاک و

فعالیت فسفات محلول از خود نشان داد. روحی و همکاران در سال ۲۰۱۲ از معادن نمک در منطقه Karak واقع در پاکستان این گونه را گزارش کردند. باکتری‌های زیادی مشابه به این باکتری قبلاً بعنوان القا کننده مقاومت به شوری گزارش شده‌اند ولی این اولین گزارش برای توانایی این باکتری برای القای مقاومت به شوری می باشد. آگام بردیوا وهمکاران (۲۰۰۹) جدایه-های *Pseudomonas putida, Pseudomonas extremorientalis Pseudomonas chlororaphis and Pseudomonas aurantiaca* را از ریزوسفر گیاه گندم رشد کرده در خاک شور منطقه Syrdarya واقع در شمال شرق ازبکستان جداسازی کردند.

رامادوس و همکاران (۲۰۱۳) تعداد پنج جدایه باکتریایی که سه جدایه متعلق به جنس *Bacillus (Bacillus pumlis, Bacillus sp, Bacillus halodenitrificans)* و یک جدایه متعلق به جنس *Hallobacillus (Hallobacillus sp)* بود را از منطقه Jaisalmer واقع درکشورهندوستان جداسازی کردند. این باکتری ها شوری بیست درصد را به خوبی متحمل بودند. گونه‌های *Hallobacillus sp* و *Bacillus halodenitrificans* در شرایطی که این بذور تحت تنش شوری بودند، به میزان نود درصد باعث بهبود رشد ریشه و ۱۷/۴ درصد افزایش وزن خشک بذور گندم، شدند. تی واری و همکاران در سال ۲۰۱۱ جدایه های *Bacillus pumilus*، *Pseudomonas mendocina*، *Arthrobacter sp*، *Halomonas sp*، *Nitrinicola lacisaponensis* را از خاک‌های ریزوسفر گندم در مناطق Mau، Ghazipur، Ballia واقع در هندوستان جداسازی کردند. طبق نتایج تی واری، حداکثر طول ساقه و ریشه گیاهان تحت تنش شوری که با باکتری‌های ذکر شده تیمارشدند، در بذور مایه زنی شده شده با جدایه *B.pumilus* مشاهده شد. محتوای کل کلروفیل برگ‌ها در بذورتلقیح شده باجدایه *Halomonas sp* بیشترین مقدار را داشت و بیشترین مقدار پروتئین در بذور تیمار شده با باکتری *Arthrobacter sp* مشاهده شد. نابتی و همکاران در سال ۲۰۱۰ جدایه *Azospirillum brasilense* را از خاک شور مزرعه گندم منطقه Bejaia واقع در شمال کشور الجزایر جداسازی کردند. در گیاهان تلقیح شده با این جدایه، میزان پرولین و انباشت شکر؛ که هردو نشان های فیزیولوژیکی از گیاهان تحت تنش هستند، کاهش پیدا کرد. زهیر و همکاران در سال ۲۰۰۹، جدایه های *Pseudomonas putida*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Serratia proteamaculans* را از ریزوسفر گیاه گندم واقع در مزارع مختلف جداسازی کردند. طبق پژوهش‌های زهیر و همکاران جدایه *P. putida* بیشترین اثر را در افزایش ارتفاع گیاه، طول ریشه، عملکرد دانه در مقایسه با سایر جدایه‌های جداسازی شده از خود نشان داد. وادیائی و همکاران در سال ۲۰۱۵، تعداد هفت جدایه که شامل *Bacillus pumilus*، *B.aquimaris*، *B.arsinicus*، *B.cereus*، *B.subtilis*، *Pseudomonas mendocina*، *Arthrobacter sp* را از ریزوسفر گیاه گندم در مزارع هندوستان جداسازی کردند، که بیشترین وزن خشک ریشه و بایومس ساقه پس از تلقیح بذور با باکتری *B. aquimaris* مشاهده شد.

سپاسگزاری

این پایان نامه توسط ستاد احیای دریاه ارومیه با کد 1399-TU-001حمایت مالی شده است. نویسندگان از کارکنان و دانشجویان آزمایشگاه های باکتری شناسی گیاهی و قارچ شناسی دانشگاه تبریز کما تشکر و قدردانی را دارند.

منابع مورد استفاده

Arora S, Vanza MJ, Mehta R, Bhuva C and Patel PN. 2014. Halophilic microbes for bio-remediation of salt affected soils. African Journal of Microbiology Research, 8(33): 3070-3078.

Cook JR and Veseth RJ. 1991. Wheat Health Management. St. Paul, Minnesota.

De Vries FT, Griffiths RI, Knight CG, Nicolitch O and Williams A. 2020. Harnessing rhizosphere microbiomes for drought-resilient crop production. Science, 368(6488): 270-274.

Dimkpa C, Weinand T and Asch F. 2009. Plant–rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, Cell & Environment, 32(12): 1682-1694.

Intra B, Mungsuntisuk I, Nihira T, Igarashi Y and Panbangred W. 2011. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. BMC Research Notes, 4: 1-9

Jafari M. 2013. Salinity in Iran. Forest and Rangeland Research Institute. No.35. Tehran.

Joshi R and Bisht TS. 2019. Isolation and Screening of Lipase Enzyme from Bacterial Strains Isolated from Sambhar Lake. International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 9(5): 2321-3272.

Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ER, Taghavi S, Mezgeay M and der Lelie DV. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. Critical reviews in plant sciences, 21(6): 583-606.

Mayak S, Tirosh T and Glick BR. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. Plant physiology and Biochemistry, 42(6): 565-572.

Nabti E, Sahnoune M, Ghoul M, Fischer D, Hofmann A, Rothballer M, Schmid M and Hartmann A. 2010. Restoration of growth of durum wheat (*Triticum durum* var. waha) under saline conditions due to inoculation with the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* NH and extracts of the marine alga *Ulva lactuca*. Journal of Plant Growth Regulation, 29(1), 6-22.

Orhan F and Gulluce M. 2015. Isolation and characterization of salt-tolerant bacterial strains in salt-affected soils of Erzurum, Turkey. Geomicrobiology Journal, 32(6): 521-529.

Pessarakli M. 2014. Handbook of plant and crop physiology. CRC Press

Ramadoss D, Lakkineni VK, Bose P, Ali S and Annapurna K. 2013. Mitigation of salt stress in wheat seedlings by halotolerant bacteria isolated from saline habitats. Springer Plus, 2(1):1-7.

Roohi A, Ahmed I, Iqbal M and Jamil M. 2012. Preliminary isolation and characterization of halotolerant and halophilic bacteria from salt mines of Karak. Pakistan Journal of Botany, 44(1): 365-370.

Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacterium (No. Ed. 3). American Phytopathological Society. (APS Press).

Tiwari S, Singh P, Tiwari R, Meena KK, Yandigeri M, Singh DP and Arora DK. 2011. Salt-tolerant rhizobacteria-mediated induced tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) and chemical diversity in rhizosphere enhance plant growth. Biology and Fertility of Soils, 47(8): 907-916.

Tuteja N and Gill SS. 2012. Crop improvement under adverse conditions. Springer Science & Business Media.

Vaishnav A, Shukla AK, Sharma A, Kumar R and Choudhary DK. 2019. Endophytic bacteria in plant salt stress tolerance: current and future prospects. Journal of Plant Growth Regulation, 38(2): 650-668.

Zahir ZA, Ghani U, Naveed M, Nadeem SM and Asghar HN. 2009. Comparative effectiveness of *Pseudomonas* and *Serratia* sp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under salt-stressed conditions. Archives of Microbiology, 191(5): 415-424.