مطالعات علوم زیستی و زیست فناوری
دوره ۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۱
صفحات ۱۰۳- ۸۹

Online ISSN: ٤٤٩٣-٢٤٧٦
Print ISSN: ٢٠٢٠-٢٥٣٨
www.irijournals.com

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت با توانایی افزایش رشد گیاهان زراعی از گیاه سالیکورنیا

عاطفه نیکزاد المشیری*[۱]، علی پاکدین پاریزی[۲]، مهیار گرامی[۳]، الهام یونسی[۴]

[۱] کارشناسی ارشد، زیست فناوری میکروبی، دانشگاه غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

[۲] استادیار، بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری، ایران

[۳] استادیار، علوم گیاهی، دانشگاه غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

[۴] دکترا، بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ساری، ایران

چکیده

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که حداقل بخشی از زندگی خود را در گیاه به سر می‌برند. آن‌ها از گیاه سود می‌برند و از مواد مغذی گیاه استفاده می‌کند و گیاه نیز به نوبه‌ی خود با کاهش استرس و افزایش رشد از این تعامل سود می‌برد. در مطالعه حاضر به جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت با توانایی افزایش رشد گیاهان زراعی از گیاه سالیکورنیا پرداخته شد. گیاهان سالیکورنیا از مناطق شور حاشیه دریای خزر جمع‌آوری شد. در طی نمونه برداری‌های انجام شده در این تحقیق، ۳۴ باکتری (۲۲ باکتری گرم مثبت و ۱۲ باکتری گرم منفی) جداسازی و مورد بررسی قرار گرفتند. براساس آزمون های تولید ترکیبات محرک رشد گیاه، ۵ جدایه برای مطالعه مولکولی و شناسایی با استفاده ازآغازگرهای توالی ژنS rDNA ۱۶انتخاب شد. نتایج حاصل نشان داد که با افزایش شدت تنش خشکی میزان رشد باکتری‌ها کاهش یافت. ایزوله‌های ۲۷ و ۷۱ و ۸۳ به عنوان ایزوله‌های متحمل به خشکی در نظر گرفته شدند همچنین با افزایش درصد نمک میزان رشد سویه‌های باکتری کاهش یافت و ۶ ایزوله‌های به عنوان ایزوله‌های متحمل به نمک در نظر گرفته شدند. ۱۴ جدایه توانایی تولید آنزیم حل کننده فسفات و ۷ جدایه قادر به تولید سیدروفور بودند. همچنین جدایه۲۱ متعلق به جنس *Kushneria* و جدایه ۸۲ متعلق به جنس *Halomonas* تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، افزایش رشد، سالیکورنیا

مقدمه

باکتری‌های محرک رشد گیاه گروه گسترده‌ای از باکتری‌ها هستند که در ریزوسفر گیاهان وجود داشته و از روش‌های مختلف باعث افزایش و تحریک‌پذیری رشد گیاه می‌شوند اندوفیت‌ها گروهی از این باکتری‌ها هستند که وارد گیاه می‌شوند (Rosenblueth et al., 2006). اندوفیت‌ها حداقل در قسمتی از چرخه زندگی خود، بدون آسیب رساندن به گیاه، بافت گیاهی را دربرمی‌گیرند. این باکتری‌ها در بیشتر گونه‌های گیاهی وجود داشته و بافت‌های گیاهی از جمله بذر، غده، ریشه، ساقه، میوه و برگ را به دو صورت سیستمیک و موضعی اشغال می‌کنند. در حدود ۵۴ جنس و ۱۲۱ گونه باکتریایی از بافت-های داخلی گیاهان سالم جدا شده‌اند که از جمله شایع‌ترین جنس‌های *Enterobacter*، *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Agrobacterium* می‌باشند. نقش اصلی باکتری‌های اندوفیت، افزایش رشد گیاه وحفاظت گیاه در برابر بیماری‌ها می‌باشد. این باکتری‌ها طیف گسترده‌ای از اثرات را روی میزبانشان نشان می‌دهند. (Bacon and Hinton, 2007). از دو طریق توانایی تحریک رشد گیاه میزبان توسط اندوفیت‌ها امکان‌پذیر است. این باکتری‌ها به منظور بالاتر بردن جذب آهن با افزایش قابلیت دسترسی گیاه میزبان به منابع غذایی، تثبیت نیتروژن، انحلال بعضی عناصر ضروری غیر قابل دسترس برای میزبان مثل فسفات و یا تولید سیدروفورها عمل می‌کنند. از سوی دیگر با تولید بعضی هورمون‌های گیاهی به ویژه اکسین باعث تحریک پذیری رشد گیاه همزیست می‌شوند (Goa et al., 2010). مداخله در فتوسنتز و تثبیت کربن یکی از اثرات سودمند اندوفیت‌ها برای گیاه است. بهترین مکانیسم مطالعه شده در تحریک رشد تولید هورمون‌های گیاهی به وسیله باکتری‌های اندوفیت است که در نتیجه تغییرات ساختاری و مورفولوژیکی در گیاه میزبان صورت می‌گیرد. یک ویژگی تیپیک برای باکتری‌های اندوفیت همراه ریشه توانایی تولید اکسین و جیبرلین است. اکسین احتمالاً با مداخله در سیستم دفاعی گیاه موجب افزایش بازده اشغالگری می‌شود و یک ویژگی مهم برای اشغالگری گیاه ممکن است تولید این ترکیب باشد. تولید سیتوکینین نیز معمولاً در باکتری‌های اندوفیت گزارش شده است (Naveed et al., 2014). کاربرد باکتری‌های اندوفیت به عنوان کود زیستی پتانسیل مفیدی برای اکتساب کشاورزی پایدار و ممانعت از انقراض گونه‌های نادر است. این گروه از ریز-جانداران از راه‌های مختلف مانند تثبیت ازت قادر به افزایش عملکرد گیاه میزبان(Verma, 2013)، انحلال فسفات (Krey et al., 2013)، فراوری سیدروفور (Schywan et al., 1987)، تولید هورمون‌های رشد نظیر جیبرلین و اکسین می‌باشند (Hidayati et al., 2014). در سال ۱۸۸۶دباری پدر علم بیماری شناسی گیاهی برای اولین بار اصطلاح اندوفیت را به کار برد (Stepniewska et al., 2013). درابتدا این اصطلاح برای قارچهایی که در داخل بافت گیاه تا بخش زیرین پوست وجود داشتند به کار می‌رفت (Kloepper et al., 1992). اما بعداً در مورد باکتری‌ها و هر ریزجانداری که در ناحیه درونی بافت گیاه پیدا شود، معمول گردید. توانائی کنترل زیستی ریزموجودات بیمارگر (Wang et al., 2009) و افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی و زیستی (Sziderics et al., 2007) می‌باشند. باکتری‌های اندوفیت در غلاتی مانند برنج (Mano and Morisaki, 2008)، گندم (Larran et al., 2002)، سورگوم (Szilagyi et al., 2014) و ذرت (Oliveira et al., 2012) همچنین حبوباتی از قبیل نخود (Verma et al., 2013)، گیاهان صنعتی مانند پنبه (Misaghi et al., 1990)، نیشکر (Mendes et al., 2007) و سویا (Kuklinsky et al., 2005) سبزیجاتی از قبیل فلفل (Allu et al., 2014)، هویج (Surette et al., 2003) و همچنین در میوه‌های مختلفی مانند موز (Thomas et al., 2009)، مرکبات (Lacava et al., 2004) و در درختان جنگلی مختلف مانند کاج (Pirttila et al., 2000) و فندق (Reed et al., 1998) جداسازی و شناسایی شده‌اند. بررسی‌هایی درباره نقش باکتری‌های اندوفیت در کنترل زیستی بیماری‌های قارچی

مختلف انجام شده‌است. در پژوهش نقش باکتری‌های اندوفیت تاثیرگذار در کنترل عامل پوسیدگی قهوه‌ای سیب زمینی مورد بررسی قرار گرفته‌است (دادجو و همکاران، ۱۳۹۳). غلامی (۱۳۹۰)تاثیر ۸ جدایه باکتری اندوفیت در کنترل رشد میسلیومی قارچ‌های بیمارگر عامل مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه، کپک سفید ساقه و عامل آنتراکنوز لوبیا را مورد ارزیابی قرارداد. یکی از جنس‌های گیاهان یکساله خانواده کنوپودیاسه، سالیکورنیا است که گیاهی علفی با ساقه‌های آبدار و گوشتی و پتانسیل بالا برای کشت با استفاده از منابع آب شور است. قابلیت های گوناگونی از جمله تولید روغن، علوفه و همچنین جلوگیری از فرسایش خاک و اصلاح خاک‌های شور از ویژگی‌های مهم کشت این گیاه محسوب می‌شوند. سالیکورنیا به عنوان یک گیاه هالوفیت توانایی رشد در سطح شوری آب دریا را دارد. همچنین این گیاه علاوه بر پیدایش چشم‌اندازهای طبیعی در اراضی شور ساحلی با بهبود و احیاء چرخه‌های اکولوژیک نقش شاخصی در حفاظت از زیبایی و توسعه اکوسیستم‌های پایدار در این مناطق داشته باشد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۰). با ادامه تحقیقات در این زمینه می‌توان امیدوار بود بسیاری از اراضی شور سواحل جنوبی کشور که به صورت لم یزرع رها شده‌اند به کشت این گیاه اختصاص یابند. در راستای اهمیت این موضوع، هدف از مطالعه حاضرجداسازی و شناسایی اندوفیت‌های موجود درگیاه سالیکورنیا و بررسی خصوصیات موثرجدایه‌های باکتری بر رشد گیاهان زراعی می‌باشد.

روش تحقیق

برای جداسازی جدایه‌های باکتریایی اندوفیت، ریشه‌های سالم گیاه سالیکورنیا را زیر آب جاری، قرار داده‌شده وسپس با غوطه-وری در پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ۱۵٪ به مدت ۵ دقیقه، سطح آنها استریل شده و در نهایت به طور کامل با آب مقطر استریل شستشو شدند. برای تأیید موفقیت آمیز بودن فرآیند استریلیزاسیون سطح، ریشه های ضدعفونی شده روی محیط کشت نوترینت آگارقرار داده شدند. از ریشه‌های بدون آلودگی روی محیط کشت NA برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت ریشه استفاده شد. ریشه‌های استریل قطعه قطعه شده (۱۰ گرم) در محلول نمکی (۲٪) استریل یکنواخت می‌شوند. پس از تهیه رقت‌های متوالی (10^{-1} تا 10^{-5}) در محلول ۲٪NaCl از نمونه ها، ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت روی محیط کشت NA تکمیل شده با کلرید سدیم ۲٪ پخش شد. تمام پلیت‌ها معکوس در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت ۷ روز قرارگرفته و تعداد کلنی های ظاهر شده بر روی پلیت‌ها شمارش شد. تعداد جدایه‌های باکتریایی اندوفیت به صورت واحدهای تشکیل دهنده کلنی در گرم (CFU/ gr) وزن ریشه تازه شمارش و گزارش شد. جدایه‌ها با واکشت‌های مکرر روی همان محیط کشت خالص‌سازی و با آزمایش میکروسکوپی (رنگ، شکل، تحرک، سرعت رشد، مورفولوژی کلونی و رنگ آمیزی گرم) مورد بررسی قرار گرفتند. کشت‌های خالص در ۴ درجه سانتیگراد بطور موقت نگهداری شده و یا در استوک گلیسرول ۲۰٪ برای نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد حفظ شد.

تعیین خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها

به این منظور آزمون‌های کاتالاز و گرم از روش متداول در باکتری‌شناسی گیاهی استفاده شد. برای انجام تست گرم از کشت ۲۴ ساعته باکتری یک لوپ برداشته شد و به هر کدام یک قطره KOH ۳ درصد اضافه گردید، میزان کشش باکتری ملاک ارزیابی قرار گرفت به گونه‌ای که نمونه‌هایی که در مدت ۱۰ ثانیه خاصیت کشسانی داشتند گرم منفی به حساب آمدند.

برای انجام آزمون کاتالاز از کشت ۲۴ ساعته باکتری استفاده شد به هر نمونه آب اکسیژنه ۳ درصد اضافه گردید حضور حباب نشان دهنده مثبت بودن آزمون بود.

بررسی توانایی تحمل نمک جدایه‌های باکتری

آزمون تحمل کلرید سدیم در غلظت‌های مختلف نمک (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ درصد وزنی/حجمی) در محیط NA بررسی شد. جدایه‌های به دست‌آمده بر روی محیط کشت با غلظت‌های مختلف نمک در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت و سپس تغییرات قطر، وضعیت و ظاهر جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌هایی که قادر به رشد در محیط NA با غلظت بیشتر از ۱۵ درصد هستند برای انجام سایر آزمایشات انتخاب شدند.

بررسی توانایی تحمل تنش خشکی جدایه‌های باکتری

برای ارزیابی تحمل ایزوله ها به سطوح مختلف خشکی، پتانسیل رشد آنها در محیط NB حاوی غلظت ۰ ، ۲۰۲/۲ ، ۲۹۵/۷ و ۳۶۷/۷ گرم پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ در لیتر بررسی شد. پتانسیل اسمزی (ψs) محلول‌های آبی PEG-6000 که در بالا ذکر شد به ترتیب ۰ ، ۵-، ۱۰ - و ۱۵- مگاپاسکال بود (Michel and Kaufmann, 1973). میزان رشد ایزوله‌ها با اندازه گیری چگالی نوری (OD) در ۶۳۰ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومترتعیین شده و درصد رشد هر ایزوله در سطوح مختلف PEG-6000 با مقدار رشد همان ایزوله‌ها در محیط NB بدون PEG مقایسه شد. آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

بررسی قابلیت حل کنندگی فسفات

جدایه‌های باکتریایی برای بررسی قابلیت حل کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت (گلوکز ، ۱۰ گرم؛ عصاره مخمر ، ۰/۵ گرم؛ $CaCl_2$، ۰/۱؛ $MgSO$ ۴/۷H_2O، ۰/۲۵؛ $Ca3\ (PO4)\ 2$، ۲/۵ گرم؛ آگار ، ۱۵ گرم؛ pH، ۷/۲؛ و آب مقطر ، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر)کشت داده شد. روی هر محیط کشت ۷ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی (5×10^{8} CFU/ ml) کشت شد. پس از گذشت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، هاله رشد جدایه‌ها بررسی و قطر هاله و کلونی‌ها اندازه‌گیری شد. نسبت قطر کل (کلونی + هاله) به قطر کلنی به عنوان یک شاخص حلالیت (SI) برای ارزیابی جدایه‌های محلول در فسفات در نظر گرفته‌شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتری

جدایه‌های منتخب با استفاده از توالی‌یابی ژن ۱۶ S rRNA شناسایی شد. باکتری‌ها در ۱۰ میلی لیترمحیط کشت NB در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲ روز نگهداری شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش sambrook(1989) استخراج شده و کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز در ژل آگارز تعیین شد. ژن ۱۶ S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی تکثیر شد (ادواردز و همکاران، ۱۹۸۹) محصولات PCR پس از توالی‌یابی و بررسی صحت توالی‌ها با استفاده از برنامه BLAST این ژن با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده NCBI مقایسه و توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل در این پایگاه GenBank ثبت شد.

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار آماریSAS انجام شد. میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح معنی‌داری P <۰/۰۵بررسی شد. داده‌های ارائه شده در جداول و نمودارها به صورت میانگین سه تکرار انحراف استاندارد (SD) بیان شد.

نتایج و بحث

باکتری‌های اندوفیتیک تقریبا در همه‌ی گیاهان مطالعه شده یافت شده‌اند و گزارشات زیادی در رابطه با باکتری‌های اندوفیتیک و گیاهانی که در آن‌ها ساکن‌اند شامل برنج، موز، گندم، چقندر قند، هویج، سویا، سیب‌زمینی، لیمو، گوجه‌فرنگی و غیره داده شده است. در مطالعه حاضر۳۴ باکتری (از ۲ نمونه گیاه ۱۰باکتری و از ۵ نمونه گیاه دیگر ۲۴ باکتری)، که ۲۲ باکتری گرم مثبت و ۱۲ باکتری گرم منفی بود جداسازی و مورد بررسی قرار گرفت. توانایی تحمل مقادیرمختلف نمک (۰تا ۲۵٪) سویه‌های جداسازی شده در جدول ۱ آورده شده است. با افزایش درصد نمک میزان رشد سویه‌های باکتری کاهش یافت. ایزوله‌های S21، S92، S83، S71، S82 و S76 به عنوان ایزوله‌های متحمل به نمک در نظر گرفته شدند. از بین جدایه‌های بدست آمده تنها جدایه‌های S21،S12،S14، S24*، S71، S82، S92 با ایجاد هاله زرد رنگ در اطراف کلنی باکتری قادر به تولید سیدروفور بودند (جدول۲). جدایه‌هایS21،S102،S12، S13، S14، S14، S28، S63، S76، S77، S78 ، S82،S84، S92 توانایی حل کردن فسفات را داشتند که ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری روی محیط کشت گواه آن بود (جدول۲). همچنین S21،S27،S24*، S13، S29، S83، S71، S82 تحت تاثیر تنش خشکی القا شده با PEG قرارگرفتند. به طور کلی با افزایش شدت تنش خشکی میزان رشد باکتری‌ها کاهش یافت. با این وجود تنش خشکی بر رشد ایزوله‌ها ۲۷ و ۷۱ تاثیر معنی داری نداشت. بنابراین ایزوله‌های ۲۷ و ۷۱ و ۸۳ به عنوان ایزوله‌های متحمل به خشکی در نظر گرفته شدند (شکل۱). که در مطالعات Razzaghi و همکاران (۲۰۱۹)، Szilagyi و همکاران (۲۰۱۴)، Hidayati و همکاران (۲۰۱۴)، Bhavanath و همکاران (۲۰۱۲) نتایجی مشابه با نتایج پژوهش حاضر حاصل شده است. در مطالعه Zhao و همکاران (۲۰۱۶)، جوانه‌زنی و رشد گیاهچه بذرهای *S. europaea* تلقیح شده در مقایسه با بذرهای غیرتلقیحی تحت تنش نمکی بهبود یافت‌است. بهبود مشابه جوانه‌زنی بذر با سایر هالوفیت‌ها در تحقیقات گذشته گزارش شده‌است (Jha et al., 2012 ; Qin et al., 2014). شوری مطلوب برای حداکثر رشد هالوفیت‌ها از جمله سالیکورنیا معمولاً در محدوده ۱۰۰-۲۰۰ میلی مولار نمک است و اگر شوری خاک خارج از این محدوده باشد، وبه طور قابل توجهی مانع رشد آن می‌شود (Ma et al., 2013)، علاوه بر مکانیسم‌های مختلف سطح فیزیولوژیکی و مولکولی، امکان رشد هالوفیت‌ها در شرایط شور، بخشی از موفقیت این گیاهان به توانایی آنها در ایجاد و حفظ ارتباطات موثر با محیط زیست بستگی دارد. نتایج Singh و همکاران (۲۰۱۵) همچنین نشان داد که تلقیح گیاه گندم با PGPB مقاوم در برابر شوری منجر به رشد بهتر گیاه در شرایط تنش شوری نمک ۱۰۰ میلی مولار در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده با باکتری‌هایی که این اثر را به فعالیت ACC deaminase نسبت داده‌اند، می‌شود. رزاقی و همکاران (۱۳۹۸) نشان دادند که عملکرد گیاه گندم به طور معنی‌داری تحت تاثیر شوری قرار می‌گیرد. در شرایط تنش شوری تلقیح جدایه‌های باکتری جداشده از سالیکورنیا تاثیر معنی‌داری بر رشد گیاه گندم داشته و موجب افزایش وزن خشک اندام هوایی (۲۶/۶۸–۹/۴۹ درصد)، طول ریشه (۲۷/۴۷–۳/۹۴ درصد)، وزن خشک ریشه (۴۷/۳۶–۱۰درصد)، نسبت وزن خشک ریشه به وزن خشک اندام هوایی (۲۰/۶۹–۱۹/۴۱ درصد) و کاهش درصد نسبی آب برگ (۱۱/۷۱–۱/۲درصد)، سوپر اکسید دیسموتاز (۱۵/۸–۷/۶۳ درصد) و پرولین (۳۳/۳۳ – ۱۲/۵درصد) نسبت به شاهد شدند.

جدول ۱: تحمل سویه‌های مختلف باکتری به تنش نمک

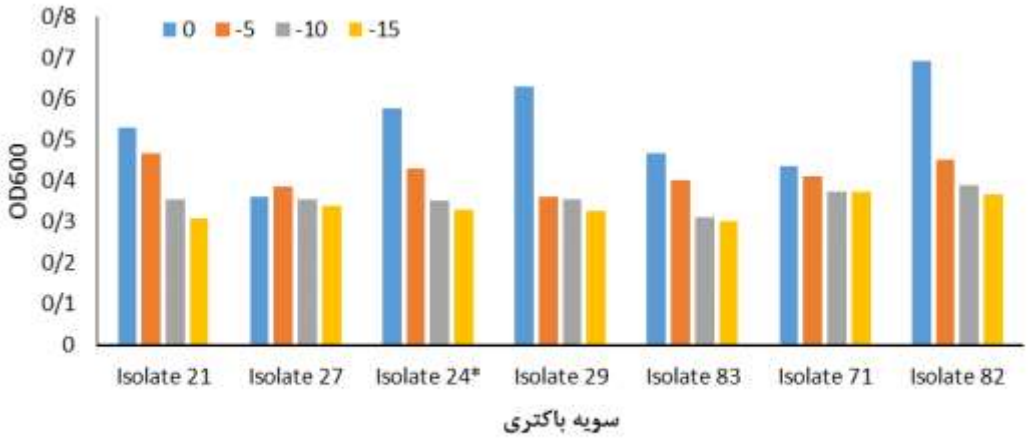
نام سویه	گرم	٪۰	٪۵	٪۱۰	٪۱۵	٪۲۰	٪۲۵
S14	+	❊	❊				
S13	+		❊	❊			
S12	+	❊	❊				
S21	−		❊	❊	❊	❊	
S27	−		❊	❊	❊		
S24	+			❊	❊		
S24+	+	❊	❊	❊	❊		
S28	−	❊	❊				
S24*	+	❊	❊	❊	❊		
S74	+	❊	❊	❊	کمی	کمی	کمی
S72	+	❊	❊	کمی	کمی	کمی	کمی
S77	+	*	*	کمی	کمی	کمی	کمی
S600	−	❊	❊	❊	−	کمی	−
S65	+	*	*	*	کمی	کمی	کمی
S91	+	*	*	*	کمی	کمی	کمی
S75	+	*	*	*	کمی	کمی	کمی
S78	−	❊	❊	کمی	−	کمی	کمی
S102	+	−	❊	❊	❊	کمی	کمی
S84	+	-	*	*	*	کمی	−
S93	−	❊	❊	❊	−	−	−
S92	+	❊	❊	❊	❊	❊	کمی
S69	−	❊	❊	❊	−	−	−
S103	+	❊	❊	❊	−	−	−
S83	+	❊	❊	❊	❊	❊	کمی
S71	+	❊	❊	❊	❊	❊	کمی
S62	−	❊	❊	❊	−	−	−
S63	+	❊	❊	❊	−	−	کمی
S62	−	❊	❊	❊	−	−	−
S64	+	❊	❊	❊	❊	−	−

S82	–	❊	❊	❊	❊	❊	–
S81	–	❊	❊	❊	–	–	کمی
S76	–	❊	❊	❊	❊	❊	کمی
S60	+	کمی	❊	❊	کمی	کمی	کمی

جدول۲: نتایج تست‌های قابلیت حل کنندگی فسفات و توانایی تولید سیدروفور برای جدایه‌های باکتری

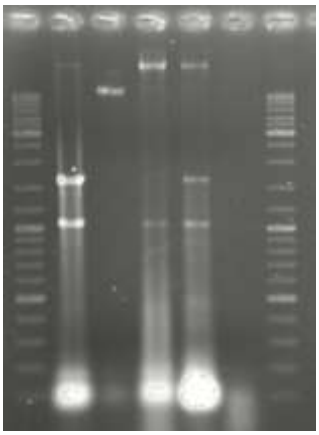
سویه باکتری	قابلیت حل کنندگی فسفات	توانایی تولید سیدروفور
S21	+	+
S102	+	–
S103	–	–
S12	+	+
S13	+	–
S14	+	+
S14	+	–
S24	–	–
S24*	–	+
S27	–	–
S28	+	–
S60	–	–
S600	–	–
S62	–	–
S63	+	–
s64	–	–
S65	–	–
S65	–	–
S66	–	–
S69	–	–
S71	–	+
S72	–	–
S74	–	–
S75	–	–

S76	+	−
S77	+	−
S78	+	−
S81	−	−
S82	+	+
S83	−	−
S84	+	−
S91	−	−
S92	+	+
S93	−	−

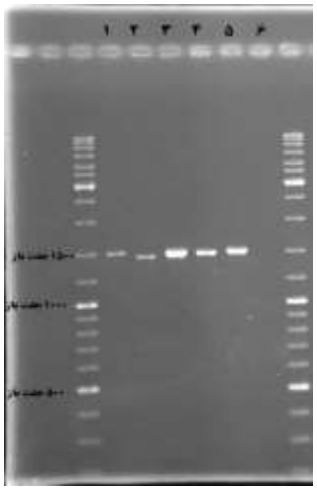


شکل ۱: تحمل سویه‌های مختلف باکتری به خشکی القا شده با PEG (۰، ۵-، ۱۰- و ۱۵- مگاپاسکال)

بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی اولیه، آزمون‌های تولید ترکیبات محرک رشد، ۵ جدایه با خصوصیات متنوع برای تشخیص مولکولی انتخاب گردیدند. برای شناسایی جدایه‌ها از تعیین توالی اختصاصی بخشی از ژن – 16S rDNA استفاده شد.



شکل۲: ژل استخراج DNA



شکل ۳: باندهای الکتروفوز محصول PCR در ژل آگارز۱/۲ درصد. چاهک‌های ۱تا ۵ محصولات DNA وچاهک ۶ کنترل منفی.

توالی‌های به دست آمده از جدایه‌ها با توالی‌های موجود NCBI مقایسه شد.

بر این اساس باکتری ایزوله شماره ۲۱ بر اساس نتایج همردیفی ژن 16 s rRNA با توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه داده NCBI متعلق به جنس ***Kushneria*** شناسایی شد. اخیراً، Sa´nchez-Porroو همکاران (۲۰۰۹) جنس *Kushneria* را در خانواده *Halomonadaceae* با نوع گونه *K. aurantia* پیشنهاد کرد تا سه گونه طبقه بندی نشده از جنس *Halomonas, 'Halomonas' marisflavi, 'Halomonas' indalinina*و *'Halomonas' avicenniae* را در خود جای دهد. تا به امروز، جنس *Kushneria* شامل پنج گونه (LPSN 2014) است که از زیستگاه‌های مختلف مانند حرا سیاه *Avicennia germinans* (Sa´nchez-Porro et al. 2009; Soto-Ramirez et al. 2007)، آب دریا (یون و همکاران ۲۰۰۱)، نمونه آب پرتوهای خورشیدی Cabo de Gata ، Almerıa، جنوب اسپانیا (Cabreraet al., 2007) و گوشت پخته شده(Zou and Wang, 2010) جدا شده است. اعضای این جنس به صورت میله‌های متوسط هالوفیلی، هوازی، گرم منفی، متحرک و غیر اسپور با محتوای DNA G + C بالا از ۵۹-۶۱/۷ میلی مول درصد مشخص می‌شوند. علاوه بر این، سویه‌های این جنس حاوی اسیدهای چرب عمده مانند $C_{16:0}$، $C_{18:1\ x7c}$، $C_{19:0\ cyclo\ x8c}$ و $C_{12:0\ 3\text{-}OH}$ هستند، در

حالی که Q-9 سیستم کینون غالب است. این جنس می تواند ۱-۳۰٪ (NaCl (w / v را تحمل کند (رشد بهینه در حضور تقریباً ۳-۹٪ NaCl رخ می دهد). دارای توان تولیدهورمون ایندول استیک اسید، تثبیت نیتروژن و انحلال فسفات های نامحلول هستند (Bangash et al.,2015).

همچنین باکتری ایزوله شماره ۸۲ بر اساس نتایج همردیفی ژن 16 s rRNA با توالی‌های معتبر ثبت شده در پایگاه داده NCBI متعلق به جنس ***Halomonas*** شناسایی شد. باکتری‌های نمک‌دوست نسبی مجموعه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها را تشکیل می‌دهند و متعلق به جنس‌های مختلفی هستند. هالوموناس جنس شاخص در خانواده مالوموناداسه است و به آسانی از جنس‌های دیگر، به دلیل توانایی رشد و تحمل دامنه وسیعی از نمک NaCl(۰/۱-۳۲/۵ ٪) قابل تشخیص است. سویه‌های متعلق به این جنس کاتالاز مثبت و بیشتر آن‌ها اکسیداز مثبت هستند و قادر به مصرف کربوهیدرات‌های مختلف بوده، میزانG+C (مول٪) در آن‌ها بالاست (زنجیربند وهمکاران، ۱۳۸۸). خانواده *Halomonadaceae*، شامل هفت جنس است: *Halomonas (type genus), Carnimonas, Chromohalobacter, Cobetia, Halotalea, Modicisalibacter* و *Zymobacter* (Arahal & Ventosa, 2005; Ntougias et al., 2007; Ben Ali Gam et al., 2007). اکثر جنس‌ها دارای یک گونه واحد هستند و فقط کرومو هالوباکتر (۹ گونه) و هالوموناس (۴۹ گونه) بیش از یک گونه دارند. جنس هالوموناس شامل باکتری‌های گرم منفی است که عمدتا دارای نوع متابولیسم تنفسی است و اکثر گونه-هایی که از محیط‌های دریایی یا هایپرسالین جدا شده‌اند (آب نمک، دریاچه‌های شور، خاک‌های شور، غذاهای نمکی و غیره) هالوفلیک هستند (Arahal & Ventosa 2005; Arahal et al., 2007; Vreeland, 2005). سویه‌های هالوموناس، که از ریزوسفر هالوفیت سالیکورنیا بدست آمده است، قادر به انجام فعالیت‌های مختلف PGP مانند تولید آمونیاک، سیدرروفور و IAA، حل‌کنندگی فسفات و تثبیت نیتروژن در شرایط آزمایشگاهی بودند (Mapelli et al., 2013a). این جنس بسیار ناهمگن است، همانطور که توسط طیف گسترده‌ای از ویژگی‌های فنوتیپی گونه‌هایی که شامل آن است (Mata et al., 2002) ، یا طیف گسترده‌ای از محتوای G + C DNA آن‌ها (۵۲-۶۸ mol٪) منعکس می‌شود (Vreeland, 2005). در مطالعه Zhao و همکاران (۲۰۱۶) پنج سویه توانستند جوانه زنی بذر و رشد گیاهچه را در حضور سطح بازدارنده نمک تسهیل کنند. هر یک از پنج سویه منتخب مجدداً تلقیح شده و از نظر توانایی توسعه در بافت‌های داخلی گیاهان *S. europaea* م جدداً آزمایش شد تا اطمینان حاصل شود که تمام سویه‌های انتخاب شده اندوفیت واقعی هستند. اطلاعات BLAST ژن ۱۶ S rRNAنشان می‌دهد که این پنج سویه در چهار جنس مختلف توزیع شده و با گونه‌های باکتریایی *Bacillus endophyticus*، *Bacillus tequilensis*، *Planococcus rifietoensis*، *Variovorax paradoxus* و *Arthrobacter agilis*مطابقت دارد. هر پنج جدایه توانایی حل شدن فسفات را داشتند که به عنوان مکانیسم احتمالی که PGPEباعث رشد گیاه می‌شود در نظر گرفته می‌شوند. سه جدایه قادر به تولید IAA بودند که می‌تواند جوانه زنی بذر را تحریک کرده و سرعت رشد ریشه را افزایش دهد. چهار مورد از این پنج جدایه دارای آنزیم ACC دآمیناز است که پیش ماده اتیلن ACC را می‌شکافد. این پنج سویه تحمل نمک زیادی را نشان دادند. تحمل زیاد نمک آندوفیت‌های باکتریایی نیز در مطالعات قبلی روی گیاهان بومی صحرا در اندوفیت‌ها مشاهده شده‌است (Puente et al., 2009; Lopez et al., 2011). در پژوهش حاضر، جدایه‌ها از نظر تولید ترکیبات محرک رشد موررد بررسی قرار گرفتند و شناسایی شدند شناسایی بر اساس توالی بخشی از ۱۶s rDNA صورت گرفت. نتایج نشان داد که جنس های *Kushneria* و *Halomonas* برای اولین بار در ایران از گیاه سالیکورنیا گزارش می شود. توسعه هدفمند کشت سالیکورنیا به عنوان گونه‌ای متحمل به شوری و قابل کشت در

ایران، برای تأمین امنیت غذایی به ویژه در سال‌های آتی که مشکلات کم‌آبی نمود بیشتری در بخش کشاورزی پیدا خواهند کرد، اهمیت بسزایی دارد. سالیکورنیا قادر به تجمع نمک‌های مختلف با بنیان‌های آلی و فلزی در قسمت‌های مختلف گیاه شامل ریشه، اندام هوایی و بذر است. توانایی این گیاه در جذب نیترات و نیتریت و عناصر معدنی از محیط از جنبه‌های مختلف شایان توجه است. با توجه به حضور یون‌های سدیم و پتاسیم و عناصر فلزی مفید تغذیه‌ای سالیکورنیا می‌تواند جایگزین مناسبی برای نمک طعام باشد. از لحاظ الگوی تجمعی عناصر ضروری و مفید، در تمام موارد به غیر از آهن، ریشه عناصر را جذب کرده و به اندام‌های بالاتر منتقل نموده است. نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که هالوفیت *Salicornia*. به طور طبیعی انواع مختلفی از باکتری‌های درون ریز و ریزوسفر قلمداد می‌شود که تحمل NaCl و خشکسالی را نشان می‌دهند و صفات مختلف PGP را نشان می‌دهند. با توجه به این نتایج، تلقیح *Salicornia* sp. گیاه دارای ریزوسفر مقاوم در برابر شوری و سویه‌های درون ریز باعث افزایش بیشتر رشد گیاه در شرایط خشکی می‌شود. به طور کلی، گیاه*Salicornia* sp در حضور باکتری‌های PGP مقاوم در برابر خشکی عملکرد بهتری دارد. در مطالعات آینده پیشنهاد می شود تاثیر تلقیح گیاه با سویه‌های باکتریایی جداشده از نظر تاثیر بر رشد گیاه و پارامترهای فیزیوکوژیکی همچنین نقش سویه‌های باکتری جداشده در کاهش اثرات نامطلوب تنش‌های محیطی مانند شوری و خشکی در گیاهان تلقیح شده. مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱. دادجو، ه.، خداکرمیان، غ .و روح رضی، ک .(۱۳۹۳) . باکتری اندوفیت *Paenibacillus polymyxa* سیب زمینی به عنوان عامل بیوکنترل . *Ralstonia solanacearum* بیست و یکمین کنگره گیاه پزشکی، ایران.

۲. رزاقی کمارسفلی، بهزاد، علیخانی، حسینعلی، اعتصامی، حسن. (۱۳۹۸). تاثیر باکتری‌های استافیلوکوکوس جداسازی شده از گیاه سالیکورنیا بر روی رشد گندم .*مجله پژوهش‌های حفاظت آب و خاک. ۲۶ (۶):۱۷۹-۱۹۶.*

۳. زنجیربند، مریم، کرمانشاهی، روحا کسری،، گلبانگ، ناصر. (۱۳۸۸). جداسازی و شناسایی باکتری‌های نمک دوست نسبی و بررسی اثر تغییرات دما و pH محیط‌کشت بر رشد آن‌ها .*تاکسونومی و بیوسیستماتیک. ۱ (۱): ۲۱-۳۲.*

۴. غلامی، م .(۱۳۹۰) . کاربرد باکتری‌های اندوفیت برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های قارچی مهم در لوبیا .پایا نامه کارشناسی ارشد گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز .۱۶۰ ص.

۵. محمدی، ح .اکبری، غ .خوش خلق، س و نیر، الف (۱۳۹۰) . بررسی موانع کشت زراعی گیاه هالوفیت سالیکورنیا با بهره‌برداری از آب دریا، کنفرانس ملی بهره‌برداری از آب دریا، کرمان، مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی.

6. Allu, S., Kumar, N.P. and Audipudi, A.V. (2014). Isolation, biochemical and PGP characterization of endophytic *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chilli red fruit antagonistic against chilli anthracnose disease. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3: 318-329.

7. Arahal, D. R. & Ventosa, A. (2005). The family Halomonadaceae. InThe Prokaryotes: an Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community, 3rd edn, release 3.20. Edited by M. Dworkin. New York: Springer.

8. Arahal, D. R., Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Mormile, M. R., Tindall, B. J., Oren, A., Bejar, V., Quesada, E. & Ventosa, A. (2007).Recommended minimal standards for describing new taxa of the family Halomonadaceae. Int J Syst Evol Microbiol 57, 2436–2446.

9. Bacon, C. W. and Hinton, D. M. (2017). Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. In Plant-associated bacteria, pp. 155-194. Springer Netherlands.

10. Ben Ali Gam, Z., Abdelkafi, S., Casalot, L., Tholozan, J. L., Oueslati, R.& Labat, M. (2007). Modicisalibacter tunisiensis gen. nov., sp. nov., anaerobic, moderately halophilic bacterium isolated from an oilfieldwater injection sample, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989 emend Dobson and Franzmann 1996 emend. Ntougias et al. 2007. Int J Syst Evol Microbiol 57, 2307–2313.

11. Bangash A, Ahmed I, Abbas S, Kudo T, Shahzad A, Fujiwara T, Ohkuma M. Kushneria pakistanensis sp. nov., a novel moderately halophilic bacterium isolated from rhizosphere of a plant (Saccharum spontaneum) growing in salt mines of the Karak area in Pakistan. Antonie Van Leeuwenhoek. 2015 Apr;107 (4):991-1000. doi: 10.1007/s10482-015-0391-9. Epub 2015 Jan 30. PMID: 25631404.

12. Bhavanath, J., Iti, G., Anton, H. (2012). The roots of the halophyte Salicornia brachiata are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potentialPlant Soil, 356:265–277.

13. Goa, F. Dai, C. Liu, X. (2010). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African journal of Microbiology Research 4: 1346-1351.

14. Hidayati, U., Chaniago, I.A., Munif, A., Andreas Santosa, S. and Andreas Santosa, S. (2014). Potency of plant growth promoting endophytic bacteria from rubber plants (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.). Journal of Agronomy, 13: 147-152.

15. Jha B, Gontia I, Hartmann A (2012) The roots of the halophyte Salicornia brachiata are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential. Plant Soil 356:265–277

16. Kloepper, J.W., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M. (1992). Proposed elimination of the term *endorhizosphere*. Phytopathology, 82: 726-727.

17. Krey, T., Vassilev, N., Baum, C. and Eichler-Lobermann, B. (2013). Effect of long-term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field conditions. European Journal of Soil Biology, 55: 124-130.

18. Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W.L., Mendes, R., Pizzirani -Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L. (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean *(Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. Plant and Soil, 273: 91-99.

19. Lacava, P.T., Araujo, W.L., Marcon, J., Maccheroni, J.R.W. and Azevedo, J.L. (2004). Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa*, causal agent of citrus-variegated chlorosis. Letters in Applied Microbiolgy, 39: 55-59.

20. Larran, S., Perello, A., Simon, M.R. and Moreno, V. (2002). Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticium aestivum* L.) Leaves. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18: 683-686.

21. Lopez BR, Bashan Y, Bacilio M (2011) Endophytic bacteria of Mammillaria fraileana, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran desert. Arch Microbiol 193:527–541

22. Ma, J., Zhang, M., Xiao, X., You, J., Wang, J., Wang, T., Yao, Y., Tian, C., 2013. Global transcriptome profiling of Salicornia europaea L. shoots under NaCl treatment. PLoS One 8, e65877. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065877. (Print 2013).

23. Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Ouzari, I., Daffonchio, D., Borin, S., 2013a.Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with Salicornia growing in Tunisian

24. Mano, H. and Morisaki, H. (2008). Endophytic bacteria in the rice plant. Microbes and Environments, 23: 109-117.

25. Mata, J. A., Martı´nez-Ca´ novas, J., Quesada, E. & Be´ jar, V. (2002). A detailed phenotypic characterisation of the type strains of Halomonas species. Syst Appl Microbiol 25, 360–375.

26. Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Araujo, W.L. and Raaijmakers, J.M. (2007). Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. Applied and Environmental Microbiology, 73: 7259-7267.

27. Michel, B.E. and Kaufmann, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. Plant Physiol. 51: 914-916.

28. Misaghi, I.J. and Donndelinger, C.R. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. Phytopathology Journal, 80: 808-811.

29. Naveed, M., Hussain, M. B., Zahir, Z. A., Mitter, B. and Sessitsch, A. (2014). Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. Plant Growth Regulation, 73: 121-131.

30. Ntougias, S., Zervakis, G. I. & Fasseas, C. (2007). Halotalea alkalilenta gen. nov., sp. nov., a novel osmotolerant and alkalitolerant bacterium from alkaline olive mill wastes, and emended description of the family Halomonadaceae Franzmann et al. 1989, emend. Dobson and Franzmann 1996. Int J Syst Evol Microbiol 57, 1975–1983.

31. Puente ME, Li CY, Bashan Y (2009) Rock-degrading endophytic bacteria in cacti. Environ Exp Bot 66:389–401.

32. Qin S, Zhang YJ, Yuan B, Xu PY, Xing K, Wang J, Jiang JH (2014) Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adaptedsymbiotic bacteria associated with halophyte Limonium sinense (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. Plant Soil 374:753–766

33. Oliveira Costa, L.E.D., Queiroz, M.V.D., Borges, A.C., Moraes, C.A.D. and Araujo, E.F.D. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus Vulgaris*). Brazilian Journal of Microbiology, 43: 1562-1575.

34. Pirttila, A.M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllyla, R. and Hohtola, A. (2000). Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) by in situ hybridization. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3073-3077.

35. Razzaghi Komaresofla. (2019). Improved growth and salinity tolerance of the halophyte Salicornia sp. By co–inoculation with endophytic and rhizosphere bacteria. Applied Soil Ecology 138: 160–170.

36. Reed, B.M., Mentezer, J., Tanprasert, P. and, Yu, X. (1998). Internal bacterial contamination of micropropagated hazelnut: identification and antibiotic treatment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 52: 67-70.

37. Rosenblueth M, and Martinez- Romero E . (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular Plant- Microbe Interactions 19: 827-837.

38. Sa´nchez-Porro C, de la Haba RR, Soto-Ramı´rez N, Ma´rquez MC, Montalvo-Rodrı´guez R, Ventosa A (2009) Description of Kushneria aurantia gen. nov., sp. nov., a novel member of the family Halomonadaceae, and a proposal for reclassification of Halomonas marisflavi as Kushneria marisflavi comb. nov., of Halomonas indalinina as Kushneria indalinina comb. nov. and of Halomonas avicenniae as Kushneria avicenniae comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 59 (2):397–405. doi:10.1099/ijs.0.001461-

39. Schywan, B. and Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for detection and determination of sidrophores. Analytical Biochemistry, 160: 47-56.

40. Singh, R.P., Jha, P., Jha, P.N., 2015. The plant-growth-promoting bacterium Klebsiella sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (Triticum aestivum) under salt stress. J. Plant Physiol. 184, 57–67. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.07.002.

41. Soto-Ramirez N, Sanchez-Porro C, Rosas S, Gonzalez W, Quinones M, Ventosa A, Montalvo-Rodriguez R (2007) Halomonas avicenniae sp nov., isolated from the salty leaves of the black mangrove Avicennia germinans in Puerto Rico. Int J Syst Evol Microbiol 57:900–905. doi:10. 1099/ijs.0.64818-0.

42. Stepniewska, Z. and Kuzniar, A. (2013). Endophytic microorganisms- promising applications in bioremediation of greenhouse gases. Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 9589-9596.

43. Surette, M.A., Sturz, A.V., Lada, R.R. and Nowak, J. (2003). Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. sativus): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. Plant and Soil, 253: 381-390.

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

45. Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C. and Galli-Terasawa, L.V.G. (2014). Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. AMB Express, 4: 2-9.

46. Thomas, P. and Soly, T.A. (2009). Endophytic bacteria associated with growing shoot tips of banana (*Musa* sp.) cv. grand naine and the affinity of endophytes to the host. Microbial Ecology, 58: 952–964.

47. Verma, J.P., Yadav, J., Tiwari, K.N. and Kumar, A. (2013). Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake

of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under sustainable agriculture. Ecological Engineering, 51: 282-286.

48. Vreeland, R. H., Litchfield, C. D., Martin, E. L. & Elliot, E. (1980). Halomonas elongata, a new genus and species of extremely salt tolerant bacteria. Int J Syst Bacteriol 30, 485–495.

49. Wang, S., Huijun, W., Junqing, Q., Lingli, M., Jun, L., Yanfe, X. and Xuewen, G. (2009). Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to *tabacco mosaic virus* by *Bacillus* spp. Journal of Microbiology and Biotechnology, 19: 1250-1258.

50. Zou Z, Wang G (2010) Kushneria sinocarnis sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from a Chinese traditional cured meat. Int J Syst Evol Microbiol 60 (8):1881–1886. doi:10.1099/ijs.0.013797-0.