هجدهمین کنگره ملی و چهارمین کنگره بین‌المللی
علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران
18th Iranian National & 4th International Crop Sciences Congress
Ferdowsi University of Mashhad, Iran
Sept. 10 – 12th , 2024
دانشگاه فردوسی مشهد
۲۲ – ۲۰ شهریورماه ۱۴۰۳

عنوان مقاله: بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرار باکتریایی بر القاء رشد و تحمل به تنش شوری در گیاه آرابیدوپسیس

سیده مرضیه نوراشرف الدین[1]، علیرضا سیفی[2*]

۱- دانش‌آموخته دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد/ ۲- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

*- نویسنده مسئول: **Email: arseifi@um.ac.ir**

ارائه دهنده: سیده مرضیه نوراشرف الدین

نحوه ارجاع به مقاله:

نوراشرف الدین، س م.، سیفی، ع. (۱۴۰۳). بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرار باکتریایی بر رشد و تحمل به شوری در گیاه آرابیدوپسیس. هجدهمین کنگره ملی و چهارمین کنگره بین‌المللی علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۲۰-۲۲ شهریور ۱۴۰۳، دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده فارسی:

با توجه به اهمیت توسعه کشاورزی پایدار در مناطق تحت تأثیر تنش‌های غیرزیستی خشکی و شوری، پیدا کردن راهکاری آسان و مقرون به‌صرفه برای القاء تحمل به تنش در گیاهان ضروری می‌باشد. در این مطالعه، جدایه‌های باکتریایی که به طور طبیعی در بخش‌های رایزوسفری یا اندوفیتی گیاهان وجود دارند از سه گیاه سختی‌پسند بیابانی (رایزوسفر سیاه تاغ[1]، بذر آلروپوس[2]، و رایزوسفر چنگ مریم[3]) جداسازی و شناسایی شدند و از نظر تحمل به تنش خشکی، شوری و گرما، دارا بودن صفات افزایش دهنده رشد گیاه (قابلیت تولید هورمون اکسین و انحلال فسفات) و همینطور قابلیت القاء تحمل به تنش شوری به گیاه مدل آرابیدوپسیس در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین مکانیسم عمل باکتری‌ها از طریق تولید ترکیبات آلی فرار باکتریایی بر القاء تحمل به تنش شوری با استفاده از دو سیستم برهم‌کنش گیاه- باکتری (تماس مستقیم گیاه با باکتری و تماس غیرمستقیم) بررسی شد. نتایج بدست آمده از تست‌های میکروبیولوژی، سطوح متفاوتی از تحمل به تنش‌های غیرزیستی شوری، خشکی و گرما و همچنین قابلیت تولید اکسین و انحلال فسفات را برای باکتری‌های مورد بررسی نشان داده است. به علاوه شناسایی مولکولی باکتری‌ها نیز نشان داد که چهار باکتری جداسازی شده به دو شاخه فیرمیکوتا و پروتئوباکتریا تعلق دارند. بررسی تأثیر باکتری‌ها به عنوان مایه تلقیح گیاه آرابیدوپسیس در هر دو سیستم کشت نیز نشان داد که باکتری‌های بیابانی القاء رشد و تحمل به تنش شوری را با ایجاد تغییراتی در معماری سیستم ریشه گیاهان و افزایش بیومس کل گیاه میزبان اعمال می‌کنند و این تأثیر هم در تماس مستقیم و هم از طریق تولید ترکیبات آلی فرار مشاهده شد. به‌طوریکه افزایش طول و وزن تر ریشه، بیوس شاخه و بیومس کل گیاه در تماس مستقیم برای باکتری A8 و در تماس غیرمستقیم برای باکتریAS13 افزایش معنی‌داری را نشان داده است.

مقدمه و بیان مسئله:

طبق پیش‌بینی سازمان ملل متحد، جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ از ۹/۸ میلیارد نفر فراتر خواهد رفت. این افزایش جمعیت انسانی، همراه با کاهش سطح زمین‌های زراعی و اثرات منفی تنش‌های غیرزیستی ناشی از تغییرات آب و هوایی، چالش‌های بزرگی را برای کشاورزی پایدار و امنیت غذایی جهانی ایجاد می‌کند. شوری خاک که حدود ۲۰ درصد از زمین‌های کشاورزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد، در مناطق خشک و نیمه‌خشک به عنوان یک تنش غیرزیستی مهم مطرح است که بر رشد گیاهان و عملکرد محصولات تأثیر منفی می‌گذارد (فائو، ۲۰۲۱). روش‌های سنتی اصلاح نباتات و مهندسی ژنتیک نیز که به منظور تولید محصولات مقاوم به شوری به کار گرفته می‌شوند بسیار پرهزینه و زمان‌بر می‌باشند. اخیراً، گزارشات زیادی ارائه شده که نشان می‌دهد باکتری‌های جداسازی شده از گیاهان، بخصوص گیاهانی که به طور طبیعی با شرایط سخت بیابانی سازگار هستند قابلیت القاء تحمل به تنش غیرزیستی را در گیاهان دارا هستند (ایدا و همکاران، ۲۰۱۹؛ اکه و همکاران، ۲۰۱۹؛ نوراشرف‌الدین و همکاران، ۲۰۲۴). استفاده از این باکتری‌ها در قالب کود زیستی به‌عنوان یک جایگزین عملی و مقرون‌به‌صرفه برای افزایش رشد گیاه و القاء تحمل به تنش غیرزیستی

[1] *Haloxylon ammodendron*
[2] *Aeluropus littoralis*
[3] *Anastatica hierochuntica*

در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است. این باکتری‌ها به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم بر رشد و نمو گیاهان میزبان تأثیر می‌گذارند. همچنین برخی از این باکتری‌ها از طریق انتشار ترکیبات آلی فرار[4] تحمل به تنش غیرزیستی را در گیاهان القاء می‌کنند (لیو و همکاران، ۲۰۲۰؛ هی و همکاران، ۲۰۲۳). از این رو در این مطالعه جدایه‌های باکتریایی از سه گیاه بیابانی جداسازی و شناسایی شدند تا تأثیر آنها در افزایش رشد و تحمل به شوری گیاه مدل آرابیدوپسیس از طریق دو سیستم برهمکنش گیاه -باکتری (تماس مستقیم و غیرمستقیم) مورد بررسی قرار گیرد تا نقش احتمالی VOC باکتریایی نیز بر تغییرات مورفولوژیکی ریشه‌ها و القاء رشد مشخص گردد.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌های گیاهی سیاه تاغ و آلروپوس از منطقه دولت‌آباد خراسان رضوی و گیاه چنگ مریم از جزیره کیش جمع‌آوری و به آزمایشگاه شهدا دانشگاه فردوسی مشهد انتقال داده شدند. جداسازی باکتری با استفاده از بافر PBS انجام شد و کشت‌های خطی از هر یک از باکتری‌ها بر روی محیط LB تهیه گردید. در نهایت بررسی‌های بیشتر بر روی ۴ باکتری انجام شد. تست تحمل تنش غیرزیستی باکتری‌ها با استفاده از مقایسه رشد کشت تازه باکتری در محیط LB حاوی نمک ۵ درصد (تست شوری)، پلی اتیلن گلایکول۲۰ درصد (تست خشکی) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه انکوباتور در مقایسه با رشد در محیط LB تنها بررسی شد. تحمل گرما نیز با استفاده از کشت تازه باکتری‌ها در LB و دمای ۴۲ درجه انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت ارزیابی شد. میزان رشد باکتری‌ها نیز با استفاده از اسپکتوفتومتر تعیین گردید.

قابلیت تولید اکسین و انحلال فسفات به صورت توصیفی به‌ترتیب براساس تغییر رنگ ایجاد شده بعد از کشت تازه باکتری در محیط حاوی ال تریپتوفان و تشکیل هاله شفاف در محیط PVK بعد از ۴۸ ساعت و دمای ۲۸ درجه امتیازدهی شد. شناسایی مولکولی با تکثیر ژن 16S انجام شد (ایدا و همکاران، ۲۰۱۹؛ نوراشرف‌الدین و همکاران، ۲۰۲۴).

اثر باکتری بر روی القاء تحمل تنش شوری گیاه آرابیدوپسیس با استفاده کشت گیاه در دو نوع پلیت حاوی محیط 1/2MS تکمیل شده با نمک ۱۰۰ میلی مولار یکنواخت (به منظور تماس مستقیم گیاه با باکتری) و نصف شده (به منظور تماس غیرمستقیم گیاه با باکتری و بررسی اثر VOC) انجام شد.

نتایج و بحث:

نتایج مربوط به شناسایی مولکولی و میکروبیولوژیکی در جدول ۱ آورده شده است. بررسی تأثیر تلقیح با باکتری در تماس مستقیم با گیاه آرابیدوپسیس تحت شرایط تنش شوری بعد از ۲۱ روز نشان داد که به جز AS13 دیگر باکتری‌ها باعث افزایش قابل توجه وزن تر شاخه و بیومس کل گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد شدند. همچنین در ارتباط با پارامترهای ریشه، A8 به طور قابل توجهی وزن ریشه را افزایش داده و در خصوص طول ریشه نیز دو باکتری A8 و RH منجر به افزایش معنی‌دار طول ریشه گیاهان شده‌اند (شکل۱ و ۲).

جدول ۱. خلاصه‌ای از خصوصیات باکتری‌ها.

باکتری	نمونه گیاهی / گیاه میزبان	جدایه	شاخه	تولید اکسین	انحلال فسفات	تحمل شوری	تحمل خشکی	تحمل گرما
RH	رایزوسفر سیاه تاغ	*Pseudomonas glycinis*	Proteobacteria	+++	+	14.45±0.01	77.59±0.05	95.73±0.22
A8	رایزوسفر چنگ مریم	*Priestia filamentosa*	Firmicutes	+++	-	52.31±0.04	117.42±0.07	90.01±0.21
AS6	بذر آلروپوس	*Peribacillus acanthi*	Firmicutes	++	+	133.09±0.08	26.70±0.02	112.94±0.07
AS13	بذر آلروپوس	*Peribacillus pumilus*	Firmicutes	+	+	168.77±0.08	18.69±0.01	145.19±0.05

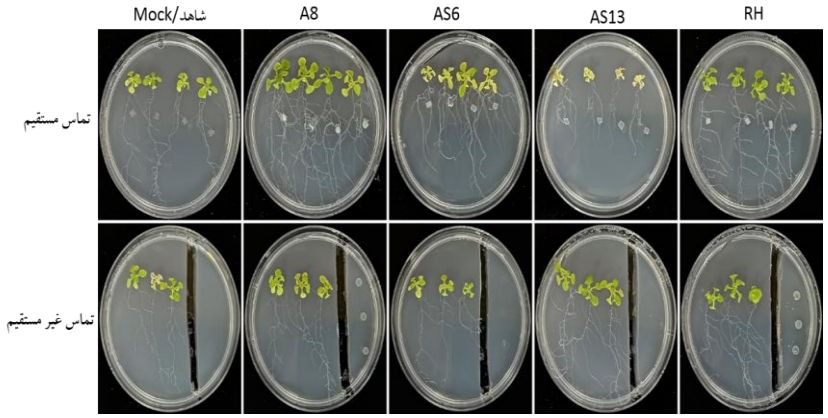
اعداد موجود در ستون‌های ۷-۹ نشان دهنده‌ی درصد (میانگین± انحراف معیار، برای۳ تکرار) رشد باکتری‌ها در مقایسه با رشد در شرایط نرمال است. قابلیت تولید اکسین و انحلال فسفات توسط باکتری‌ها به صورت کیفی امتیازدهی شد به طوریکه سه ستاره(توانایی تولید زیاد)، دو ستاره (توانایی تولید متوسط)، یک ستاره (توانایی تولید کم) و منفی (عدم توانایی تولید) می‌باشد.

در تماس غیرمستقیم سه باکتری RH، AS13 و A8 قابلیت القاء رشد گیاه را با استفاده از تولید VOC نشان دادند، در حالی که AS13 در تماس مستقیم با گیاه عملکرد مناسبی نداشته است. همچنین AS6 که در شرایط تماس مستقیم منجر به افزایش بیومس شده بود، در این شرایط تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد ایجاد نکرد. وزن ریشه گیاهان هم تنها تحت تأثیر VOC تولید شده توسط AS13 افزایش معنی‌داری را نشان داد و طول

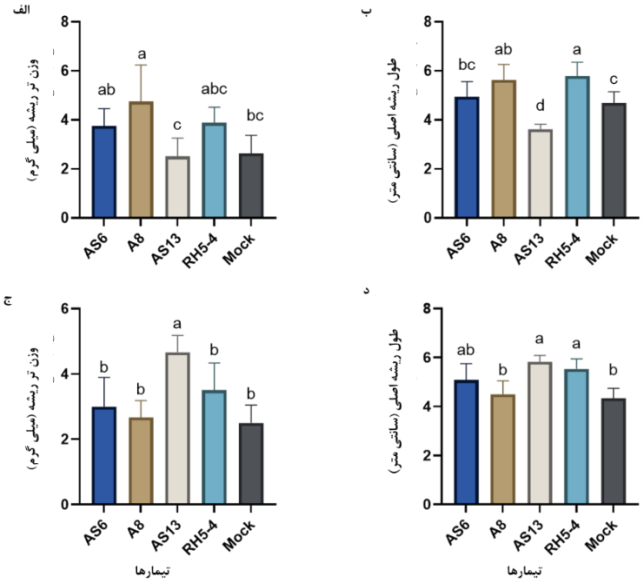
[4] Volatile Organic Compounds (VOC)

ریشه گیاهان به طور قابل توجهی در AS13 و RH افزایش یافت (شکل ۱و ۲).

جدایه‌های باکتریایی به دو شاخه اصلی تشکیل‌دهنده میکروبیوم بیابانی تعلق دارند که در گزارشات دیگر نیز از گیاهان بیابانی جداسازی شده‌اند (ایدا و همکاران، ۲۰۱۹؛ نوراشرف‌الدین و همکاران، ۲۰۲۴). با توجه به نقش کلیدی ریشه در رشد و تحمل تنش گیاهان، تغییر در معماری سیستم ریشه مشاهده شده در این مطالعه را می‌توان به عنوان یک مکانیسم مهم باکتریایی در القاء رشد و تحمل به تنش در تماس مستقیم و غیرمستقیم در نظر گرفت. به‌علاوه مطالعات نیز نشان داده‌اند که VOC باکتریایی با تأثیر بر سیگنالینگ اکسین منجر به افزایش تولید ریشه‌های جانبی، طول ریشه و در نهایت بیومس ریشه می‌شوند (ایدا و همکاران، ۲۰۱۹؛ هی و همکاران، ۲۰۲۳؛ نوراشرف‌الدین و همکاران، ۲۰۲۴).



شکل ۱. تصویری از گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تلقیح شده با باکتری تحت شرایط شوری در تماس مستقیم و غیرمستقیم با باکتری‌های مختلف بعد از ۲۱ روز.



شکل ۲.نتایج اندازه‌گیری وزن تر ریشه و طول ریشه اصلی گیاهچه‌های آرابیدوپسیس تلقیح شده با باکتری تحت شرایط شوری در حالت تماس مستقیم (الف و ب) و غیرمستقیم (ج و د).

مهمترین یافته‌ها:

۱- جداسازی و شناسایی باکتری‌های گیاهان سختی‌پسند با قابلیت القاء رشد و تحمل به تنش شوری در گیاه غیرمیزبان با موفقیت انجام شد.

۲- تأثیر VOC در القاء رشد گیاهان با استفاده از آزمایش طراحی شده به خوبی مشخص گردید.

۳- نتایج این مطالعه تغییر در معماری سیستم ریشه گیاهان را نشان داد که به عنوان یک مکانیسم مهم به کار گرفته شده توسط باکتری‌ها در القاء رشد و تحمل به تنش مطرح می‌باشد.

واژگان کلیدی:

میکروبیوم بیابانی، RSA، رایزوسفر، اندوفیت

Title (In English): Effects of Bacterial Volatile Organic Compounds on Growth Induction and Salinity Stress Tolerance in Arabidopsis

Abstract:

Considering the importance of developing sustainable agriculture in regions affected by abiotic stresses like drought, salinity, and extreme temperatures, identifying simple and cost-effective methods to enhance plant stress tolerance is essential. Utilizing naturally occurring microbial communities associated with desert-adapted plants offers a promising strategy for improving plant resilience in such challenging environments. This study focused on bacterial isolates naturally present in the rhizosphere (soil influenced by plant roots) and endophytic (internal tissues) regions of three desert-adapted plants: *Haloxylon ammodendron*, *Aeluropus littoralis*, and *Anastatica hierochuntica*). These plants thrive in harsh desert conditions, making their associated microbes particularly valuable for potential agricultural applications. The bacterial isolates were identified and subjected to tests evaluating their tolerance to abiotic stresses, including drought, salinity, and heat. In addition to stress tolerance, the bacteria were assessed for their plant growth-promoting properties, such as the ability to produce auxin, a hormone crucial for root development, and to solubilize phosphate, an essential nutrient for plants. These dual capabilities suggest that the bacteria could serve as beneficial tools in sustainable agriculture. To further explore their practical application, the study tested the ability of these bacterial isolates to induce salinity stress tolerance in the model plant Arabidopsis under laboratory conditions. The research focused on how these bacteria confer stress tolerance, particularly through the production of bacterial volatile organic compounds (VOCs). Two plant-bacteria interaction models were used: direct contact, where roots interact closely with bacteria, and indirect contact, where the effects of VOCs are observed without direct interaction. The tests revealed that the bacterial isolates exhibited varying levels of tolerance to salinity, drought, and heat, and were capable of producing auxin and solubilizing phosphate. Molecular identification classified the four isolates into two phyla: Firmicutes and Proteobacteria. The study demonstrated that these desert bacteria enhance plant growth and salinity stress tolerance by modifying the host plant root system architecture, with benefits observed in both direct and indirect interaction models.

Keywords (In English): Desert Microbiome, RSA, Rhizosphere, salinity, Endophytes

منابع:

1. Eida, A. A., Alzubaidy, H. S., de Zélicourt, A., Synek, L., Alsharif, W., Lafi, F. F. & Saad, M. M. (2019). Phylogenetically diverse endophytic bacteria from desert plants induce transcriptional changes of tissue-specific ion transporters and salinity stress in *Arabidopsis thaliana. Plant Science*, *280*, 228-240.https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.12.002
2. Eke, P., Kumar, A., Sahu, K. P., Wakam, L. N., Sheoran, N., Ashajyothi, M., ... & Fekam, F. B. (2019). Endophytic bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Microbiological Research*, 228, 126302. https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126302
3. Food and Agriculture Organization (2021) The impact of disasters and crises on agriculture and food security: 2021. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome

4. He, A. L., Zhao, L. Y., Ren, W., Li, H. R., Paré, P. W., Zhao, Q., & Zhang, J. L. (2023). A volatile producing *Bacillus subtilis* strain from the rhizosphere of *Haloxylon ammodendron* promotes plant root development. *Plant and Soil*, *486*(1), 661-680. https://doi.org/10.1007/s11104-023-05901-2

5. Nourashrafeddin, S. M., Ramandi, A., & Seifi, A. (2024). Rhizobacteria isolated from xerophyte *Haloxylon ammodendron* manipulate root system architecture and enhance drought and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *International Microbiology*, *27*(2), 337-347.https://doi.org/10.1007/s10123-023-00394-6

6. Liu, H., Brettell, L. E., Qiu, Z., & Singh, B. K. (2020). Microbiome-mediated stress resistance in plants. *Trends in Plant Science*, *25*(8), 733-743. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.03.014