

اثر مایه زنی بذر با یک باکتری شورپسند و محرک رشد بر ویژگی های فیزیولوژیک

و زیست شیمیایی گیاه ریحان بنفش در شرایط تنش شوری^۱

Effect of Seed Inoculation with a Halophilic and Growth Promoting Bacterium on Physiological and Biochemical Properties of Purple Basil under Salinity Stress

ارغوان سلیمی، محمد اعتمادی*، سعید عشقی، اکبر کرمی، سید ساسان موسوی^۲

چکیده

به منظور بررسی اثر مایه زنی بذر ریحان (*Ocimum basilicum* L.) با باکتری محرک رشد و شوری دوست هالوموناس و تعدیل اثرهای تنش شوری بر ویژگی های فیزیولوژیک و زیست شیمیایی این گیاه، پژوهشی در قالب طرح به طور کامل تصادفی و با چهار تکرار در آزمایشگاه بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز در سال ۱۳۹۷ انجام شد. تیمارهای آزمایشی این پژوهش شامل؛ شاهد (Ctl)، شوری صفر و مایه زنی با باکتری هالوموناس (Ctl.H)، شوری ۵۰ میلی مولار سدیم کلراید و تلقیح با باکتری هالوموناس (S1H)، شوری ۱۰۰ میلی مولار سدیم کلراید و تلقیح با باکتری هالوموناس (S2H) و شوری ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلراید و تلقیح با باکتری هالوموناس (S3H) بودند. مشخص شد که کاربرد باکتری هالوموناس موجب افزایش میزان رنگدانه های فتوسنتزی (کلروفیل a با ۳۰/۱۶، کلروفیل b با ۳۴/۷۸ و کلروفیل کل با ۲۹/۹۸ درصد افزایش در تیمار S2H)، کارتنوئید (۲۸/۵۳ درصد در تیمار S2H)، میزان پروتئین و پروتئین محلول به ترتیب (۵۹/۸۰ و ۱۹/۸۵ درصد در تیمار S2H)، فلاونوئید (۹۰/۹۲ درصد در تیمار S1H) و همچنین افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز (۷۴/۸۶ درصد در تیمار S3H) گیاه ریحان در سطوح مختلف شوری نسبت به شاهد گردید. به طور کلی، نتیجه های حاصل از آزمایش تلقیح بذر گیاه ریحان با باکتری هالوموناس منجر به افزایش شاخص های فیزیولوژیکی و زیست شیمیایی این گیاه در مقابله با تنش شوری شده و تحمل گیاه به این تنش زیستی را بهبود می بخشد.

واژه های کلیدی: باکتری های محرک رشد گیاهی، رنگدانه های فتوسنتزی، پروتئین، آنزیم های آنتی اکسیدانت.

مقدمه

ریحان (*Ocimum basilicum* L.) یکی از گیاهان مهم متعلق به تیره نعنائیان (Lamiaceae)، جنس *Ocimum* بوده و دارای حدود ۱۵۰ گونه می باشد. ریحان به عنوان یک گیاه چندمنظوره سبزی، دارویی و ادویه ای مورد استفاده قرار می گیرد و تنوع زیادی در مورفولوژی، زیست شناسی، محتوای اسانس و ترکیب های شیمیایی دارد (۶). امروزه، با توجه به افزایش عمق چاه ها، کیفیت آب های مورد استفاده در کشت های گلخانه ای کاهش و میزان شوری افزایش یافته است. از طرف دیگر بسته به بسترهای کشت مورد استفاده میزان انباشت Na^+ و Cl^- در پیرامون ریشه می تواند افزایش یابد و در نتیجه کاهش رشد و عملکرد برای محصول کشت شده اتفاق افتد. راه های مختلفی جهت افزایش تولید محصول های کشاورزی وجود دارد که از جمله آن می توان به مدیریت صحیح زمین های کشاورزی، استفاده از محصول های تراریخته و استفاده از باکتری های محرک رشد گیاه (PGPR)^۳ اشاره کرد (۱۰). باید در نظر داشت که استفاده از محصول های تراریخته بسیار بحث برانگیز بوده و نیاز به ارزیابی دقیق خطرهای

۱- تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۵/۶

۲- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، استادیار، دانشیار و دانشجوی دکتری علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (etemadish.m@gmail.com).

۳- Plant Growth Promoting Rhizobacteria

آن، پیش از عمومی سازی دارد (۲۲). منابع میکروبی جایگزین امن تر و سازگار با محیط زیست می باشند که می تواند در تولید بیشتر محصول های کشاورزی بدون دست ورزی تکاملی در گیاهان موثر واقع شوند. این ریزاندامواره ها بر اساس زیستگاه، ساختار و عملکرد متفاوت هستند. از جمله آن ها می توان به میکروارگانیسم های زیستگاه اطراف ریشه (ریزومیکروبیوم) اشاره کرد. این میکروارگانیسم ها توانا به ایجاد همزیستی با ریشه گیاه به دو صورت هستند (۷). دسته اول همزیستی اجباری با میزبان خاص (ایجاد گره توسط باکتری ریزوبیوم در تیره بقولات) (۱۶) و دسته دوم همزیستی اختیاری با میزبان عمومی دارند. دسته دوم، توانایی کلونیزه کردن سطح ریشه جهت افزایش رشد و سلامتی گیاه را به عنوان باکتری های محرک رشد گیاه ایفا می کنند (۴). از باکتری های محرک رشد گیاه، می توان به صورت های مختلفی، نظیر کودهای زیستی، آفت کش های زیستی و محرک های گیاهی استفاده کرد. سازوکارهای عمل این باکتری های محرک رشد را می توان به دو دسته مستقیم و غیر مستقیم طبقه بندی نمود؛ بدین صورت که مکانیسم عمل مستقیم در دسترس قرار دادن مواد غذایی برای گیاه و تولید محرک های رشد می باشد. در صورتی که هر گونه مکانیسم عملی که موجب محافظت گیاه از بیماری (تنش زیوا) یا کمک به گیاه برای رشد بهتر در شرایط تنش های محیطی (تنش نازیوا) شود را مکانیسم عمل غیر مستقیم در نظر می گیرند (۲۵). تنش های غیر زیستی مانند شوری و خشکی، چالش های مهم در کاهش عملکرد گیاهان و دارای اثرهای مستقیم و غیر مستقیم بر تولید غذایی جهانی هستند. مهم ترین و رایج ترین تنش زیستی پس از تنش خشکی در سطح جهان و ایران، تنش شوری است. شوری زیاد موجب کاهش عملکرد بسیاری از محصول های کشاورزی از جمله سبزی ها می گردد. آشنایی و دانستن راه های تحمل به شوری در سبزی ها برای افزایش بهره وری و سودآوری محصول هایی که با آب شور آبیاری می شوند، ضروری است. کاهش پتانسیل آب، عدم تعادل یونی و سمیت سه اثر متداول تنش شوری می باشند (۱۴). در دو دهه اخیر بسیاری از دانشمندان با استفاده از مایه زنی PGPR با گیاه و ریشه آن، با تنش های غیر زیستی و زیستی مقابله کرده اند. مایه زنی گیاه با PGPR ها با توجه به مکانیسم های مستقیم و غیر مستقیمی که در گیاه مقاومت سیستمیک ایجاد می کنند، به عنوان راهکاری برای تعدیل تنش های غیرزیستی بیان شده است (۲۵). نقش بسیاری از PGPR ها در بهبود روابط آب و گیاه، هم ایستایی یونی و عملکرد فتوسنتزی گیاه در تنش شوری گزارش شده است؛ هر چند که مکانیسم عمل آن ها هنوز به خوبی مشخص نیست (۲۳). شواهد نشان می دهد که PGPR ها در ارتباط با هدایت روزه ای، جذب آب و مواد غذایی، وضعیت هورمون های گیاهی، پروتئین های پیام رسان، آنزیم های آنتی اکسیدانی و متابولیسم کربوهیدرات در گیاهان به عنوان انگیزش مقاومت سیستمیک نقش دارند. با توجه به اینکه تنش های غیر زیستی مانند شوری، خشکی، دمای بالا و پایین، شرایط اسیدی، شدت نور و کمبود مواد غذایی بر کاهش عملکرد محصول ها اثر می گذارند (۳)، هر فن آوری که بتواند بر این محدودیت ها غلبه کند، موجب افزایش امنیت غذایی نیز می شود.

با توجه به اهمیت موضوع گفته شده به نظر می رسد که میکروبیوم گیاهی و به طور ویژه باکتری های محرک رشد گیاه در دستیابی گیاه به مواد غذایی و مقاومت گیاه در برابر بیماری و تنش های غیر زیستی حائز اهمیت باشند. از جمله باکتری های محرک رشدی که می تواند در این زمینه موثر واقع شود، باکتری هالوموناس^۱ است. هالوموناس باکتری هوازی و نمک دوست می باشد که توانایی بقا در شرایط شوری بالا را دارد. لذا در پژوهش حاضر تلاش گردید که اثر کاربرد باکتری هالوموناس بر برخی از ویژگی های فیزیولوژیک و زیست شیمیایی گیاه ریحان بنفش در شرایط تنش شوری، به منظور کاهش اثرهای تنش شوری و افزایش تحمل گیاه ریحان در برابر شرایط تنش، مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۷ در آزمایشگاه بخش علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز به صورت طرح به طور کامل تصادفی اجرا شد. تیمارهای آزمایشی این پژوهش شامل؛ شاهد (Ctl)، شوری صفر و تلقیح با باکتری هالوموناس (Ctl.H)، شوری ۵۰ میلی مولار سدیم کلرید و تلقیح با باکتری هالوموناس (S1H)، شوری ۱۰۰ میلی مولار سدیم کلرید و تلقیح با باکتری هالوموناس (S2H) و شوری ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلرید و تلقیح با باکتری هالوموناس (S3H) بودند. در این پژوهش بذر ریحان بنفش از شرکت فردین کشت تهیه شد. بذرها در انتهای اسفند در گلدان های پلاستیکی با حجم نیم لیتر، پر شده با پرلایت (با اندازه ریز ۰/۵ تا یک میلی متر) کشت شد و در شرایط محیطی کنترل شده درون دستگاه تندش بذر (رطوبت نسبی حدود ۷۵

درصد، دمای شب ۱۹ درجه سلسیوس، دمای روز ۲۵ درجه سلسیوس، طول مدت نور ۱۶ ساعت و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس) پرورش داده شدند. جهت مطالعه ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی، باکتری هالوموناس در محیط براث نوترینت^۱ (در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و گردش ۱۲۰ دور در دقیقه درون دستگاه لرزا) کشت شدند. سپس ۴ بذر مایه‌زنی شده در گلدان های پلاستیکی پرورش داده شد. گیاهان با شروع تندش و پیدایش برگ لپه‌ای با محلول یک‌چهارم هوگلند، با پیدایش برگ حقیقی اولیه با محلول نیم‌هوگلند و در نهایت با هوگلند کامل مورد تغذیه قرار گرفتند. محلول‌دهی به صورت یک روز در میان انجام شد. با رسیدن گیاهان به اندازه مطلوب (۸-۶ برگی) تیمار شوری اعمال شد. جهت جلوگیری از وارد شدن تنش اسمزی به گیاه، اعمال تیمارهای شوری به صورت تدریجی انجام شد و گیاهان به مدت سه هفته در این تیمار قرار گرفتند. در پایان آزمایش، ویژگی‌های زیست شیمیایی شامل رنگدانه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a, b و کل و کارتنوئیدها)، پرولین، فلاونوئید، پروتئین، فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، سوپراکسیددیسموتاز (SOD) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری رنگدانه‌های کلروفیل و کارتنوئید پس از نمونه‌گیری از برگ‌های توسعه یافته از روش Arnon و همکاران (۲) استفاده گردید. بدین صورت که ابتدا ۰/۱ گرم از تکه‌های برگ تازه در داخل لوله آزمایش قرار داده شد، سپس ۱۰ میلی‌لیتر از دی متیل سولفوکساید بر روی آن‌ها ریخته شد و در دستگاه انکوباتور به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. در نهایت با استفاده از روش اسپکتروفتومتر، جذب عصاره‌ها در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر خوانده شدند. میزان پرولین پس از استخراج عصاره از برگ به روش Karimi و همکاران (۱۲) انجام گرفت. بدین صورت که ابتدا، ۰/۱ گرم برگ، از هر نمونه به همراه ۱۰ میلی‌لیتر متانول درون لوله آزمایش قرار گرفت. سپس لوله‌ها درون ظرفی، داخل حمام آب گرم (شرایط کاملاً تاریک و دمای ۴۰ درجه سلسیوس) به مدت ۳ ساعت، گذاشته شد. سپس عصاره رویی همگن شده توسط کاغذ صافی واتمن صاف شد. معرف ناین هیدرین (برای تهیه این معرف ۲/۲۵ گرم ناین هیدرین، ابتدا در ۵۴ میلی‌لیتر اسیداستیک گلاشیال حل نموده و ۳۶ میلی‌لیتر فسفریک اسید ۶ مولار به آن اضافه شد) و ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر به مخلوط معرف ناین هیدرین اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر عصاره و ۲۵۰ میکرولیتر از (معرف ناین هیدرین، آب) را به درون میکروتیوب منتقل شدند، و میکروتیوب‌ها در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ دقیقه، درون انکوباتور قرار گرفتند. بلافاصله پس از خارج کردن نمونه‌ها از انکوباتور، نمونه‌ها سرد شدند. بعد از انکوبه شدن، ۲۵۰ میکرولیتر محلول را به درون میکروپلیت منتقل شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۵ نانومتر خوانده شد. از متانول و مخلوط واکنش به عنوان بلانک استفاده شد. میزان اسیدآمین پرولین، با استفاده از منحنی استاندارد پرولین خالص (L-پرولین) بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر نمونه محاسبه گردید. میزان تغییرها در متابولیت فلاونوئید به روش Sembiring و همکاران (۲۰) در طول موج ۴۱۵ نانومتر با دستگاه Epoch (مدل Bio Tek Instruments/USA) اندازه‌گیری شد. میزان پروتئین به روش Bradford و همکاران (۵) و میزان فعالیت آنزیم‌های APX و CAT به ترتیب بر اساس کاهش جذب در طول موج ۲۹۰ و ۲۴۰ نانومتر به روش Sun و همکاران (۲۴) و میزان فعالیت آنزیم SOD بر اساس کاهش جذب در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Dynamica/Halo XB-10) به روش Giannopolitis و همکاران (۹) اندازه‌گیری شد.

واکاوی داده‌ها با استفاده از نرم افزار R و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

کلروفیل a

نتیجه‌های حاصل از بررسی تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارها در سطح احتمال ۵٪ بر میزان کلروفیل a معنی‌دار بود. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس موجب افزایش معنی‌داری در میزان کلروفیل a در سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به میزان ۳۰/۱۶ و ۱۶/۸۸ درصد نسبت به شاهد و کاهش آن به میزان ۱۵/۵۶ درصد در شرایط بدون تنش (CtI.H) نسبت به شاهد (CtI) شد، اما در سطح ۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و هالوموناس (S1H) میزان کلروفیل a افزایش یافت (۹/۹۱ درصد) که این افزایش معنی‌دار نبوده است (شکل ۱).

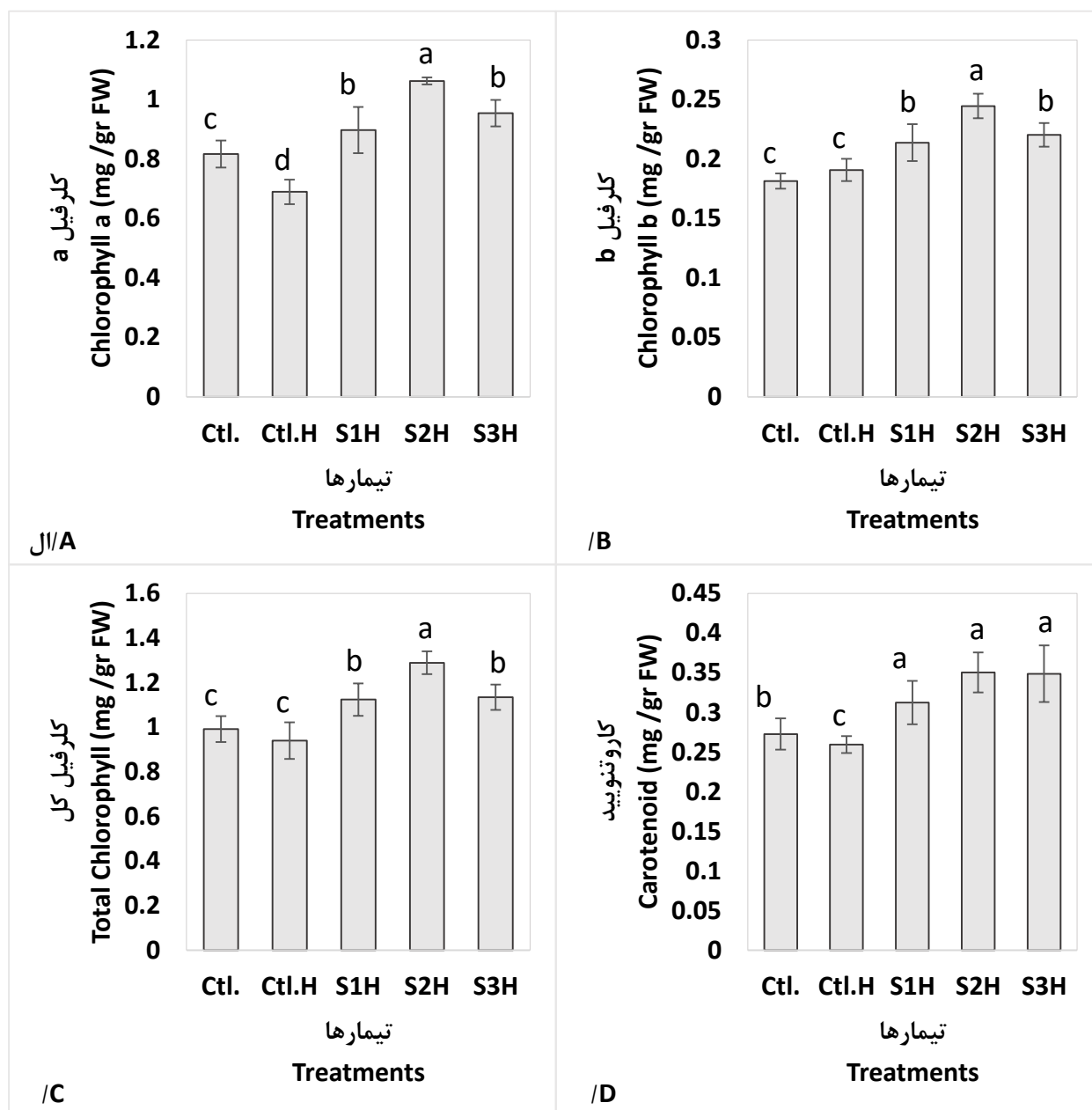


Fig. 1. Effect of different levels of salt and application of *Halomonas* sp. on photosynthetic pigments (a, b and total chlorophyll) (A,B,C) and carotenoids (D). Error bars indicate the standard deviation. Columns with the same letters have no significant difference at the 5% level of probability using LSD test.

شکل ۱- اثر سطوح مختلف شوری و کاربرد هالوموناس بر رنگدانه‌های فتوسنتزی (کروفیل a، کروفیل b، کلروفیل کل) (الف، ب، پ) و کارتنوئید (ت). نوار خطا نمایانگر خطا از استاندارد می‌باشد. ستون‌های دارای حرف‌های مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD ندارند.

کلروفیل b

اثر سطوح تیمار شوری و هالوموناس در سطح احتمال ۵٪ بر میزان کلروفیل b معنی‌دار شده‌است. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس موجب افزایش معنی‌داری در میزان کلروفیل b در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به ترتیب به میزان ۱۷/۸، ۳۴/۷۸ و ۲۱/۴۴ درصد نسبت به شاهد شد، اما در شرایط بدون تنش (Ctl.H) نسبت به شاهد (Ctl) افزایش آن (۵/۱۲ درصد) معنی‌دار نگردید (شکل ۱).

کلروفیل کل

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به میزان کلروفیل کل بیان داشت که اثر تیمارها در سطح احتمال ۵٪ بر میزان کلروفیل کل معنی‌دار بود. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس موجب افزایش معنی‌داری در میزان کلروفیل کل در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به میزان ۱۳/۳۳، ۲۹/۹۸ و ۱۴/۳۴ درصد نسبت به شاهد و کاهش آن به میزان ۵/۲ درصد در شرایط بدون تنش (Ctl.H) نسبت به شاهد (Ctl) شد (شکل ۱).

کاروتنوئید

بر اساس بررسی‌های صورت گرفته از جدول تجزیه واریانس، اثر تیمارها در سطح احتمال ۵٪ بر میزان کاروتنوئید معنی‌دار بود. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس و افزایش سطح شوری (سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) در میزان کاروتنوئید، به ترتیب ۲۸/۵۳ درصد و ۲۷/۸۷ درصد افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد از خود نشان داد. همچنین این میزان در شرایط بدون تنش (Ctl.H) نسبت به شاهد (Ctl) کاهش یافت (۴/۸۷ درصد) که این کاهش معنی‌دار نشد و در سطح ۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و هالوموناس میزان کاروتنوئید افزایش یافت (۱۴/۶ درصد) که این افزایش نیز معنی‌دار نبود (شکل ۱).

پرولین

اثر تیمارهای به کار برده شده در سطح احتمال ۵٪ بر میزان پرولین معنی‌دار بود. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که میزان پرولین پس از مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس و شوری در تمام سطوح نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد که این افزایش به ترتیب برای سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و هالوموناس، ۵۸/۹۲، ۵۹/۸ و ۴۶/۵۱ درصد و در شرایط بدون تنش (Ctl.H) نسبت به شاهد (Ctl) ۴۳/۶۴ درصد بود (شکل ۲).

فلاونوئید

تجزیه و تحلیل جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح تیماری شوری و هالوموناس در سطح احتمال ۵٪ بر میزان فلاونوئید معنی‌دار شده است. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس موجب افزایش معنی‌داری در میزان فلاونوئید در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به ترتیب به میزان ۹۰/۹۲، ۸۱/۲۰ و ۳۸/۸۹ درصد نسبت به شاهد شد، اما در شرایط بدون تنش (Ctl.H) نسبت به شاهد (Ctl) افزایش آن (۱۸/۷۶ درصد) معنی‌دار نگردید (شکل ۲).

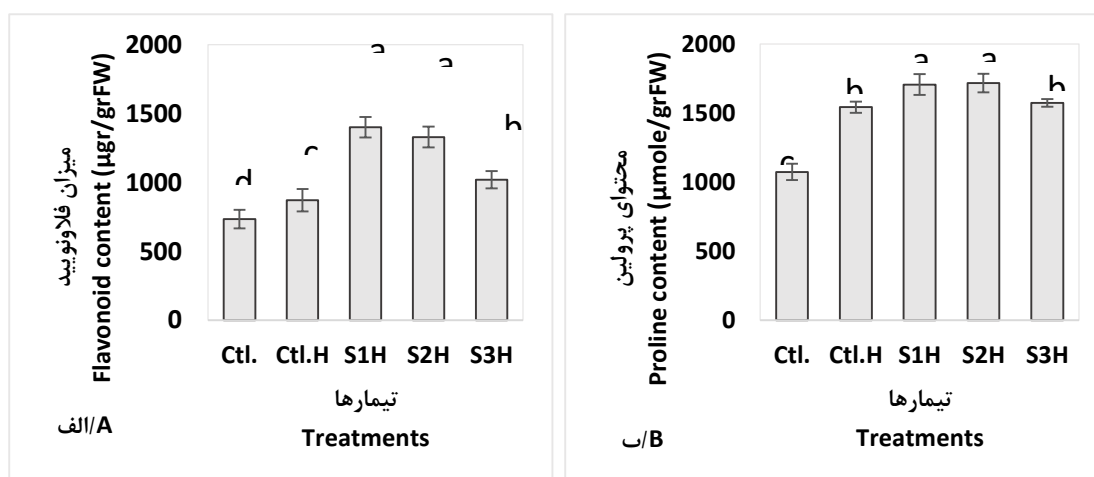


Fig. 2. Different level of salt concentrations and application of *Halomonas* sp. on flavonoid (A) and proline (B) content. Error bars indicate the standard deviation. Columns with the same letters have no significant difference at the 5% level of probability using LSD test.

شکل ۲- سطوح مختلف شوری و کاربرد هالوموناس بر میزان فلاونوئید (الف) و محتوای پرولین (ب). نوار خطی نمایانگر خطا از استاندارد می‌باشد. ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD ندارند.

پروتئین

بررسی حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارها در سطح احتمال ۵٪ بر میزان پروتئین معنی‌دار بود. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه زنی‌بذر با باکتری هالوموناس و شوری در تمام سطوح تیماری نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد که این افزایش به ترتیب برای سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و هالوموناس، به ترتیب ۱۶/۱۵، ۱۹/۸۵ و ۱۴/۰۳ درصد و در شرایط بدون تنش (Ctl.H) نسبت به شاهد (Ctl) ۱۶/۶۱ درصد بود (شکل ۳).

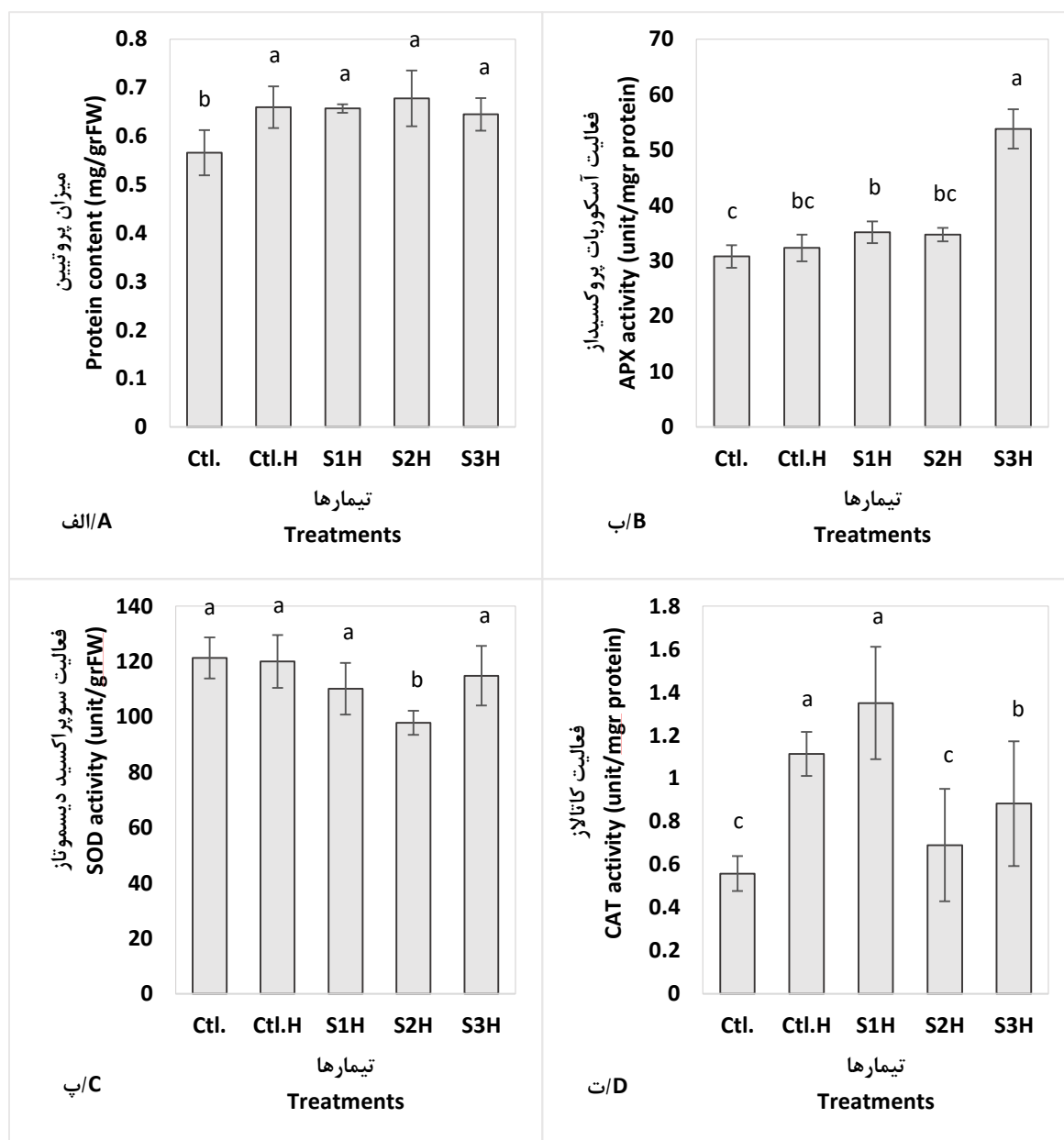


Fig. 3. Different level of salt concentrations and application of *Halomonas* sp. on Protein content (A), Enzyme activity of APX (B), SOD (C) and CAT (D). Error bar indicated the standard deviation. Columns with the same letters have no significant difference at the 5% level of probability using LSD test.

شکل ۳- سطوح مختلف شوری و کاربرد هالوموناس بر میزان پروتئین (الف) و فعالیت آنزیم‌های آسکوربات پراکسیداز (ب)، سوپر اکسید دیسموتاز (پ)، کاتالاز (ت). نوار خطا نمایانگر خطا از استاندارد می‌باشد. ستون‌های دارای حروف مشترک اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ آزمون LSD ندارند.

آسکوربات پراکسیداز

تحلیل‌های حاصل از بررسی جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر سطوح تیماری شوری و هالوموناس در سطح احتمال ۵٪ بر میزان APX معنی‌دار شده است. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس موجب افزایش معنی‌داری در میزان APX در سطوح ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید به ترتیب به میزان ۱۴/۲۰، ۱۲/۸۲ و ۷۴/۸۶ درصد نسبت به شاهد گردید، اما در شرایط بدون تنش (Ctl.H) نسبت به شاهد (Ctl) افزایش آن (۴/۹۹ درصد) معنی‌دار نشد (شکل ۳).

کاتالاز

بازده اثر کاتالاز در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار گردید. بررسی مقایسه میانگین بین تیمارها حاکی از آن بود که مایه‌زنی بذر با باکتری هالوموناس در شرایط بدون تنش (Ctl.H)، تیمار شوری و هالوموناس ۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید (S1H) و S3H نسبت به شاهد (Ctl) افزایش معنی‌داری به میزان ۹۹/۴۸، ۱۴۱/۸۹ و ۵۸/۱۷ درصد داشتند. به هر حال، در تیمار S2H میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نسبت به شاهد (Ctl) معنی‌دار نشد (شکل ۳).

سوپر اکسید دیسموتاز

بررسی‌های صورت گرفته از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارها در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار و با توجه به مقایسه میانگین، میزان فعالیت آنزیم SOD در سطح شوری ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید (S2H) نسبت به شاهد معنی‌دار و در سطوح دیگر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳).

بحث

بر اساس نتیجه‌های به‌دست آمده، مشاهده گردید که با افزایش سطوح شوری و کاربرد هالوموناس میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی (a، b و کل) و کارتنوئیدها افزایش معنی‌داری یافت. در گزارش ماریوس و همکاران (۲۰۰۵) بیان شده است که مایه‌زنی با باکتری‌های محرک رشد در گیاه آفتابگردان باعث افزایش در میزان رنگدانه‌های فتوسنتزی و بهبود در رشد و گلدهی این گیاه نسبت به شاهد می‌گردد و با وجود از بین رفتن مولکول‌های کلروفیل توسط یون‌های عامل شوری، غلظت مولکول‌های باقیمانده در واحد سطح برگ افزایش می‌یابد (۱۵). از راهکارهای مهم جهت تأمین عناصر یونی مفید برای گیاه تلقیح گیاهان با میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات و تثبیت‌کننده‌های نیتروژن می‌باشد که در نتیجه آن می‌توان افزایش رشد، فتوسنتز و تولید ماده خشک در گیاهان را مشاهده کرد. در پژوهش حاضر نتیجه‌های مربوط به اندازه‌گیری پرولین نشان از افزایش در تولید این متابولیت در گیاه را داشت. بر اساس مطالعه‌های پیشین، گیاهان جهت مقابله با تنش شوری اسمولیت‌هایی از جمله پرولین را تولید و انباشت می‌کنند که می‌تواند به تنظیم اسمزی، حفاظت از پروتئین‌ها و آنزیم‌ها و به‌عنوان یک ذخیره نیتروژن برای دوره پس از تنش استفاده شود (۵). شوری در باکتری‌های شور دوست موجب افزایش بیان ژن‌های زیست‌ساخت پرولین می‌شود که نتیجه آن انباشت پرولین در گیاه می‌باشد (۲۰). نتیجه‌های ما در راستای نتیجه‌های دیگر پژوهشگران نشان داد که مایه‌زنی ریحان با باکتری محرک رشد، موجب افزایش سطح پرولین می‌گردد (۱). در رابطه با میزان پروتئین محلول نتیجه‌های پژوهش حاضر حاکی از افزایش در میزان تولید پروتئین گیاه در تنش شوری و کاربرد باکتری هالوموناس می‌باشد که این افزایش ممکن است ناشی از فعال شدن برخی از ژن‌های تحمل به تنش و یا کاهش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده پروتئین‌ها باشد. همچنین، ممکن است که تشکیل پروتئین به جهت تنظیم اسمزی و در نهایت ممانعت از کاهش آب گیاه باشد (۱۸). گزارش شده است که تاثیر تنش شوری بر محتوای پروتئین بستگی به غلظت کلرید سدیم دارد. بدین معنا که در سطوح پایین کلرید سدیم، محتوای پروتئین افزایش و در سطوح بالاتر موجب کاهش محتوای پروتئین در ساقه و برگ گردیده است (۱۳). همچنین، این پژوهشگران نشان داده‌اند که در تنش شوری میزان محتوای پروتئین در برگ ریحان سبز کاهش یافته است. از سوی دیگر نیز گزارش شد که میزان پروتئین در تنش شوری در ریحان در سطح ۸۰ میلی‌مولار کلرید سدیم افزایش یافته است. با توجه به نتیجه‌های بالا می‌توان پیشنهاد داد که پاسخ گیاه ریحان به تنش شوری به رقم گیاه و میزان غلظت کلرید سدیم بستگی دارد (۲۱). از دیگر راه‌های مقابله گیاهان به تنش شوری افزون بر تولید اسمولیت‌هایی مانند پرولین، افزایش و انباشت متابولیت‌های ثانویه مانند فلاونوئیدها و ترکیب‌های نیتروژن‌دار می‌باشد. بر اساس نتیجه‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر با افزایش میزان

نمک سدیم کلرید و کاربرد باکتری محرک رشد هالوموناس میزان تولید فلاونوئیدها نیز افزایش معنی داری یافت. تولید و تجمع متابولیت‌هایی از جمله فلاونوئیدها در واکوئل یاخته‌های گیاه با توجه به ارتباطی که با آنزیم پراکسیداز دارند باعث افزایش فعالیت بازدارندگی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود (۱۷). تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان گیاه ریحان در تیمارهای بیان شده بیان گر افزایش در میزان فعالیت این آنزیم‌ها بود که در این رابطه و بر اساس گزارش‌های سال‌های گذشته گیاهان برای جلوگیری از آثار مخرب گونه‌های فعال اکسیژن از یک سیستم آنزیمی پیچیده استفاده می‌کنند که شامل آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، پراکسیداز، پلی‌فنول اکسیداز و دیگر آنزیم‌های آنتی اکسیدان است که میزان فعالیت این آنزیم‌ها بسته به گونه گیاهی و شدت تنش تغییر می‌کند. در پژوهشی روی کاهو، هان و لی (۲۰۰۵) گزارش کردند که با افزایش میزان شوری به طور معنی داری فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مانند کاتالاز و پراکسیداز افزایش یافت و با کاربرد باکتری محرک رشد همزمان با تنش شوری از میزان خسارت اکسیداتیو کاسته و فعالیت آنزیم‌ها نیز کاهش یافت (۱۱). پژوهشگران دیگر با آزمایش روی گیاه *Broussonetia papyrifera* در سطح‌های شوری ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم نشان دادند که آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز کاهش و سوپر اکسید دیسموتاز در برگ‌ها تغییری نداشت؛ در صورتی که میزان این سه آنزیم در ساقه به صورت معنی داری افزایش نشان داد (۲۶).

نتیجه‌گیری

نتیجه‌های حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که مایه‌زنی بذر گیاه ریحان با باکتری محرک رشد هالوموناس منجر به بهبود پارامترهای فیزیولوژیک (میزان رنگدانه فتوسنتزی) و زیست‌شیمیایی (میزان پرولین، پروتئین محلول، فلاونوئید، آنزیم آنتی‌اکسیدانی آسکوربات پراکسیداز) در تنش شوری می‌گردد و توانایی تحمل به تنش شوری را در گیاه ریحان افزایش می‌دهد. در مجموع می‌توان پیشنهاد داد مایه‌زنی بذر گیاه ریحان با باکتری هالوموناس موجب افزایش تحمل به تنش شوری گیاه ریحان می‌گردد.

References

منابع

- Agami, R.A., R.A. Medani, I.A. Abd El-Mola, and R.S. Taha. 2016. Exogenous application with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) or proline induces stress tolerance in basil plants (*Ocimum basilicum* L.) exposed to water stress. *Inter. J. Agr. Environ. Res.* 2(5): 78-93.
- Arnon, A.N. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. *Agron. J.* 23(1): 112-121.
- Bailey-Serres, J. and L. Voesenek. 2008. Flooding stress: acclimations and genetic diversity. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 313-339.
- Barea, J.M., M.J. Pozo, R. Azcon, and C. Azcon-Aguilar. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 56(417): 1761-1778.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248-254.
- Danesi, F., S. Elementi, R. Neri, M. Maranesi, L.F. D'Antuono, and A. Bordoni. 2008. Effect of cultivar on the protection of cardiomyocytes from oxidative stress by essential oils and aqueous extracts of basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agr. Food Chem.* 56(21): 9911-9917.
- Droge, B., H. Doré, S. Borland, F. Wisniewski-Dyé, and C. Prigent-Combaret. 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants? *Res. Microbiol.* 163(8): 500-510.
- Gad, N. 2005. Interactive effect of salinity and cobalt on tomato plants. II. Some physiological parameters as affected by cobalt and salinity. *Res. J. Agr. Biol. Sci.* 1(3): 270-276.

9. Giannopolitis, C.N. and S.K. Ries. 1977. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59(2): 309-314 .
10. Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169(1): 30-39 .
11. Han, H.S. and K.D. Lee. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *J. Agr. Biol. Sci.* 1: 210-215
12. Karimi, H.R. and S. Nasrolahpour-Moghadam. 2016. Male pistachio seedlings exhibit more efficient protective mechanisms than females under salinity stress. *Sci. Hortic.* 211: 118-125 .
13. Khedr, A.H.A., M.A. Abbas, A.A.A. Wahid, W.P. Quick, and G.M. Abogadallah. 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *J. Exp. Bot.* 54(392): 2553-2562 .
14. La Pena, R.D. and J. Hughes. 2007. Improving vegetable productivity in a variable and changing climate .
15. Marius, S., A. Octavita, U. Eugen, and A. Vlad. 2005. Study of a microbial inoculation on several biochemical indices in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genet. Mol. Biol.* 12(2): 11-17.
16. Masson-Boivin, C., E. Giraud, X. Perret, and J. Batut. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17(10): 458-466 .
17. Mirokili, F., A. Mosleh, M. Sarfzar Ardakani, and H. Sodaizadeh .2018. Investigation of the effect of salinity stress on some morphological, biochemical and antioxidant responses of the medicinal plant *Securigera securidaca* L. *Ecophytochemistry of medicinal plants*, 6 (1): 44-55. (In Persian)
18. Parida, A.K. and A.B. Das. 2004. Effects of NaCl stress on nitrogen and phosphorous metabolism in a true mangrove *bruguieva parviflora* grown under hydroponics culture. *Plant Physiol.* 161:921-928
19. Saum, S.H. and V. Müller. 2007. Salinity-dependent switching of osmolyte strategies in a moderately halophilic bacterium: glutamate induces proline biosynthesis in *Halobacillus halophilus*. *J. Bacteriol.* 189(19): 6968-6975 .
20. Sembiring, E.N., B. Elya, and R. Sauriasari. 2018. Phytochemical screening, total flavonoid and total phenolic content and antioxidant activity of different parts of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. *Pharmacogn. J.* 10(.1).
21. Silva, H., A.A. Neto, R. Menezes, P. Silva, and H. Gheyi. 2019. Use of hydrogen peroxide in acclimation of basil (*Ocimum basilicum* L.) to salt stress. *Turk. J. Bot.* 43(2): 208-217 .
22. Singh, A.K. and S.K. Dubey. 2016. Current trends in Bt crops and their fate on associated microbial community dynamics: A review. *Protoplasma*, 253(3): 663-681 .
23. Smith, D.L., V. Gravel, and E. Yergeau. 2017. Signaling in the Phytomicrobiome. *Front. Plant. Sci.* 8, 611 .
24. Sun, J., J. Gu, J. Zeng, S. Han, A. Song, F. Chen, W. Fang, J. Jiang, and S. Chen. 2013. Changes in leaf morphology, antioxidant activity and photosynthesis capacity in two different drought-tolerant cultivars of chrysanthemum during and after water stress. *Sci. Hort.* 161: 249-258 .

25. Yang, J., J.W. Kloepper, and C.M. Ryu. 2009. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. Trends Plant Sci. 14(1), 1-4 .
26. Zhang, M., Y. Fang, Y. Ji, Z. Jiang, and L. Wang. 2013. Effects of salt stress on ion content, antioxidant enzymes and protein profile in different tissues of *Broussonetia papyrifera*. S. Afr. J. Bot. 85: 1-9 .

Effect of Seed Inoculation with Halophile Growth-Promoting Bacteria on Physiological and Biochemical Properties of Purple Basil under Salinity Stress

A. Salimi, M. Etemadi*, S. Eshghi, A. Karami, S.S. Mousavi¹

An experiment with a completely randomized design and four replications was done to study the effects of seed bio-priming of purple basil (*Ocimum basilicum* L.) with *Halomonas* sp. and to reduce the effects of salinity stress on the physiological and biochemical characteristics of this plant. The experimental treatments were control (Ctl), 0 mM NaCl + *Halomonas* sp. (Ctl.H), 50 mM NaCl + *Halomonas* sp. (S1H), 100 mM NaCl + *Halomonas* sp. (S2H), and 150 mM NaCl + *Halomonas* sp. (S3H). This study showed that bio-priming of seeds with *Halomonas* sp. increased the content of photosynthetic pigments (chlorophyll *a* by 30.16%, chlorophyll *b* by 34.78%, and total chlorophyll by 29.98% in S2H treatment), carotenoids (28.53% in treatment S2H), proline and protein (59.80% and 19.85% in S2H treatment), flavonoids (90.92% in S1H treatment) and also increased ascorbate peroxidase activity (74.86% in S3H treatment) compared to control. In general, purple basil seed bio-priming with *Halomonas* sp. leads to an increase in physiological and biochemical parameters and improve plant tolerance against salinity stress.

Keywords: Plant growth promoting bacteria, photosynthetic pigments, proline, antioxidant enzymes.

1. Former M.Sc. Student, Assistant Professor, Professor, Associate Professor and Ph.D. Student, Department of Horticultural Science, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, respectively.

* Corresponding Author, Email: (m.etemadi@shirazu.ac.ir).