

# اثر تلقیح باکتری *ازتوباکتر* بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی و مولکولی گیاه ریحان تحت تنش شوری

فائزه بختیاری<sup>۱</sup>، زهرا رضایتمند<sup>۲\*</sup> و زرین دخت امامی کرون<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

<sup>۲</sup> گروه زیست‌شناسی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

<sup>۳</sup> گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۰۱

## چکیده

مقاومت به شوری در گیاهان یک ویژگی خاص برای کشاورزی به شمار می‌آید، زیرا شوری خاک یکی از عوامل محدود کننده رشد می‌باشد. باکتری‌های محرک رشد گیاه با مکانیسم‌های متفاوتی باعث تعدیل اثرات تنش‌های محیطی در گیاهان می‌شوند. بر همین اساس آزمایشی گلخانه‌ای بصورت فاکتوریل در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام گردید. تیمارهای آزمایش شامل شوری (۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم) و باکتری *ازتوباکتر* بود که روی گیاه ریحان انجام گردید. نتایج نشان داد که در تیمار تنش شوری با تلقیح گیاه توسط *ازتوباکتر* وزن خشک و تر گیاه ۲۰٪ نسبت به شرایط فاقد باکتری، در غلظت‌های مختلف شوری افزایش یافت. در تیمار شوری در عدم حضور باکتری افزایش میزان پرولین (۰/۴۸/۶٪) و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان کاتالاز (۰/۰۵۹ واحد)، پراکسیداز (۰/۲۶۳ واحد) و سوپراکسیددیسموتاز (۷/۶ واحد) مشاهده شد و بکار بردن باکتری همراه با تنش شوری باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان و پرولین گیاه شد. در کلیه زمان‌ها تنش شوری باعث افزایش بیان ژن *DRB2* و *p5cs* در گیاه شد و این افزایش در زمان ۷۲ ساعت بیشترین میزان را دارا بود. در عین حال، بکار بردن باکتری همراه با تنش باعث کاهش میزان بیان ژن‌های مورد بررسی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده نقش بسیار مؤثر تیمار با *ازتوباکتر* در کاهش اثرات تنش شوری، فعالیت آنتی اکسیدانی و افزایش بیان ژن‌های دخیل در کنترل تنش در گیاه ریحان است و می‌توان این اثرات را در گیاهان دیگر نیز بررسی کرد.

**واژه‌های کلیدی:** گیاه ریحان، استرس شوری، *ازتوباکتر*، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، پرولین

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: [zrezayatmand12@yahoo.com](mailto:zrezayatmand12@yahoo.com)

## مقدمه

گیاهان در طول دوره زندگی خود در معرض تنش‌های گوناگونی قرار می‌گیرند. تنش باعث ایجاد تغییرات در مورفولوژی، فیزیولوژی و ژنتیک گیاه می‌شود (۲۹) و گیاه ریحان نیز از این قاعده مستثنی نیست (۱). شوری یکی از انواع تنش‌های وارده به گیاهان است. تنش شوری هموستازی پتانسیل آب را شکسته و باعث بروز صدمات یونی می‌گردد که این شکست هموستازی در سطوح سلولی و سطح گیاه (برگ) بروز می‌کند. تغییرات در هموستازی سلول گیاهی باعث بروز صدمات مولکولی، اختلال رشد و حتی مرگ می‌گردد (۲۶).

تحمل شوری به توانایی گیاه در خارج کردن یون سدیم و مکانیسم‌های تحمل و تجمع یون سدیم در بافت‌های گیاهی مربوط می‌شود. تحمل شوری یک ویژگی خاص برای کشاورزی و اهداف صنعتی بشمار می‌آید، زیرا شوری خاک یکی از عوامل محدود کننده اصلی برای رشد محسوب می‌شود و افزایش مقاومت در برابر این تنش و سمیت یون سدیم یک مشخصه ضروری محسوب می‌شود (۹). بر این اساس معرفی ژن‌های مسئول تولید اسمولیت‌ها و نیز شناسایی ژن‌هایی که در سطوح بالای شوری بیان می‌شوند ضروری است (۱۸).

پرولین اسمولیتی سازگار است که قابل انحلال در آب می‌باشد. این آمینو اسید در pH فیزیولوژیک غیرقطبی بوده و در دسته-بندی آمینو اسیدهای آمفی‌پاتیک قرار دارد (۲۵). تجمع پرولین به طرق متفاوتی مقاومت به تنش را تحت تأثیر قرار می‌دهد. برای مثال نشان داده شده پرولین بعنوان یک چپرون مولکولی عمل می‌کند که قادر به حفاظت از تمامیت پروتئین است و فعالیت آنزیم‌های متفاوت را زیاد می‌کند. مشاهده شده که پرولین در شرایط برون تنی موجب کاهش دنا تورا سیون آنزیم‌ها تحت تنش گرمایی یا شوری می‌گردد. مقدار پرولین درون سلولی بوسیله بیوستنز، کاتابولیسیم و انتقال بین سلول‌ها و ارگانل‌های مختلف سلولی تعیین می‌گردد. *P5CR* و *P5CS* آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوستنز پرولین هستند. تجمع پرولین و سایر ترکیبات محلول سبب کاهش پتانسیل اسمزی سلول می‌گردد و در نتیجه موجب جریان آب به داخل سلول می‌شود. این فرآیند پتانسیل تورگر لازم برای انبساط سلولی را فراهم می‌نماید. با توجه به این‌که پرولین در سیتوپلاسم و استرومای کلروپلاست تجمع می‌یابد و این موضوع که سیتوپلاسم حجم کمی از سلول را اشغال می‌کند، بنابراین تغییرات کوچک در میزان پرولین در مقایسه با حجم کم سیتوپلاسم سبب اثرات بزرگ‌تری در تنظیم اسمزی کل می‌گردد (۱۳ و ۱۴).

ارقام وحشی گیاهان دارای خزانه ژنی دست‌نخورده بعنوان منابع مورد نیاز برای ایجاد تنوع زیستی هستند (۲۱ و ۳۳). مطالعات انجام شده در زمینه ژن *P5CR* و *P5CS* نشان داده است که رابطه مستقیمی میان بیان این ژن‌ها و افزایش تجمع پرولین هنگام تنش وجود دارد، بطوری‌که میزان سنتز پرولین در گیاهان در اصل در سطح رونویسی تنظیم می‌گردد. با افزایش تنش‌ها و همچنین افزایش متابولیت‌های سلولی مانند ساکارز و گلوکز و ترکیبات نیتروژن‌دار، بیان ژن *P5CS* افزایش می‌یابد. پروتئین DREB (Dehydration Responsive Element Binding) که اعضای آن نقش اصلی را در تنش‌های غیرزیستی هم-چون شوری، سرما و خشکی دارد و در گیاهان مختلفی مثل جو، برنج، آرابیدوپسیس، گوجه فرنگی، آفتابگردان و غیره شناسایی شده است (۲).

نقش /زتوباکتر در رشد گیاه به‌واسطه تولید هورمون‌های محرک رشد، توان حل‌کنندگی فسفات‌های نامحلول، افزایش جذب عناصر، تثبیت نیتروژن، افزایش مقاومت به تنش‌ها و بیوکنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. نیاز /زتوباکتر به مواد کربنی ساده و قابلیت رشد در کمبود مواد آلی، و ماندگاری طولانی مدت در خاک، از امتیازات این باکتری است. علاوه بر این، با افزایش وزن خشک ریشه و اندام هوایی، رشد گیاه را تحریک می‌کند (۲۳ و ۱۱). مطالعات نشان داده‌اند که تلقیح با /زتوباکتر باعث بهبود مقاومت گیاه به شوری از طریق افزایش محتوای قندهای محلول، پروتئین‌های محلول و پرولین در اندام هوایی و ریشه گیاهان می‌شود (۳ و ۲۲).

ریحان شیرین (*Ocimum basilicum*) یکی از گونه‌های خانواده Lamiaceae با طیف گسترده‌ای از خواص دارویی و غذایی است. این گیاه برای اهداف آشپزی و عطرسازی به خوبی شناخته شده است. علاوه بر این، بطور سنتی برای درمان روماتیسم، کلسترول بالا، فشار خون بالا، سردرد و سکتة مغزی نیز استفاده می‌شود (۳). گونه‌های ریحان به شوری بویژه در مراحل جوانه زنی و سبز شدن نسبتاً مقاوم هستند. با این حال، شوری، بالا موجب کاهش رشد گیاه بخصوص رشد ریشه می‌شود (۵).

هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر تنش شوری بر برخی شاخص‌های رشدی و بیوشیمیایی گیاه ریحان و بررسی تأثیر تلقیح باکتری *ازتوباکتر* بر کاهش اثرات تنش شوری و افزایش بیان ژن‌های (*DRB2* و *p5cs*) دخیل در کنترل تنش در گیاه ریحان بوده است.

## مواد و روشها

**تهیه گیاه:** در تحقیق حاضر از گیاه ریحان شیرین (*Ocimum basilicum*) استفاده شد. اصفهان تهیه شد. در ابتدای کار آزمایشی، بذرها بدون خاک کشت داده شدند. بدین صورت که بذرها در یک سوم خاک، یک سوم پرلیت و یک سوم ورمی کمپوست کشت داده شدند و در نهایت درصد جوانه زنی، رشد و سبز شدن برگ‌ها در هر دو نوع بذر بررسی شد (۱۹) و مشاهده شد که بذر ۱ بسیار مطلوب تر از بذر دوم بود.

**باکتری مورد استفاده:** در مرحله بعد محیط کشت مانیتول آگار جهت کشت *ازتوباکتر* (محیط کشت *ازتوباکتر* شامل ۲۰ گرم مانیتول، ۳ گرم کربنات کلسیم، ۵ گرم سولفات منیزیم، ۲۵ گرم فسفات مونو پتاسیم، ۷۵ گرم فسفات دی پتاسیم، ۴ گرم سولفات آهن، دو گرم موجودات سدیم، آگار آگار ۲۰ گرم و ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر با pH ۷/۲) ساخته شد (۷). این محیط فاقد هر نوع منبعی نیتروژن است بنابراین تنها میکروارگانیسم‌هایی که قادر به تثبیت ازت هستند، می‌توانند روی آن رشد کنند. با توجه به وجود مولیبدن در آنزیم نیتروژن آز حضور مولیبدات سدیم  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  در ترکیب محیط کشت ضروری است. برای کاشت بذرها، تیمارهای دارای باکتری و فاقد باکتری استفاده شد. بدین صورت که در تیمارهای فاقد باکتری: چهار تکرار کنترل (بدون تیمار شوری)، چهار تکرار با غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک، چهار تکرار با غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک و چهار تکرار با غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک در نظر گرفته شد. در حالی که در تیمارهای واجد باکتری: چهار چهار تکرار کنترل (بدون تیمار شوری)، چهار تکرار با غلظت ۱۰۰ میلی مولار نمک، چهار تکرار با غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک و چهار تکرار با غلظت ۲۰۰ میلی مولار نمک در نظر گرفته شد (۳۱).

**اعمال تنش شوری و تیمار گیاه با باکتری:** باکتری‌ها در محیط مانیتول براث کشت داده شدند و بمدت یک هفته در ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوباتورگذاری شدند تا جذب نوری کشت در طول موج ۶۰۰ نانومتر به ۰/۷ برسد. سپس محتویات داخل ارلن سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل با سرم فیزیولوژی استریل شست و شو داده شد. در مرحله بعد، بذرها بمدت ۶۰ دقیقه روی شیکر در سوسپانسیون فوق‌قرار داده شدند. بذرهاى تلقیح شده سپس در گلدان‌های حاوی خاک باغچه به علاوه ۲۰ درصد پرلیت و ۳۰ درصد ورمی کمپوست کشت داده شد و پس از جوانه زنی و رسیدن گیاهچه به مرحله ۶ تا ۸ برگ، گلدان‌ها بصورت یکروز در میان بمدت دو هفته با محلول نمک کلرور سدیم با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار آبیاری شدند. غلظت نهایی و انتخابی برای آزمایش‌های بعدی ۱۵۰ میلی مولار بود، زیرا که در ۲۰۰ میلی مولار نکروز گیاهی مشاهده گردید. گیاهان در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اتمام تیمار جهت بررسی بیان ژن و یک هفته پس از اتمام تیمار بمنظور بررسی شاخص‌های رشد گیاه و فعالیت پرولین و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی (کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز) برداشت گردید.

**اندازه‌گیری پرولین:** پرولین با استفاده از معرف نین‌هیدرین با روش رنگ سنجی اندازه‌گیری شد. برای این منظور، ۰/۵ گرم از بافت تر گیاهی از هر نمونه در ۱۰ میلی لیتر محلول ۳٪ اسید سولفوسالیسیلیک سائیده شد. مخلوط همگن حاصل با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۲ صاف شد. سپس از هر کدام از محلول‌های حاصل ۲ میلی لیتر در لوله آزمایش ریخته شد و به آن

۲ میلی‌لیتر معرف نین‌هیدرین و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک خالص اضافه شد. در مرحله بعد، همه لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری جوش قرار داده شدند و سپس با سرعت بر روی یخ سرد شدند. سپس به هر لوله ۴ میلی‌لیتر تولوئن افزوده شد و لوله بشدت تکان داده شد. با ثابت شدن لوله‌ها بمدت ۲۰ ثانیه، دو لایه در آنها تشکیل شد. در نهایت جذب نوری بخش بالایی در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد و غلظت پرولین در هر لوله با استفاده از منحنی استاندارد پرولین محاسبه شد (۱۵).

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان:** ابتدا ۰/۱ گرم از وزن بافت تر گیاهی از هر نمونه با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات نمکی با pH ۷/۴ (حاوی ۱ گرم پلی‌وینیل‌پیرولیدون، ۰/۸ گرم KCL، ۰/۸ گرم NaCl، ۰/۱۴ گرم  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  و ۰/۰۲ گرم  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )، در هاون و روی یخ ساییده و همگن گردید. عصاره حاصل بمدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ g و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و پس از صاف کردن، برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز (EC1.11.1.6)، آسکوربات پراکسیداز (EC 1.11.1.11) و سوپر اکسید دیسموتاز (EC 1.15.1.1) استفاده شد. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس میزان کاهش پراکسید هیدرژن در بافر فسفات سالین با روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بصورت واحد آنزیمی بر حسب پروتئین کل موجود در ۱ گرم بافت گیاهی محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که ۱ میلی‌مول پراکسید هیدرژن را در یک دقیقه تجزیه می‌کند (۲۰). سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از محلول گایاکول و آب اکسیژنه با روش اسپکتروفوتومتری اندازه‌گیری شد. فعالیت آنزیم بصورت واحد آنزیمی بر حسب پروتئین کل موجود در ۱ گرم بافت گیاهی محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی پراکسیداز مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که ۱ میلی‌مول آب اکسیژنه را در یک دقیقه تجزیه می‌کند (۲۰). سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز با استفاده از سنجش مهار نوری نیترو بلو تترازولیم انجام گرفت. نیتروبلو تترازولیم موجود در مخلوط واکنش در حضور نور به فورمازون تبدیل می‌شود. فعالیت آنزیم بصورت واحد آنزیمی بر حسب پروتئین کل موجود در ۱ گرم بافت گیاهی محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی سوپر اکسید دیسموتاز مقدار آنزیمی در نظر گرفته شد که موجب ۵۰ درصد ممانعت از احیای نوری نیتروبلو تترازولیم می‌شود (۳۰).

**استخراج RNA و سنتز cDNA:** استخراج RNA کل از گیاه با استفاده از لیتیوم کلراید با روش Wang و همکاران (۳۲) انجام شد. برای این منظور، ابتدا یک میلی‌لیتر از بافر استخراجی لیتیوم کلراید (حاوی لیتیوم کلراید ۰/۱ مولار، تریس هیدروکلریک اسید ۰/۱ مولار با pH برابر با ۸، EDTA ۰/۰۱ مولار، SDS ۱٪ وزنی حجمی، پلی‌وینیل‌پیرولیدین ۵٪ وزنی حجمی و سدیم سولفیت ۲٪ وزنی حجمی) به ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاه در هاون چینی استریل اضافه شد. سپس، ۸۰۰ میلی‌لیتر از مخلوط فنل اشباع شده با بافر تریس، کلروفرم و ایزوآمیل‌الکل به ترتیب به نسبت ۱:۲۴:۲۵ به هاون اضافه شد. مخلوط تهیه شده به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و بمدت یک دقیقه ورتکس و سپس در ۱۴۰۰۰ دور بمدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. سپس به مایع روئی به میزان هم حجم آن لیتیوم کلراید ۴ مولار اضافه گردید و مخلوط حاصل بمدت ۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس سانتریفیوژ در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام شد و رسوب حاصل در ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. به محلول حاصل، ۲ حجم اتانول سرد (۸۰۰ میکرولیتر) و ۴۰ میکرولیتر استات سدیم ۳ مولار با pH برابر با ۵/۴ اضافه شد. سپس، میکروتیوب در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. جهت شستشوی رسوب، به آن اتانول ۷۰٪ اضافه شد و مخلوط حاصل در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت، اتانول از میکروتیوب خارج شد و بعد از خشک شدن، رسوب RNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. RNA استخراج شده در ۲۰- درجه

سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور بررسی کیفیت RNA استخراج شده برای سنتز cDNA از الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ استفاده شد و در آن از مارکر ۲۸S rRNA برای قطعات بلندتر و از مارکر ۱۸S rRNA برای قطعات کوتاه‌تر استفاده گردید (۶). به منظور سنتز cDNA از کیت شرکت Addbio (کره جنوبی) و بر اساس دستورکار کیت انجام شد.

**انجام Real Time PCR بررسی بیان ژن:** پرایمرهای مورد نیاز برای بررسی بیان ژن‌های *DBR2* کد کننده ردکتاز دو باند شونده (*Double bond reductase*)، *P5CS* کد کننده پرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز (*Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase*) و *rRNA* (کنترل داخلی) این مطالعه با استفاد از نرم افزار GENERUNNER طراحی گردید. توالی mRNA ژن‌های ذکر شده از پایگاه اطلاعاتی NCBI بدست آمد و پس از بررسی و یافتن نواحی حفاظت شده توسط سرور ClustalW، پرایمرهایی با پارامتر و ویژگی‌های بهینه برای انجام Real Time PCR طراحی گردید. به منظور اطمینان از عدم اتصال پرایمرها به توالی‌های غیر اختصاصی از سرور Blast استفاده شد. ژن مرجع انتخابی (کنترل داخلی) در این مطالعه rRNA در نظر گرفته شد. توالی و ویژگی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ قابل مشاهده می‌باشد (۶).

جدول ۱- توالی و ویژگی پرایمرهای طراحی شده ژن‌های مورد مطالعه

شماره دسترسی	فعالیت	طول محصول (جفت باز)	نام ژن	توالی پرایمر	نام پرایمر
LN999821	کنترل داخلی	۱۲۶	<i>rRNA</i>	5'- ACCAGGGATCGGCGGATGTTG-3'	FrrNA
				5'-GTGGTGCCCTTCCGTCAATTC-3'	RrrNA
KC118529.1, KC118524.1 AB926434.1	ردکتاز دو باند شونده	۱۲۲	<i>DBR2</i>	5'- GCTATTAACGCTATTGAAG-3'	DBR2F
				5'- TAATGACCCACCATATTCTAC-3'	DBR2R
JN944116.1, EF527256.1, JQ622685.1	پرولین ۵ کربوکسیلات سنتتاز	۱۱۷	<i>P5CS</i>	5'- TACATAAGGATCTAGAGCAG-3'	P5CSF
				5'-CTTCCGGAATGTTTCAGTTTACC-3'	P5CSR

به منظور انجام واکنش Real Time PCR از دستگاه ABI و ترکیب تشخیصی سایبرگرین (محصول شرکت تجاری Addbio، کره جنوبی) استفاده شد. مواد مورد نیاز به ازای هر نمونه cDNA مطابق جدول ۲ با یکدیگر ترکیب شدند. تمامی واکنش‌ها برای هر نمونه و ژن بصورت دوتایی و در ۴۰ سیکل انجام شد. تمامی وسایل مورد استفاده استریل بودند و ترکیب کردن تمامی مواد بر روی یخ (به منظور جلوگیری از فعال شدن آنزیم و تولید محصول جانبی) انجام پذیرفت. در نهایت نمونه‌های آماده شده در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند. برنامه دمایی و زمانی طبق جدول ۳ به دستگاه داده شد. به منظور بررسی داده‌ها، از رابطه  $\Delta\Delta CT$  (livak) استفاده شد:

$$\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control})$$

جدول ۲- مواد و مقادیر مورد استفاده جهت انجام Real Time RT-PCR

ماده	غلظت استوک	غلظت نهایی	مقدار
آب مقطر (استریل)	.....	.....	۴ $\mu$ l
سایبر گرین	۲X	۱X	۱۰ $\mu$ l
پرایمر رفت	۱۰ $\mu$ M	۰/۲ $\mu$ M	۲ $\mu$ l
پرایمر برگشت	۱۰ $\mu$ M	۰/۲ $\mu$ M	۲ $\mu$ l
cDNA	>۱۰۰ng	>۱۰۰ng	۲ $\mu$ l

جدول ۳- شرایط دمایی و زمانی بهینه جهت انجام Real Time RT-PCR

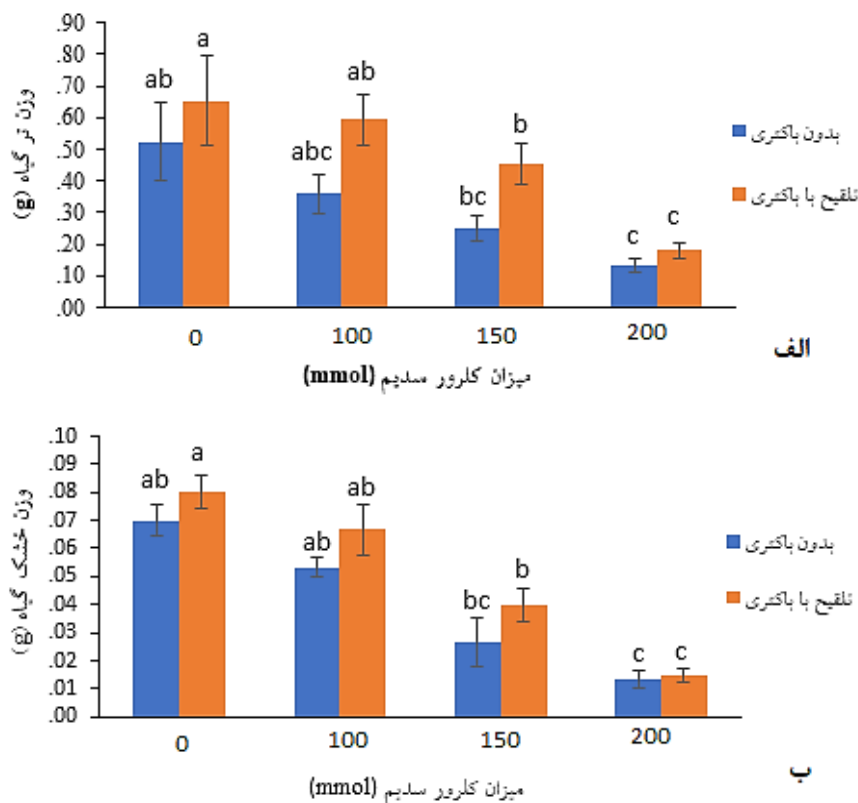
نام مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	مدت زمان	تعداد سیکل
دنا تورا سیون اولیه	۹۵	۵ دقیقه	۱
دنا تورا سیون	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵
متصل شدن پرایمرها	۵۵	۳۰ ثانیه	۳۵
گسترش و مشاهده رنگ فلورسنت	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۵
ذوب	۹۵-۷۸	۵ دقیقه	۱

**آنالیز آماری:** در این مطالعه برای بررسی اختلافات معنی دار بین گروه‌های مختلف از آزمون SPSS ۱۹ استفاده شد. از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن نیز برای آنالیز آماری بهره گرفته شد.

## نتایج

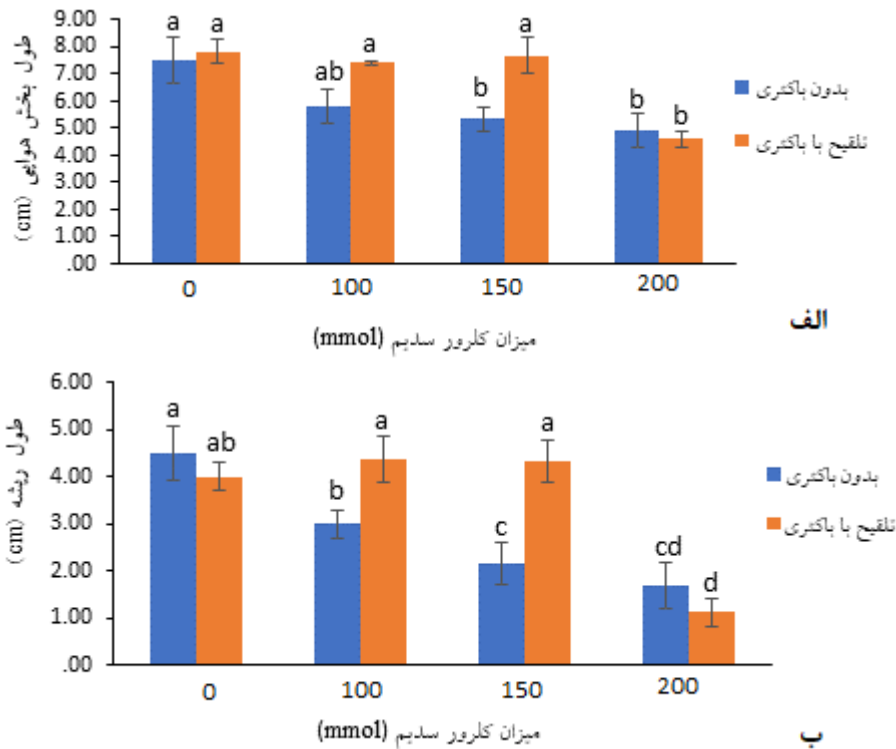
اثر *ازتوباکتر* بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه *ریحان* تحت تنش شوری: در این تحقیق ابتدا اثر غلظت‌های ۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار کلرید سدیم روی برخی شاخص‌های رشد گیاه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج این مرحله چون در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر شوری گیاهان کاهش رشد شدید داشتند و اغلب نکروزه شده و از بین رفتند، این غلظت از شوری برای آزمایش‌های مولکولی در نظر گرفته نشد و حذف شد و غلظت ۱۵۰ میلی مولار شوری برتریب بعنوان آستانه تحمل گیاه به تنش شوری در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

**تأثیر *ازتوباکتر* بر میزان وزن تر و خشک گیاه *ریحان* تحت تنش شوری:** نتایج مقایسه میانگین مربوط به وزن تر و خشک گیاه در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که افزایش میزان شوری بدون حضور باکتری باعث کاهش وزن تر و خشک گیاه شد و این کاهش در غلظت ۲۰۰ میلی مولار شوری نسبت به شاهد بیشترین میزان (۲۰٪) بود. با افزایش میزان شوری میزان تأثیر باکتری بر میزان وزن تر و خشک گیاه کاهش نشان داد.



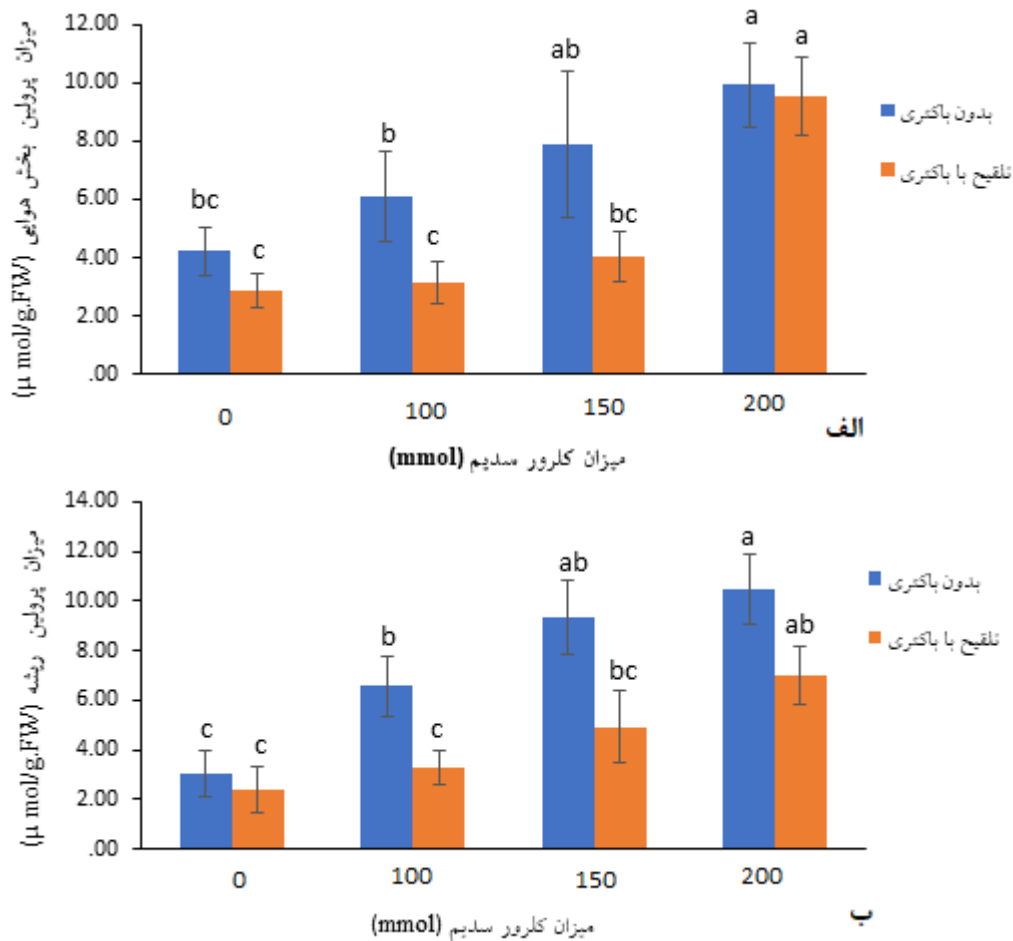
شکل ۱- اثر *ازتوباکتر* بر میزان وزن تر (الف) و خشک (ب) گیاه ریحان تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار می‌باشد و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

**تأثیر *ازتوباکتر* بر طول بخش هوایی و ریشه گیاه ریحان تحت تنش شوری:** نتایج مقایسه میانگین مربوط به طول بخش هوایی و ریشه گیاه در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کلرور سدیم و در عدم حضور باکتری طول بخش هوایی و ریشه گیاه کاهش یافت. نتایج مقایسه میانگین نشان داد که کاربرد باکتری بدون تنش شوری نیز باعث افزایش طول بخش هوایی و ریشه گیاه نسبت به گیاهانی شد که با باکتری تلقیح نشده بودند. نتایج تیمار *ازتوباکتر* و شوری نتایج نشان داد که با تلقیح گیاه توسط *ازتوباکتر* طول بخش هوایی و ریشه نسبت به شرایط فاقد باکتری در غلظت-های مختلف شوری افزایش یافت و بیشترین میزان افزایش طول (۴۳ درصد برای بخش‌های هوایی و ۸۵ درصد برای به ریشه) مربوط به تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار و استفاده از باکتری بود.



شکل ۲- اثر *ازتوباکتر* بر میزان طول بخش هوایی (الف) و ریشه (ب) گیاه ریحان تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار می‌باشد و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

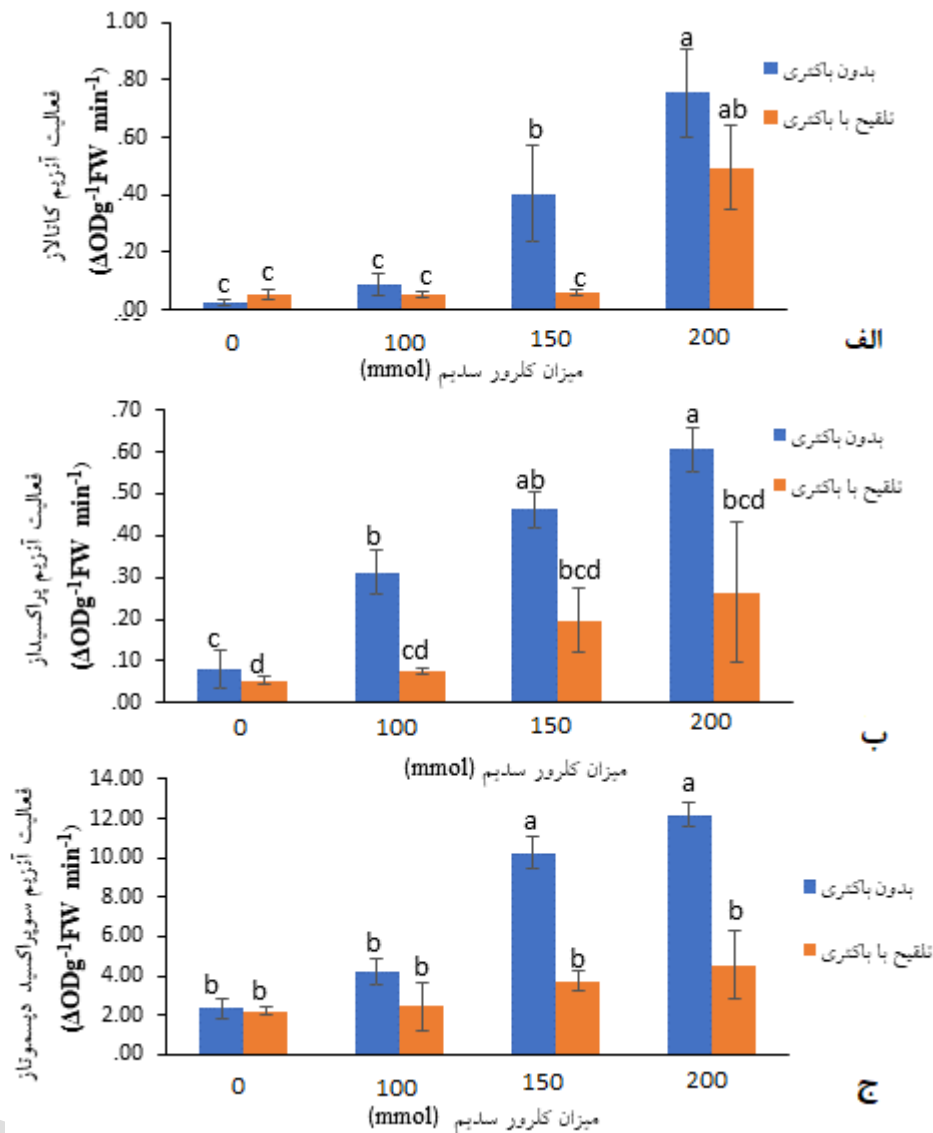
**نتایج تأثیر *ازتوباکتر* بر میزان پرولین بخش هوایی و ریشه گیاه ریحان تحت تنش شوری:** نتایج در شکل ۳ مشاهده می‌شود. مقایسه میانگین مربوط به پرولین بخش هوایی و ریشه گیاه نشان داد که در شرایط عدم حضور باکتری میزان پرولین بخش هوایی و ریشه گیاه با افزایش میزان غلظت کلرور سدیم افزایش یافت و این افزایش، در غلظت ۲۰۰ میلی مولار شوری نسبت به شاهد و سایر غلظت‌ها بیشترین میزان بود. نتایج نشان داد که کاربرد باکتری بدون تنش شوری باعث کاهش میزان پرولین بخش هوایی و ریشه گیاه نسبت به گیاهانی که با باکتری تلقیح نشده بودند گردید. در تیمار توأم *ازتوباکتر* و شوری نتایج نشان داد که با تلقیح گیاه توسط *ازتوباکتر* کاهش میزان پرولین بخش هوایی و ریشه نسبت به شرایط فاقد باکتری در غلظت‌های مختلف شوری شد و بیشترین میزان کاهش پرولین (۴۸/۶٪) مربوط به تنش شوری ۱۵۰ میلی مولار و استفاده از باکتری نسبت به همین میزان تنش و عدم استفاده از باکتری در بخش هوایی گیاه بود.



شکل ۳- اثر ازتوباکتری بر میزان پرولین بخش هوایی (الف) و ریشه (ب) گیاه ریحان تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار می‌باشد و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

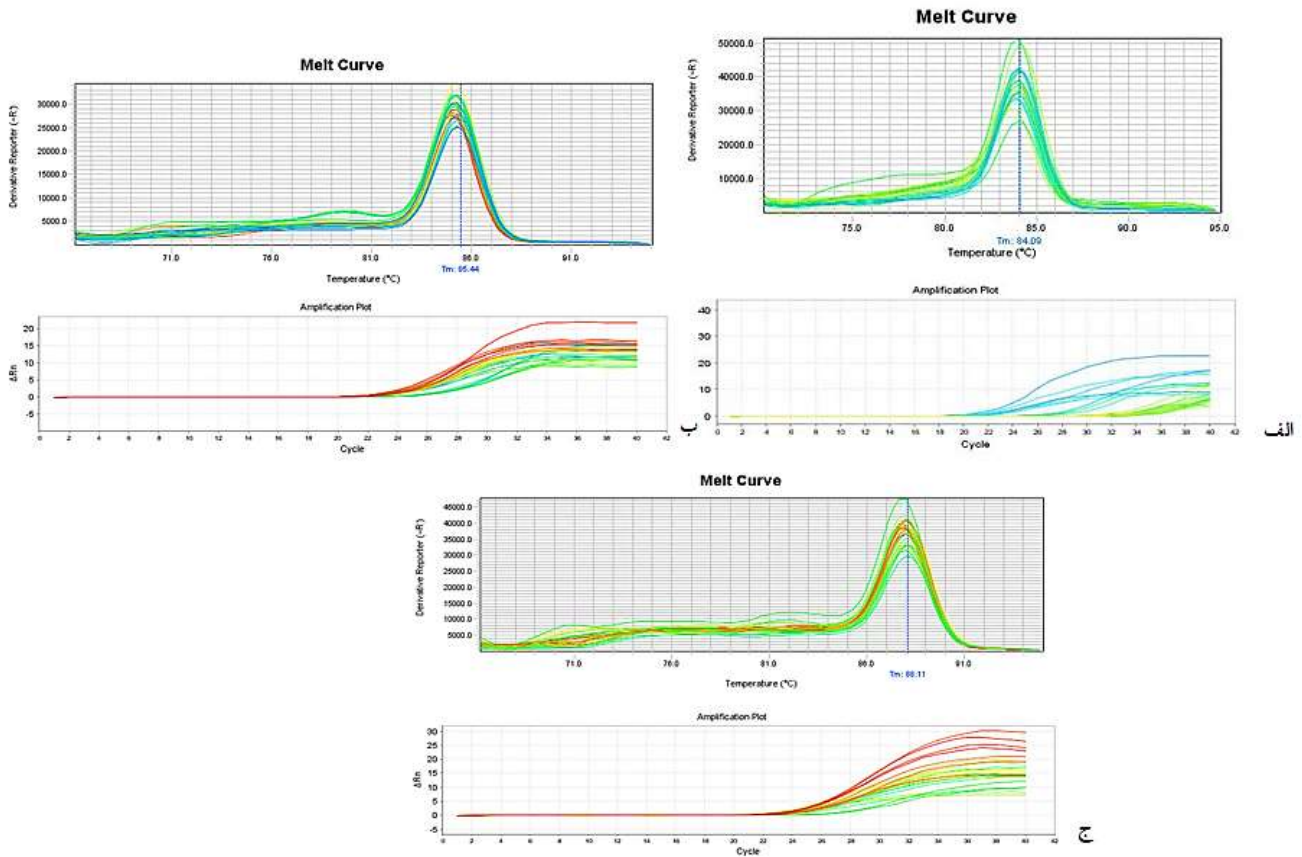
تأثیر ازتوباکتری بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه ریحان تحت تنش شوری: نتایج در شکل ۴ مشاهده می‌شود. فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه با افزایش میزان شوری نسبت به شاهد افزایش یافت و این افزایش در غلظت ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار کلرور سدیم، از مقادیر حداکثری برخوردار بود. در شرایط عدم تنش شوری، کاربرد باکتری تأثیر زیادی در میزان فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت. در مورد اثر توأم تنش شوری و بکار بردن باکتری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش یافت و بیشترین میزان اثر کاهنده باکتری را در غلظت ۱۵۰ میلی مولار نمک با مقدار ۰/۰۵۹ واحد فعالیت آنزیم مشاهده شد. در ارتباط با میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز نیز در شرایط تنش شوری افزایش فعالیت آنزیم مشاهده می‌شود. استفاده از باکتری در شرایط عدم تنش شوری باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم شد. بکار بردن باکتری همراه با تنش شوری باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز شد و بیشترین میزان اثر کاهنده مربوط به کاربرد باکتری در تنش شوری ۲۰۰ میلی مولار با مقدار ۰/۲۶۳ واحد فعالیت آنزیم بود. نتایج مقایسه میانگین مربوط به میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز نشان داد که با افزایش میزان غلظت کلرور سدیم و در عدم حضور باکتری میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز افزایش یافت و بیشترین میزان افزایش فعالیت آنزیم مربوط به غلظت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی مولار نمک بود. استفاده از باکتری در شرایط عدم تنش شوری تأثیر زیادی بر میزان فعالیت آنزیم نداشت. در خصوص نتایج تیمار توأم باکتری و شوری بر میزان فعالیت آنزیم

سوپراکسید دیسموتاز مشاهده شد که در غلظت‌های مختلف شوری میزان فعالیت آنزیم با کاربرد باکتری کاهش یافت و این کاهش در غلظت ۱۵۰ (۶/۵ واحد) و ۲۰۰ میلی مولار (۷/۶ واحد) نمک کلرور سدیم بیشترین مقدار بود.



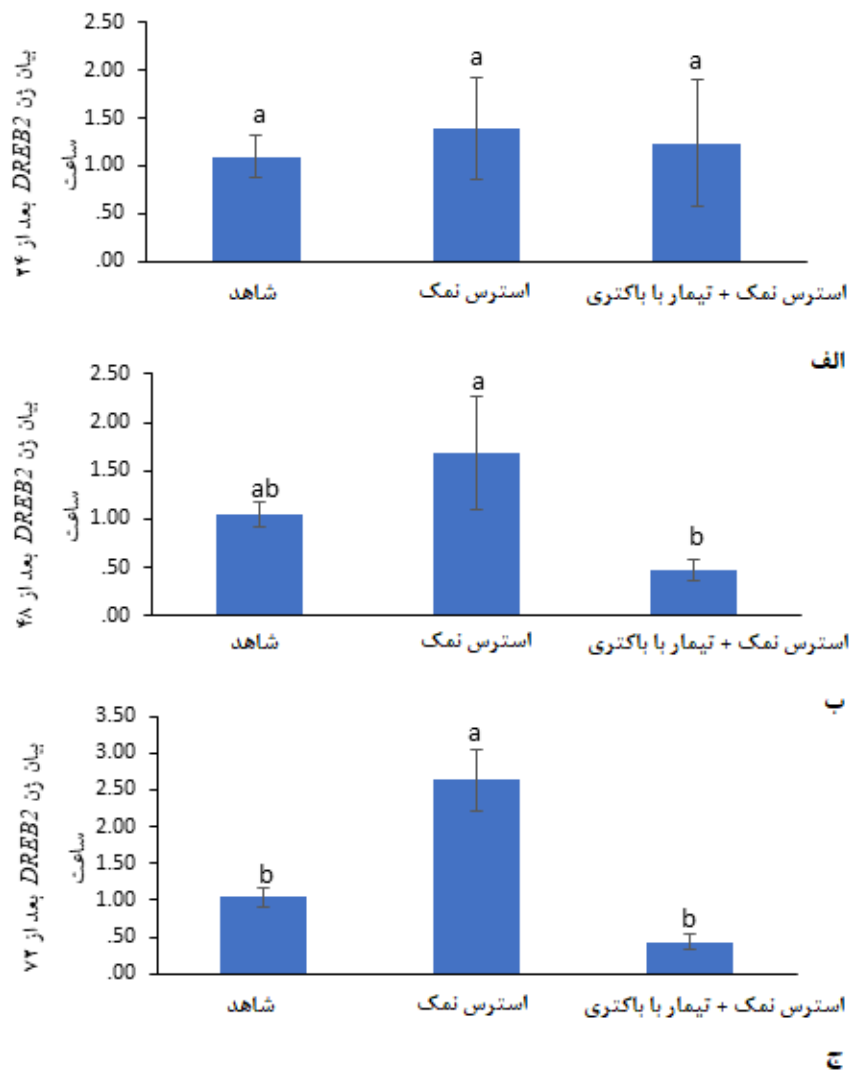
شکل ۴- اثر ازتوباکتر بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (الف) و پراکسیداز (ب) و سوپراکسید دیسموتاز (ج) گیاه ریحان تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار می‌باشد و حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

اثر تیمار با ازتوباکتر بر بیان ژن‌های کاندید: پس از انجام PCR و اطمینان از صحت ساخت cDNA، به منظور بررسی بیان ژن، نمونه‌ها وارد واکنش Real Time RT-PCR شده و منحنی‌های ذوب و تکثیر برای هر نمونه بدست آمد (شکل ۵).



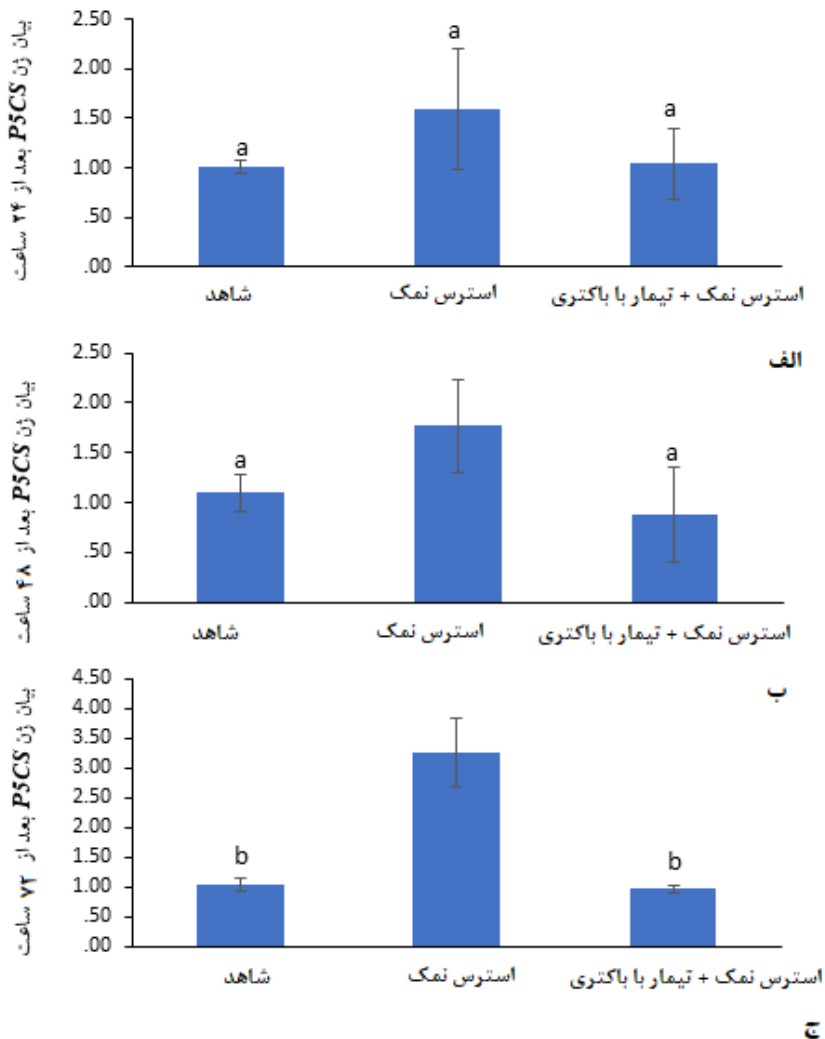
شکل ۵- منحنی ذوب (بالا) و منحنی تکثیر (پائین) مربوط به واکنش‌های Real time RT-PCR روی ژن *18S rRNA* (الف)، ژن *DRB2* (ب) و ژن *p5cs* (ج)

تأثیر ازتوباکتر بر میزان بیان ژن *DBRE2* گیاه ریحان در زمان‌های مختلف تحت تنش شوری: مقایسه میانگین اثر تنش شوری و باکتری بر میزان بیان ژن *DBRE2* در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از آخرین تیمار در شکل ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که در کلیه زمان‌ها تنش شوری باعث افزایش بیان ژن در گیاه شد و این افزایش در زمان ۷۲ ساعت بیشترین میزان را دارا بود. بکار بردن باکتری همراه با تنش باعث کاهش میزان بیان ژن شد که این کاهش در زمان ۷۲ ساعت با مقدار ۰/۴۲۹ بیشترین میزان کاهش نسبت به شاهد و نمونه تحت تنش شوری بود و از نظر آماری در سطح ۵ در صد معنی‌دار بود.



شکل ۶- اثر ازتوباکتر و تنش شوری بر میزان بیان ژن *DEBR2* در زمان‌های ۲۴ (الف)، ۴۸ (ب) و ۷۲ (ج) ساعت در گیاه ریحان تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار می‌باشد و حروف نامشابه نشان دهنده اختلاف معنی‌دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

**تأثیر ازتوباکتر بر میزان بیان ژن *P5CS* گیاه ریحان در زمان‌های مختلف تحت تنش شوری:** بررسی نتایج اثر تنش شوری و استفاده از باکتری بر میزان بیان ژن *P5CS* در در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از برداشت گیاه در شکل ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تنش شوری در زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن در گیاه شد و میزان بیان ژن در زمان ۷۲ ساعت با مقدار ۳/۲۵ بالاترین میزان را دارا بود. نتایج اثر توأم باکتری و تنش شوری کاهش میزان بیان ژن را نشان داد که این کاهش در زمان ۷۲ ساعت نسبت به سایر زمان‌ها با مقدار ۰/۹۷۲ نسبت به شرایط کنترل و تنش شوری از نظر آماری معنی‌دار بود.



شکل ۷- اثر ازتوباکتر و تنش شوری بر میزان بیان ژن *P5CS* در زمان‌های ۲۴ (الف)، ۴۸ (ب) و ۷۲ (ج) ساعت در گیاه ریحان تحت تنش شوری. داده‌ها میانگین ۳ تکرار  $\pm$  خطای معیار می‌باشد و حروف نامشابه نشان دهند اختلاف معنی دار براساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) می‌باشد.

## بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که تیمار با *ازتوباکتر* موجب افزایش میزان وزن خشک و تر گیاه ریحان و افزایش میزان طول بخش هوایی و ریشه در شرایط استرس شوری شد. نسبت به شرایط فاقد باکتری در غلظت‌های مختلف شوری مشاهده می‌شود. در مطالعه حاضر، همچنین نتایج مقایسه میانگین مربوط به میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز گیاه ریحان نشان داد که با افزایش میزان غلظت کلرور سدیم و در عدم حضور باکتری میزان فعالیت آنزیمی گیاه ریحان افزایش یافته است. بررسی اثر تیمار با *ازتوباکتر* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در گیاه ریحان نشان داد که این تیمار موجب کاهش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز شد. بکار بردن باکتری همراه با تنش شوری باعث کاهش میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز شد در خصوص نتایج تیمار توأم باکتری و شوری بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز گیاه ریحان مشاهده شد که در غلظت‌های مختلف شوری میزان فعالیت آنزیم با کاربرد باکتری کاهش یافت. نتایج تیمار توأم *ازتوباکتر* و شوری نشان داد که با تلقیح گیاه توسط *ازتوباکتر* کاهش میزان پرولین بخش هوایی و ریشه نسبت به شرایط فاقد باکتری در غلظت‌های مختلف شوری شده است. در مطالعه‌ای که بر روی گیاه بیابانی *Panchoaticum maritimum* صورت

گرفت مشخص شد که با القای تنش شوری میزان رشد و محتوای پروتئینی گیاه کاهش می‌یابد، ولی اگر مقداری پرولین خارجی به گیاه اضافه شود محتوای پروتئینی و میزان رشد بهبود می‌یابد و این نشان می‌دهد که پرولین باعث افزایش تحمل گیاه به تنش شوری می‌شود (۱۰). در حالی که در مطالعه ما نتایج نشان داد که کاربرد باکتری بدون تنش شوری باعث کاهش میزان پرولین بخش هوایی و ریشه گیاه ریحان نسبت به گیاهانی که با باکتری تلقیح نشده بودند گردید. بعضی از محققین، افزایش پرولین در شرایط تنش را یکی از معیارهای ایجاد تحمل در گیاهان عنوان نمودند. بطوری‌که در شرایط تنش شوری برای ایجاد مقاومت در گیاه و شرکت در فرآیند اسمزی میزان تولید پرولین افزایش می‌یابد و نقش حفاظتی را برای پروتئین‌ها و آنزیم‌ها در شرایط وقوع تنش دارد. در واقع پرولین باعث پایداری فرم طبیعی پروتئین شده و از به هم خوردن شکل طبیعی ترکیبات آنزیم ممانعت می‌کند (۸). در مطالعه مرادی و همکاران در سال ۲۰۱۷ میزان بیشتر پرولین در رقم هایولا ۴۹۱ (رقم متحمل) نسبت به رقم حساس (RGS003) کلزا مشاهده نمودند و با توجه به هم‌بستگی مثبت بین میزان پرولین و صفاتی نظیر فتوستتیز و وزن خشک بوته نتیجه‌گیری کردند که شاید بتوان از پرولین بعنوان یک اسمولیت مطرح در تحمل به تنش شوری کلزا استفاده نمود (۱۷).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تنش شوری در کلیه زمان‌ها باعث افزایش بیان ژن‌های کدکننده ردکنز و پرولین سنتتاز (*DRB2* و *p5cs*) در گیاه ریحان شده است اما بکار بردن باکتری همراه با تنش باعث کاهش میزان بیان ژن‌ها شده است. در مطالعه کومار و همکاران، فعالیت ژن *P5CR* در هر دو رقم متحمل و حساس به شوری توت سفید افزایش یافت، ولی این افزایش در رقم متحمل بیشتر بود و تجمع بالاتری از پرولین در لاین متحمل مشاهده شد (۱۲). در مطالعه‌ای دیگر، محققان میزان بیان ژن *P5CS* در شرایط تنش شوری، زیتون زرد *Olea europaea c.v zar* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج به‌دست آمده از ایمونوبلاتینگ نشان داد که سطح بیان پرولین در گیاه زیتون تحت تنش، به مراتب از گیاه زیتون شاهد در شرایط غیرتنش بالاتر می‌باشد و این نتایج دلالت بر نقش مهم و کلیدی پرولین در رابطه با تحمل تنش شوری دارد (۱۸). در مطالعه متین و همکاران در سال ۲۰۱۴ به منظور بررسی الگوی بیان *P5CS* و *BADH* در طی تنش شوری در گیاه گندم، تعدادی از قطعات ژنی آن‌ها انتخاب، جداسازی و جهت آنالیز Real Time PCR مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج مبین آن بود که میزان بیان ژن‌های *P5CS* و *BADH* در پاسخ به تنش شوری تغییر می‌کند. نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر آن بود که ژن‌های *P5CS* و *BADH*، نقش کلیدی در ایجاد مقاومت به تنش شوری در گیاه گندم را دارا هستند (۱۶). در مطالعه‌ای دیگر، محتوای پرولین و سطح بیان ژن *P5CS* در انجیر تیغی تحت تنش شوری اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که تنش شوری منجر به کاهش ضخامت *Cladode* و طول ریشه و تجمع قابل توجه و تدریجی پرولین در *Cladode* های جوان به یک شیوه وابسته به زمان و غلظت شد. فعالیت ژن *P5CS* تحت تنش شوری افزایش ملامی داشت (۲۷). نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در یک مطالعه، چهار ژن *PDH*، *OAT*، *P5CS* و *ProT* از نهال‌های *Kosteletzkya Virginica* تحت تنش شوری کلون شدند و پروفایل بیان نشان داد که *P5CS* و *OAT* منجر به تجمع پرولین در برگ‌ها شدند و بیان آن‌ها تحت تنش شوری افزایش یافت (۳۲). در مطالعه حاضر در کلیه زمان‌ها تنش شوری باعث افزایش بیان ژن *DRB2* و *p5cs* در گیاه شد و این افزایش در زمان ۷۲ ساعت بیشترین میزان را دارا بود. محققان دیگر نشان دادند که افزایش بیان ژن‌های *P5CS* و *P5CR* در رقم برنج هندی موجب مقاومت آن به تنش شوری می‌شود. مکانیسم این تحمل انباشت پرولین در سلول‌ها و نقش محافظت-کنندگی اسمزی آن است (۲۸). در پژوهش دیگری تحت شرایط شوری و دهیدراسیون بیان دو ژن *P5CS* و *P5CR* در آرابیدوپسیس بررسی شد. با بررسی mRNA ژن *p5cs* پس از اعمال تنش افزایش قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد و سطح بیان ژن *p5cs* در مقایسه با ژن *p5cs* خیلی پائین بود. این نتایج پیشنهاد می‌دهد که ژن *p5cs* نقش اساسی‌تری نسبت به *p5cs* در

تجمع پرولین تحت شرایط دهیدراسیون و شوری در آرابیدوپسیس ایفا می‌نماید (۱۲). در حالی که در مطالعه ما نتایج نشان می‌دهد که کاربرد باکتری بدون تنش شوری باعث کاهش میزان پرولین بخش هوایی و ریشه گیاه ریحان نسبت به گیاهانی که با باکتری تلقیح نشده اند گردیده است. شهبازی و همکاران در سال ۲۰۲۱، به منظور بررسی تأثیر تنش شوری بر بیان ژن‌های *p5cs* و *PDH* و میزان پرولین در گیاه کلزا، آزمایشی بصورت فاکتوریل با سه تکرار انجام دادند. فاکتور اول شامل سه لاین دابل هاپلوئید (متحمل، نیمه متحمل و حساس) و فاکتور دوم دو زمان نمونه برداری بود. نتایج بیان ژن *PCS* حاکی از بیان بیشتر این ژن در لاین حساس در ۶ ساعت بعد از تنش بود. مقایسه میانگین نسبی بیان ژن *PDH* نشان داد که لاین حساس در هر دو زمان ۶ و ۲۴ ساعت بعد از تنش افزایش بیان داشت. میزان پرولین در لاین متحمل بیشتر از دو لاین دیگر بود. بطور کلی نتایج تحقیق بیانگر آن بود که بیان ژن‌های *PDH* و *p5cs* به میزان تحمل گیاه و زمان تنش بستگی دارد. از آنجایی که در لاین متحمل افزایش نسبتاً بیشتر در بیان ژن *P5CS* و مهار بیشتر فعالیت *PDH* نسبت به لاین حساس مشاهده گردید و باعث تجمع بالاتر پرولین در رقم متحمل نسبت به حساس شد، شاید بتوان از پرولین بعنوان یک اسمولیت شاخص در شناسایی میزان تحمل به تنش شوری در کلزا استفاده نمود (۲۴). در حالی که در مطالعه حاضر نتایج نشان می‌دهد که تنش شوری در زمان‌های مختلف باعث افزایش بیان ژن *P5CS* در گیاه شده است. همچنین مقایسه میانگین اثر تنش شوری و باکتری بر میزان بیان ژن *DBER2* در زمان‌های مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از برداشت گیاه نشان داد که در کلیه زمان‌ها تنش شوری باعث افزایش بیان ژن در گیاه شده است. با توجه به نتایج تحقیق حاضر که بر روی گیاه ریحان انجام گرفت، تیمار با/زرتو باکتر می‌تواند علاوه بر اثر افزایشی بر فاکتورهای رشدی، نقش مهمی در افزایش بیان ژن‌هایی داشته باشد که در کنترل تنش در گیاهان مؤثر شناخته شده‌اند.

### سپاسگزاری

از تمامی همکاران و پرسنل آزمایشگاه تحقیقاتی فلاورجان که در این راه مساعدت نمودند کمال تشکر را داریم.

### منابع

۱. فرسرای، س، مقدم، م، ۱۳۹۹. بررسی پاسخ مورفوفیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ریحان رقم «کشکنی لولو» به تنش شوری و کاربرد پلیمرهای سوپر جاذب. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) (علمی)، (۴) ۳۳: ۹۹۶-۹۸۲.
۲. Aasfar, A., Bargaz, A., Yaakoubi, K., Hilali, A., Bennis, I., Zeroual, Y., Meftah Kadmiri, I., 2021. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability. *Frontiers in Microbiology*, 12(1): 62-79.
۳. Aly, M.M., El-Sabbagh, S.M., El-Shouny, W.A., Ebrahim, M.K.H., 2003. Physiological response of *Zea mays* to NaCl stress with respect to *Azotobacter chroococcum* and *Streptomyces niveus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6: 2073-2080.
۴. Azizah, N.S., Irawan, B., Kusmoro, J., Safriansyah, W., Farabi, K., Oktavia, D., Doni, F., Miranti, M., 2023. Sweet basil (*Ocimum basilicum* L.)—a review of its botany, phytochemistry, pharmacological activities, and biotechnological development. *Plants*, 12(24): 4148.
۵. Caliskan, O., Kurt, D., Temizel, K.E., Odabas, M.S., 2017. Effect of salt stress and irrigation water on growth and development of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Open Agriculture*, 2(1): 589-594.
۶. Carrasco, N., Roozenburg, I., Voorbergen-Laarman, M., Itoh, N., Engelsma, M.Y., 2013. Development of a real-time PCR for detection of the oyster pathogen *Nocardiacrassostreae* based on its homogeneous 16S-23S rRNA intergenic spacer region. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114: 120-7.
۷. Conde-Avila, V., Peña, C., Pérez-Armendáriz, B., Loera, O., Martínez Valenzuela, C., Leyva Morales, J.B., Jesús

- Bastidas Bastidas, P.D., Salgado-Lugo, H., Ortega Martínez, L.D., 2021. Growth, respiratory activity and chlorpyrifos biodegradation in cultures of *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837. *AMB Express*, 11: 1-19.
8. Dar, M.I., Naikoo, M.I., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F.A., 2016. Proline accumulation in plants: roles in stress tolerance and plant development. In *Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment. Emerging Omics Technologies*, 16(1): 155-166.
  9. Hernández, J.A. 2019. Salinity tolerance in plants: trends and perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(10): 2408.
  10. Khedr Abbed Hamid, A., Abbas Mohammad, A., 2013. Proline induces the expression of salt stress responsive proteins and may improve the adaptation of *pancratium maritimum L.* to salt stress. *Journal of Experimental Botany*, 54(392): 2553-2562.
  11. Khosravi, H., 2014. *Azotobacter* and its' role in soil fertility management. *Land Management*, 2(2): 79-94
  12. Kumar, S.G., Reddy, A.M., Sudhakar C., 2013. NaCl effects on proline metabolism in two high yielding genotypes of mulberry (*Morus alba L.*) with contrasting salt tolerance. *Plant Science*, 165: 1245-51.
  13. Lehmann, S., Funck, D., Szabados, L., Rentsch, D., 2017. Proline metabolism and transport in plant development. *Amino Acids*, 39: 949-62.
  14. Liang, W., Ma, X., Wan, P., Liu, L., 2018. Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1): 286-291.
  15. Magné, C., Larher, F., 1992. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry*, 200(1): 115-8.
  16. Matin, R., Ebrahimi, M.A., Niazi, A., 2014. Quantitative expression analysis of *P5CS* and *BADH* genes in cultivated wheat plants under salt and ABA treatments. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 3(1): 48-43.
  17. Moradi, M., Ebrahimeh, A., Ghodrati, G., 2017. Evolution effect of salt stress, growth, physiological characteristic and seed yield of spring canola cultivars (*Brassica napus L.*). *Quarterly Journal of Plant Production Science*, 2: 1-12.
  18. Motamed, N., 2014. Increase of *P5CS* gene expression in olive plantlets under salinity stress. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 27(1): 119-124.
  19. Motsara, M.R., Roy, R.N., 2008. Guide to Laboratory Establishment for Plant Nutrient Analysis Vol. Rome: *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*, 205.
  20. Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22: 867-880.
  21. Nosek, M., Kaczmarczyk, A., Jędrzejczyk, R.J., Supel, P., Kaszycki, P., Miszalski, Z., 2020. Expression of genes involved in heavy metal trafficking in plants exposed to salinity stress and elevated Cd concentrations. *Plants*, 9(4): 475.
  22. Sahoo, R.K., Ansari, M.W., Pradhan, M., Dangar, T.K., 2014. Mohanty S, Tuteja N. A novel *Azotobacter vinelandii* (SRI Az 3) functions in salinity stress tolerance in rice. *Plant Signaling and Behavior*, 9(7): 511-23.
  23. Sedri, M.H., Roohi, E., Bostani, M.K., 2022. Effect of *Azotobacter* Biofertilizer and Management of Urea Application Accompanied with Manure on Yield and Protein Content of Rained Wheat. *Iranian Journal of Soil Research*, 36(2): 109-125.
  24. Shahbazi, E., Khajeh, Z., Moradi, M., 2021. *P5CS* and *PDH* expression levels and proline content in rapeseed doubled haploid lines (*Brassica napus*) under salinity stress. *Modern Genetics Journal*, 16(1): 33-41.
  25. Sheldon, A.R., Dalal, R.C., Kirchhof, G., Kopittke, P.M., Menzies, N.W., 2017. The effect of salinity on plant-available water. *Plant and Soil*, 418(1): 477-491.
  26. Shrivastava, P., Kumar, R., 2015. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2): 123-31.
  27. Silva-Ortega, C.O., Ochoa-Alfaro, A.E., Reyes-Agüero, J.A., Aguado-Santacruz, G.A., Jiménez-Bremont, J.F., 2008. Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(1): 82-92.
  28. Sripinyowanich, S., Klomsakul, P., Boonburapong, B., Bangyeekhun, T., Asami, T., Gu, H., Buaboocha, T., Chadchawan, S., 2016. Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa L.*): the role of *OsP5CS1* and

- OsP5CR* gene expression during salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, 1: 94-105.
29. Sytar, O., Kumari, P., Yadav, S., Brestic, M., Rastogi, A., 2019. Phytohormone priming: regulator for heavy metal stress in plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2): 739-752.
30. Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T., Sawamura, M., 1997. Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3, 4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Analytical Biochemistry*, 251(2): 206-9.
31. Van Oosten, M.J., Di Stasio, E., Cirillo, V., Silletti, S., Ventorino, V., Pepe, O., Raimondi, G., Maggio, A., 2018. Root inoculation with *Azotobacter chroococcum* 76A enhances tomato plants adaptation to salt stress under low N conditions. *BMC Plant Biology*, 18(1): 1-12.
32. Wang, H., Tang, X., Shao, H.B., 2015. Proline accumulation and metabolism related genes expression profiles in *Kosteletzkya virginica* seedlings under salt stress. *Front. Journal of Plant Science*, 6: 792: 1-9.
33. Wani, SH., Kumar, V., Khare, T., Guddimalli, R., Parveda, M., Solymosi, K., Kavi Kishor, P.B., 2020. Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. *Planta*, 251(4): 1-29.

Preproof of Article

# The effect of *Azotobacter* on some physiological and biochemical indicators and the expression of some effective genes in *Ocimum basilicum* under salt stress

Bakhtiari F.<sup>1</sup>, Rezayatmand Z.<sup>2</sup> and Emami-Karvani Z.D.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

<sup>3</sup> Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

## Abstract

Creating resistance to salinity in plants is a special feature for agriculture, because soil salinity is one of the limiting factors for growth. Plant growth stimulating bacteria moderate the effects of environmental stress in plants with different mechanisms. In accordance, a factorial greenhouse experiment was conducted in the form of a completely randomized design in three replicates. The experimental treatments included salinity (0, 100, 150, and 200 mmol sodium chloride) and *Azotobacter* bacterium which were performed on *Ocimum basilicum*. The results showed that salinity stress treatment by inoculating the plant with *Azotobacter*, dry and wet weights of the plant were increased (20%) compared to the condition without bacteria, in different concentrations of salinity. In salinity treatment, in the absence of bacteria, the amount of proline (48.6%) and the activity of antioxidant enzymes, catalase (0.059 units), peroxidase (0.263 units) and superoxide dismutase (7.6 units) increased in the plant. It was observed that the use of bacteria along with salt stress decreased the activity of antioxidant enzymes and proline. At all times, salinity stress increased the expression of *DRB2* and *p5cs* genes, and this increase was the highest at 72 hours. At the same time, the use of bacteria with stress decreased the expression of the studied genes. The results of the study show the high effectiveness of treatment with *Azotobacter* in reducing the effects of salinity stress, antioxidant activity and increasing the expression of genes involved in stress control in *Ocimum basilicum*, and these effects can be investigated in other plants.

**Key words:** *Ocimum basilicum*, Salt stress, *Azotobacter*, Antioxidant enzymes, Proline