

بررسی اثر تنش کمبود آب و باکتری‌های تقویت‌کننده رشد گیاه بر برخی از صفات ریخت‌شناسی و بیان ژن‌های Str و Tdc در ریشه گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*)

مریم احمدزاده^۱، امیرحسین کشت‌کار^{۱*}، کبری مسلم‌خانی^۲ و مسعود احمدزاده^۳

^۱ ایران، همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی

^۲ ایران، تهران، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

^۳ ایران، کرج، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۱۲

چکیده

گیاه پروانش یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی است. افزایش مقدار ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها (TIA) در اندام‌های این گیاه از طریق اعمال تیمارهای زیستی و غیر زیستی یکی از اهداف فعالیت‌های اصلاحی می‌باشد. در این بررسی تاثیر دو گونه از باکتری‌های تقویت‌گر رشد *Pseudomonas fluorescens* و *Azospirillum brasilense* به صورت جداگانه و ترکیبی همراه با دو سطح تیمار رطوبتی به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. اثر تیمارها بر برخی صفات ریخت‌شناسی در مرحله گلدهی و نیز بیان دو ژن Str و Tdc در ریشه گیاه پروانش با استفاده از تکنیک qRT-PCR بررسی گردید. تنش کمبود آب، رشد طولی ریشه را به طور معنی‌داری افزایش داد ولی تاثیر معنی‌داری بر بیان ژن‌ها نداشت. باکتری *A. brasilense* در شرایط عدم تنش، با افزایش طول، حجم و سطح ریشه، افزایش معنی‌دار بیان ژن کلیدی Str را در پی داشت. باکتری *P. fluorescens* نیز با وجود کاهش مقادیر صفات رویشی، تاثیر مثبت و معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد بررسی در شرایط عدم تنش و تنش نسبت به گیاهان شاهد داشت. از نظر تاثیر بر بیان ژن‌های مورد بررسی، دو گونه باکتریایی به‌طور جداگانه بهتر عمل نموده و بیان ژن‌ها را در هر دو شرایط رطوبتی نسبت به گیاهان شاهد بدون تنش و تحت تنش افزایش دادند. انتظار می‌رود با افزایش بیان دو ژن Str و Tdc محصول این ژن‌ها و محصولات نهایی مسیر بیوسنتزی انواع TIA از جمله مقدار آجمالیسین در ریشه گیاه پروانش افزایش یابد.

واژه‌های کلیدی: پروانش، ریزوباکتری‌های تقویت‌کننده رشد گیاه، واکنش qRT-PCR، ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها، تنش کمبود آب

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۸۱۰۹۰۹۶، پست الکترونیکی: akesht@googlemail.com

مقدمه

(TIA) می‌باشد، قرار دارد (۱۳). گروه TIA، یکی از بزرگترین و متنوع‌ترین گروه آلکالوئیدی در گیاه پروانش است. این گیاه منبع انحصاری دو آلکالوئید وین‌بلاستین و وین‌کریستین می‌باشد که به دلیل داشتن فعالیت ضد سرطانی، از جمله مهم‌ترین آلکالوئیدها محسوب می‌شوند (۵۴). علاوه بر این ریشه این گیاه محل تجمع دو آلکالوئید

گیاه پروانش با نام علمی *Catharanthus roseus* (L.) G. Don متعلق به تیره خرزهره (Apocynaceae)، به عنوان یکی از پرکاربردترین گیاهان دارویی به شمار می‌رود (۲۸)، ۴۵ و ۵۴). ارزش بسیار بالای پروانش بر اساس منفعت دارویی هنگفت آن که تولیدکننده بیش از ۱۳۰ نوع ترپنوئید ایندول آلکالوئید Terpenoid indole alkaloid

تحقیقات نشان داده است که بین میزان بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی TIA و تجمع آلکالوئیدهای مرتبط با این ژن‌ها در گیاه پروانش ارتباط وجود دارد (۱۸، ۲۵ و ۵۲). Dutta *et al* در سال ۲۰۰۵ بمنظور درک این ارتباط، شش منبع ژنتیکی مختلف از *C. roseus* را مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی، نیمرخ بیان یک ژن ابتدای مسیر بیوستتزی (str) و دو ژن انتهایی این مسیر (d4h و dat) مورد مطالعه قرار گرفت و همبستگی مثبتی بین فراوانی رونویسی و تجمع آلکالوئیدهای مرتبط در منابع ژنتیکی مختلف یافت شد (۱۸).

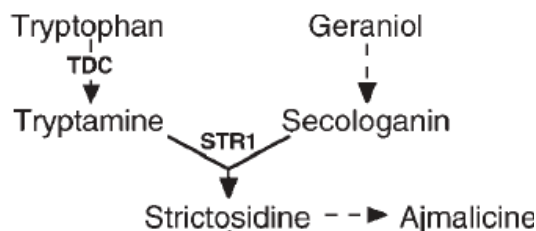
طبق مطالعات صورت گرفته، تولید متابولیت‌های ثانویه اغلب در واکنش به هر دو شرایط تنش زیستی و غیر زیستی افزایش می‌یابد (۳۸ و ۳۹). در گیاه پروانش نیز بمنظور افزایش مقدار آلکالوئیدهای گیاه، از عوامل زیستی و غیر زیستی در مطالعات مختلف بهره گرفته شده است (۱۹؛ ۳۰، ۳۲ و ۴۰). به عنوان نمونه، Jaleel *et al* در سال ۲۰۰۸ با مطالعه اثرات تنش کمبود آب بر متابولیسم اکسیژن فعال و نیز تجمع آلکالوئید آجمالیسین، نشان دادند که میزان آلکالوئید آجمالیسین در گیاهان پروانش تحت تنش به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد بیشتر است. آن‌ها بر اساس نتایج به دست آمده چنین بیان نمودند که مناطق جغرافیایی دچار کمبود آب می‌توانند به خوبی برای کشت گیاهان دارویی نظیر پروانش مورد استفاده قرار گیرند و بدین ترتیب میزان آلکالوئید مهم اقتصادی گیاه افزایش پیدا می‌کند (۳۱).

همچنین بر اساس گزارش برخی از محققین، میکروارگانسیم‌های ریزوسفری، به عنوان الیستور زیستی عمل نموده و می‌توانند سنتز تولیدات ثانویه را در گیاه القا نمایند (۲۳ و ۴۶). الیستورهای زیستی به عنوان فرآورده‌های بدون خطر می‌توانند برای پایداری تولیدات کشاورزی مناسب باشند (۶). در میان میکروارگانسیم‌های موجود در ریزوسفر، ریزوباکتری‌های تقویت‌گر رشد

آجمالیسین و سرپتین است (۷، ۲۸، ۲۹، ۳۳ و ۴۵). آجمالیسین اولین بار در سال ۱۹۵۷ به عنوان داروی ضد فشار خون برای درمان اختلالات گردش خون و بیماران دارای فشار خون بالا، شناخته شد (۵۱). امروزه با وجود پیشرفت‌های زیاد در زمینه ساخت ترکیبات دارویی، این آلکالوئیدها هنوز از طریق استخراج از گیاه پروانش به دست می‌آیند (۷، ۹ و ۳۵). هزینه بالای تولید آلکالوئیدهای مهم دارویی به مقدار کم تجمع این مواد در اندام‌های گیاه پروانش مربوط می‌شود. بنابراین افزایش مقدار TIA در اندام‌های این گیاه یکی از اهداف فعالیت‌های ژنتیکی و اصلاحی در گیاه پروانش محسوب می‌شود (۲۸).

C. roseus یک سیستم مدل مفید برای مطالعه مسیر بیوستتزی ترپنوئید ایندول آلکالوئیدها است (۵۱). پیشرفت‌های حاصل شده در زمینه مسیر بیوستتزی TIA و نیز شناسایی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های مرتبط با این مسیر در یک مقاله مروری بیان شده است (۵۲). ژن‌های مهم کد کننده آنزیم‌های کلیدی در ابتدای مسیر بیوستتزی شامل ژن‌های گرانیول ۱۰-هیدروکسیلاز Geraniol hydroxylase (G10h)، ترپتوفان دکربوکسیلاز Tryptophan decarboxylase (Tdc)، استریکتوسیدین سنتتاز (Str) Strictosidine synthase و استریکتوسیدین β -D -glucosidase (Sgd) Strictosidine b-D-glucosidase می‌باشد (۲۵). Tdc و G10h مراحل اولیه بیوستتزی TIA را به ترتیب در مسیر ایندولی (تریپتامین) و مسیر ترپنوئیدی (سکولوگانین) کاتالیز می‌کنند. سپس آنزیم Str، در شاخه میانی مسیر، تریپتامین و سکولوگانین را متراکم ساخته و استریکتوسیدین را تولید می‌نماید (۲۵ و ۵۱). آلکالوئید استریکتوسیدین یک حد واسط مرکزی در بیوستتزی انواع TIA بوده (۵۴) و حکم ستون فقرات را در ساختمان آن‌ها دارد (۲۵). در واقع استریکتوسیدین پیش‌ماده مشترک انواع مختلف TIA است که می‌تواند به یک سری از منوترپنوئید ایندول آلکالوئید با ساختار و عملکردهای زیستی متنوع تبدیل شود (۵۴).

جزء ژن‌های ابتدای مسیر بیوسنتزی بوده و برای بسیاری از انواع TIA از جمله آجمالیسین در گیاه پروانش مشترک می‌باشند (شکل ۱).



شکل ۱- بخشی از مسیر بیوسنتزی ترپنئوئید ایندول آلکالوئیدها در گیاه پروانش

(نشان‌دهنده ژن‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر، برگرفته از منبع شماره ۳۸)

مواد و روشها

کاشت و تیمار گیاه پروانش با PGPR: بذر F_1 گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.) از شرکت PanAmerican Seed تهیه گردید. بذرها با آب جاری شسته شده و برای ضدعفونی آن‌ها از محلول هیپوکلریت سدیم (NaClO) ۰/۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. سپس بذرها توسط آب مقطر استریل طی چهار مرحله شسته شدند (۵).

بر اساس مرور منابع مختلف، دو گونه از باکتری‌های تقویت‌کننده رشد گیاه، به نام‌های *Pseudomonas fluorescens* (سویه ۱۶۹) و *Azospirillum brasilense* که توانایی کلونیزه کردن ریزوسفر گیاه پروانش را نیز دارند (۳۲)، به صورت سوسپانسیون 10^8 واحد تشکیل کلونی (cfu) Collony Forming Unit بر میلی‌لیتر (۱۰ و ۲۰)، از مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور (بخش تحقیقات بیولوژی خاک)- کرج، تهیه شد و طبق دستورالعمل موسسه، در سه نوبت مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا بذرها با مایه تلقیح باکتریایی به مدت ۳۰ دقیقه آغشته و در سینی‌های کشت دارای ترکیب پرلیت و کوکوپیت به صورت سطحی کاشته شدند. سینی‌های کشت، پس از آب-

گیاهی Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) از اهمیت زراعی بالایی برخوردار هستند (۱۵). امروزه انواع PGPR و اثر متقابل‌شان با گیاه، مورد بهره‌برداری تجاری قرار گرفته و کاربردهای عملی برای کشاورزی پایدار دارند (۱۶ و ۲۶). نقش برخی از این میکروارگانیسم‌ها در افزایش تعدادی از آلکالوئیدهای گیاهان دارویی از جمله پروانش به اثبات رسیده است (۳۰ و ۳۲). در سال ۲۰۰۷، Jaleel *et al*، اثر باکتری تقویت‌گر *P. fluorescens* را روی پارامترهای رویشی و میزان تولید آلکالوئید آجمالیسین در *C. roseus* تحت تنش کمبود آب مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه، تیمار با گونه فلورسنت باکتری *Pseudomonas* پارامترهای رشدی را تحت تنش کمبود آب افزایش داد و ممانعت رشدی ناشی از تنش را از طریق افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک گیاه بهبود بخشید. مقدار آجمالیسین نیز در تیمار گیاهان تحت تنش با این باکتری افزایش یافت. نتیجه این بررسی نشان داد که تیمار گیاهچه با انواع بومی PGPR می‌تواند روش مناسبی برای افزایش عملکرد بیوماس و محتوای آلکالوئید در گیاهان دارویی باشد (۳۰). همچنین استفاده تلفیقی از PGPR و تنش کمبود آب به عنوان یک تدبیر مفید برای حفظ محیط زیست معرفی شده که می‌تواند همزمان با بهبود شرایط تنش، مقدار و عملکرد آلکالوئید را در اندام گیاهان دارویی افزایش دهد (۲۳ و ۳۰).

همانطور که از مرور منابع مختلف پیداست با وجود انجام برخی مطالعات در زمینه تاثیر تنش کمبود آب و نیز باکتری‌های تقویت‌گر رشد گیاه بر صفات ریخت‌شناسی و محتوای آلکالوئیدهای گیاه پروانش، اثر این تیمارها بر بیان ژن‌های مسیر بیوسنتزی TIA به ویژه در ریشه گیاه، مورد بررسی واقع نشده است. بنابراین در تحقیق حاضر، از تیمارهای تنش کمبود آب و دو گونه از باکتری‌های تقویت‌کننده رشد گیاه برای بررسی برخی از صفات رویشی و نیز ارزیابی نیمرخ بیان دو ژن Tdc و Str در ریشه گیاه پروانش استفاده گردید. همانطور که بیان شد، این دو ژن،

آبیاری گلدان‌ها و اعمال تنش به روش وزنی انجام گرفت. به این ترتیب که از هر تیمار تعداد ۴ گلدان اضافه برای تعیین وزن گیاهچه در طی دوره رشد و بمنظور تعیین وزن خاک گلدان بدون وزن گیاهچه استفاده شد. در مجموع، تیمارها شامل تیمار رطوبتی در دو سطح شاهد (۹۵ درصد ظرفیت زراعی) و تنش (۵۵ درصد ظرفیت زراعی) و تیمار باکتریایی در چهار سطح شاهد، *P. fluorescens*، *A. brasilense* و تلقیح ترکیبی بودند که به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کاملاً تصافی در سه تکرار بر گیاهان پروانش اعمال شدند.

اندازه‌گیری صفات ریخت‌شناسی و نمونه‌برداری از ریشه گیاهان برای بررسی بیان ژن، ۳۰ روز پس از شروع اعمال تیمار رطوبتی و در مرحله گلدهی انجام شد. شکل ۲ تصویر گیاهان شاهد را تحت شرایط آبیاری نرمال (الف) و تنش رطوبتی (ب) در زمان نمونه‌برداری نشان می‌دهد. ارتفاع و طول ریشه با خط‌کش اندازه‌گیری شد. بمنظور محاسبه حجم ریشه از استوانه مدرج ۱۰ cc استفاده و تفاوت حجم آب استوانه مدرج قبل و پس از غوطه‌ور کردن ریشه به عنوان حجم ریشه در نظر گرفته شد. سطح ریشه نیز با استفاده از فرمول زیر تعیین گردید:

$$RA = 2(MRL \times MRV \times \pi) \quad (۸)$$

که در آن RA = سطح ریشه، MRL = طول ریشه، MRV = حجم ریشه و $\pi = ۳/۱۴$ می‌باشد.



ب

دهی بمنظور جذب کامل رطوبت، زیر پوشش پلاستیکی، در دمای ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی نگهداری شدند (۴). آبیاری سینی‌های کشت به صورت روزانه و در شرایط یکسان انجام گرفت. گیاهچه‌ها پس از ظهور و در مرحله شش برگی، از سینی‌های کشت خارج و در گلدان‌های پلاستیکی جداگانه با قطر دهانه ۱۵ سانتیمتر و ارتفاع ۱۵ سانتی‌متر، کاشته شدند. تلقیح خاک گلدان و نیز تلقیح ریشه گیاهچه‌ها قبل از انتقال از سینی کشت به گلدان صورت گرفت. به این ترتیب که ریشه گیاهچه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در بشرهای دارای هریک از مایه‌های تلقیح غوطه‌ور شد. از آب مقطر نیز به میزان مساوی و هم حجم با تیمار باکتریایی به عنوان شاهد (عدم تلقیح باکتری) استفاده شد.

تنش رطوبتی: گیاهان پس از انتقال نشا به گلدان، برای اطمینان از استقرار، به مدت یک ماه تا حد ظرفیت زراعی آبیاری شدند. بافت خاک از نوع شنی لومی بود و ظرفیت زراعی خاک گلدان با استفاده از دستگاه صفحه فشاری Pressure plate تعیین گردید. پس از طی این مدت، گیاهان تحت تیمار رطوبتی قرار گرفتند. تیمار تنش رطوبتی در دو سطح شاهد (۹۵ درصد ظرفیت زراعی) و تنش (۵۵ درصد ظرفیت زراعی) اعمال گردید. به این ترتیب که گیاهان مربوط به هر یک از چهار سطح تیمار باکتریایی به دو قسمت تقسیم شده و بخشی به عنوان شاهد و بخش دیگر برای اعمال تنش در نظر گرفته شد.



الف

شکل ۲- گیاهان شاهد پروانش، ۳۰ روز پس از اعمال تنش رطوبتی. (الف) در شرایط آبیاری نرمال (ب) در شرایط تنش رطوبتی

تجزیه‌های آماری: پس از بررسی نرمال بودن باقی‌مانده‌ها، از داده‌های اصلی برای انجام تجزیه‌های آماری استفاده گردید. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها به وسیله نرم-افزار SAS Ver. 9.2 (SAS Institute Inc., 2008) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

آنالیزهای مولکولی بیان ژن‌ها: استخراج RNA و qRT-PCR

نمونه‌های ریشه جمع‌آوری شده برای بررسی بیان ژن، در فریزر -80°C نگهداری شدند. آنالیزهای مولکولی بیان ژن Str در چند مرحله صورت گرفت. ابتدا استخراج RNA از ۱۰۰ میلی‌گرم ریشه پودر شده و با استفاده از کیت استخراج RibospinTM Seed/ Fruit ساخت شرکت GeneAll کره‌ی جنوبی طبق پروتکل شرکت سازنده انجام و کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل (Thermo Scientific, Nanodrop, 2000C) و ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد تعیین شد. واکنش ساخت cDNA با استفاده از یک میکروگرم RNA و آغازگر الیگو dT، توسط کیت Hyperscript RT-

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت استفاده شده در واکنش qRT-PCR

منبع	شماره دسترسی	طول قطعه (bp)	توالی آغازگر 5'-3'	آغازگر	نام ژن	ردیف
Goklany <i>et al</i> , 2009 (۲۵)	MG748691.1	232	ACCTACGACCGTCGAAACGGATTT AAACTCGGGACATATACAGGCGCT	F R	Tdc	۱
-	X53602.1	82	CGCCTACGCATCTCCCTTCT TGTCCTCCACACAATGGTCT	F R	Str ^۱	۲
Goklany <i>et al</i> , 2009 (۲۵)	A749993.1	203	TCCACCATGCCAGAGTGCTCATTA TCCATCACCACCAGATGCCTTCTT	F R	RPS9 ^۲	۳

۱. آغازگر Str طراحی شد.

۲. ژن RPS9 به عنوان ژن کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت.

در نهایت، بر اساس الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR، دمای بهینه اتصال مختص هر آغازگر تعیین گردید. واکنش qRT-PCR در ۴۰ چرخه، در دستگاه StepOnePlus Real-Time PCR System شرکت Applied Biosystem (ABI) Incorporation، با استفاده از کیت Real Q Plus

2x Master Mix Green, High ROXTM انجام گرفت. برای هر سه ژن، سه تکرار بیولوژیکی (از سه گیاه متفاوت) و دو تکرار تکنیکی (دو تکرار برای هر cDNA) در نظر گرفته شد. برای انجام واکنش qRT-PCR تمام cDNAهای سنتز شده به غلظت ۱۰۰ ng/μl رسانده شدند. مواد لازم

برای انجام واکنش qRT-PCR شامل cDNA رقیق شده، پروتوکل دمایی مربوطه در جدول ۲ نشان داده شده آغازگر رفت، آغازگر برگشت و Master Mix Green است.

جدول ۲- پروتوکل دمایی برای انجام واکنش qRT-PCR

تعداد چرخه	نام مرحله	زمان اجرا	درجه حرارت (C°)
۱	واسرشت سازی اولیه	۱۰ دقیقه	۹۵
۴۰	واسرشت سازی ثانویه	۱۰ ثانیه	۹۵
	اتصال	۱۰ ثانیه	دمای مختص به هر پرایمر
۱	گسترش	۱۵ ثانیه	۷۲
	واسرشت سازی	۱۵ ثانیه	۹۵
	اتصال و گسترش	۶۰ دقیقه	۶۵

تصادفی انجام شد اما با توجه به عدم معنی‌داری اثر بلوک برای تمام صفات مورد ارزیابی اثر بلوک حذف و آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جدول ۴ نتیجه تجزیه واریانس صفات مورد اندازه‌گیری را ۳۰ روز پس از اعمال تنش خشکی نشان می‌دهد. نتیجه مقایسات میانگین اثرات متقابل نوع باکتری در شرایط رطوبتی و نیز اثرات اصلی تیمار تنش رطوبتی بر صفات مورد نظر بترتیب در جداول ۵ و ۶ آورده شده است.

تجزیه داده‌های مولکولی: برای تجزیه داده‌های به‌دست آمده، از روش اختلاف در تغییرات چرخه آستانه ($\Delta\Delta Ct$) استفاده شد. بدین صورت که ابتدا چرخه آستانه برای نمونه‌های مختلف با استفاده از ژن مرجع (خانه‌دار)، نرمال سازی شد و سپس تفاوت نسبی در میزان بیان ژن‌های هدف با استفاده از نرم افزار REST® (۴۲) محاسبه گردید. اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نیز در سطح یک و پنج درصد مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج

ارزیابی صفات ریخت‌شناسی: تجزیه واریانس داده‌ها ابتدا به صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح بلوک‌های کامل

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های اثر دو شرایط مختلف رطوبتی و چهار سطح عامل باکتریایی بر صفات ریخت‌شناسی گیاه پروانش ۳۰ روز پس از

اعمال تیمار رطوبتی

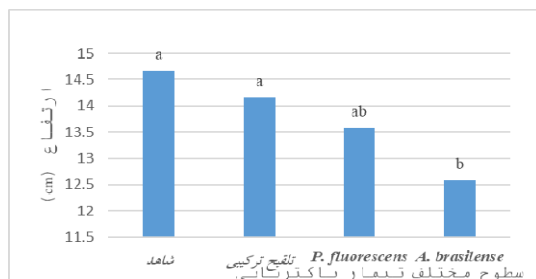
منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS)			
		ارتفاع گیاه	طول ریشه	حجم ریشه	نسبت طول ریشه به ارتفاع
نوع باکتری	۳	۴/۸۱*	۱۷/۷۰**	۰/۳۹*	۰/۰۸ ^{ns}
شرایط رطوبتی	۱	۱۰۸/۳۸**	۳/۷۶ ^{ns}	۴/۰۸**	۲/۳۸**
شرایط رطوبتی × باکتری	۳	۰/۴۰۳ ^{ns}	۲۰/۴۳**	۰/۷۵**	۰/۰۴۴ ^{ns}
خطای آزمایشی	۱۶	۱/۱۲۵	۲/۶۵۶	۰/۱۲۱	۰/۰۴۴
ضریب تغییرات (درصد)	-	۷/۷۲	۸/۳۳	۹/۵۲	۱۴/۷۸

^{ns}، * و **: بترتیب غیرمعنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ارتفاع گیاه: نتیجه تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی نوع باکتری و تنش رطوبتی بر ارتفاع گیاه بترتیب در سطح پنج و یک درصد معنی‌دار شده ولی اثرات متقابل این دو عامل معنی‌دار نبود.

مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتریایی (شکل ۳) نشان داد که تیمار با هر دو باکتری باعث کاهش ارتفاع گیاه شده و در این میان باکتری *A. brasilense* بیشترین اثر را داشته و موجب کاهش معنی‌دار این صفت در سطح پنج درصد

مقایسه میانگین اثر تیمارهای باکتریایی (شکل ۳) نشان داد که تیمار با هر دو باکتری باعث کاهش ارتفاع گیاه شده و در این میان باکتری *A. brasilense* بیشترین اثر را داشته و موجب کاهش معنی‌دار این صفت در سطح پنج درصد



شده است. تنش رطوبتی نیز همانطور که انتظار می‌رفت، باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع گیاه در سطح یک درصد گردید. بیشترین مقدار میانگین ارتفاع در تیمار شاهد (۱۵/۸۷۵ سانتیمتر) و کمترین آن در تیمار تنش (۱۰/۱۶۷ سانتیمتر) دیده شد (جدول ۶).

شکل ۳- مقایسه میانگین اثرات ساده سطوح مختلف تیمارهای باکتریایی بر صفت ارتفاع در گیاه پروانش

جدول ۵- مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل سطوح مختلف تیمارهای باکتریایی و شرایط رطوبتی بر صفات ریشه‌ای در گیاه پروانش

ردیف	شرایط رطوبتی	نوع باکتری	میانگین صفات مورد ارزیابی		
			طول ریشه	حجم ریشه	سطح ریشه
۱	شاهد	شاهد	۱۸/۶۶۷ b	۱/۱۳۳c	۱۶/۲۹۸c
۲		تلقیح ترکیبی	۱۸/۰۰۰ b	۱/۷۶۷ b	۱۹/۹۸۳ b
۳		باکتری <i>P.f</i>	۱۶/۶۶۷ b	۱/۰۳۳c	۱۴/۶۹۶cd
۴		باکتری <i>A.b</i>	۲۳/۳۳۳ a	۲/۳۳۳a	۲۶/۱۵۰ a
۵	تنش	شاهد	۲۳/۰۰۰ a	۰/۸۰۰d	۱۵/۱۹۵cd
۶		تلقیح ترکیبی	۱۸/۳۳۳ b	۰/۸۰۰d	۱۳/۵۳۹ de
۷		باکتری <i>P.f</i>	۱۹/۳۳۳ b	۰/۸۰۰d	۱۳/۹۳۳d
۸		باکتری <i>A.b</i>	۱۹/۱۶۷ b	۰/۵۶۷e	۱۱/۶۴۱e

میانگین‌ها با حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند. *A.b* و *P.f* بترتیب نشان دهنده *P. fluorescens* و *A. brasilense* هستند.

را تا میزان ۲۳/۳۳ سانتی‌متر افزایش داد که با طول ریشه گیاهان شاهد در تنش کمبود آب برابری می‌کرد. سایر تیمارها از لحاظ طول ریشه در یک گروه قرار گرفتند. از نظر حجم و سطح ریشه نیز باکتری *A. brasilense* در شرایط تنش کمترین مقدار را دارا بود و پس از آن سایر تیمارهای باکتریایی در تنش کمبود آب در یک گروه قرار گرفتند و اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند.

طول، حجم و سطح ریشه: اثر متقابل سطوح مختلف تیمارهای باکتریایی در شرایط رطوبتی مختلف برای هر سه صفت مربوط به ریشه یعنی طول، حجم و سطح ریشه معنی‌دار بود (جدول ۴). مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارها برای این صفات نشان داد که هر سه صفت بیشترین مقدار را در تیمار با باکتری *A. brasilense* در شرایط عدم تنش داشته‌اند. این تیمار رشد طولی ریشه گیاه

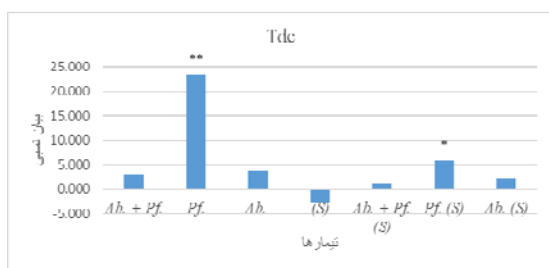
جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات ساده سطوح مختلف تیمار رطوبتی بر صفات اندازه‌گیری شده در گیاه پروانش

ردیف	تیمار	میانگین صفات	
		ارتفاع	نسبت طول ریشه به ارتفاع
۱	شاهد	۱۵/۸۷۵ a	۱/۱۰۶b
۲	تنش رطوبتی	۱۱/۶۲۵b	۱/۷۳۷a

میانگین‌ها با حروف مشابه، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد با یکدیگر ندارند.

رطوبتی نسبت به گیاه شاهد کاهش غیرمعنی‌داری داشته است. در رابطه با تیمارهای باکتریایی در شرایط عدم تنش نیز، همانطور که در شکل مشاهده می‌شود تمام تیمارها افزایش بیان ژن را به دنبال داشته‌اند اما در مورد باکتری *P. fluorescens* این افزایش قابل توجه و در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. همچنین تلفیق باکتری‌ها با تیمار تنش کمبود آب، موجب شد تا تیمارهای باکتریایی اثر کمتری بر روی بیان این ژن داشته باشند. در این میان، باز هم باکتری *P. fluorescens* کمتر از سایرین تحت تاثیر تنش قرار گرفته و افزایش معنی‌دار بیان ژن را در پی داشته است.

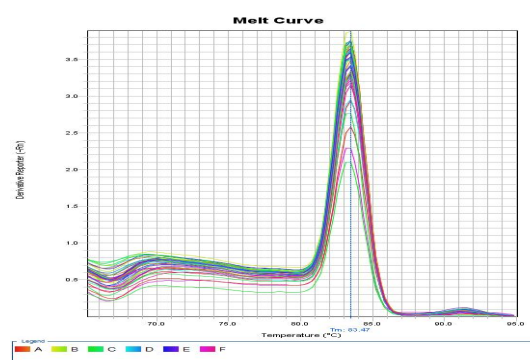
بیان ژن Tdc در ریشه گیاهان برای تمام تیمارهای باکتریایی در شرایط تنش کمبود آب نسبت به شاهد تحت تنش، افزایش داشت (شکل ۶) که باز هم بیشترین میزان افزایش به باکتری *P. fluorescens* (۱۶/۶۴) و سپس باکتری *A. brasilense* (۶/۹۸) تعلق داشت. همانطور که نتایج نشان می‌دهد، هنگامی که دو باکتری به طور جداگانه اعمال شدند، اثر بیشتری بر بیان ژن Tdc در هر دو شرایط رطوبتی داشتند.



شکل ۵- بیان نسبی ژن Tdc تحت تیمار با تنش کمبود آب و باکتری-های تقویت‌کننده رشد در شرایط نرمال و تنش نسبت به شاهد در ریشه گیاه پروانش، ۳۰ روز پس از اعمال تیمار رطوبتی حروف *P.f*، *A.b* و *S* بترتیب نشان دهنده *P. fluorescens*، *A. brasilense* و شرایط تنش هستند. * و **: بترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

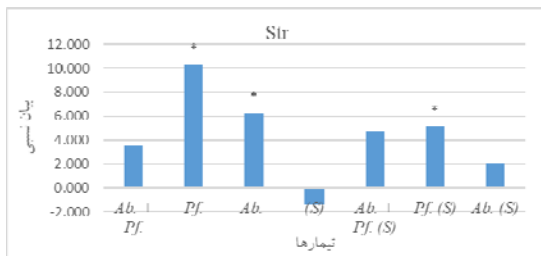
نسبت طول ریشه به ارتفاع گیاه: این صفت نیز تنها تحت تاثیر تیمار تنش خشکی قرار گرفت. مطابق با نتایج جدول تجزیه واریانس و مقایسه میانگین، تیمار تنش خشکی، نسبت طول ریشه به ارتفاع گیاه را در سطح احتمال یک درصد افزایش داد.

ارزیابی‌های مولکولی بیان ژن: در این تحقیق برای نرمال-سازی داده‌ها، از ژن RPS9 به عنوان ژن خانه‌دار استفاده شد. کارایی این آغازگر به عنوان یک ژن خانه‌دار مناسب در گیاه پروانش تایید شده است. چرا که مقادیر Ct آن تحت تاثیر تیمارهای مختلف قرار نگرفته و در تحقیقات مختلف انجام شده بر روی این گیاه، برای تمام نمونه‌ها، تقریباً ثابت بوده است (۲۴ و ۲۵). در تحقیق حاضر نیز مقادیر Ct مربوط به این آغازگر برای تمام نمونه‌ها، نزدیک به هم بود. ولی مقادیر Ct آغازگرهای Tdc و Str، در بین تیمارهای مختلف با هم تفاوت داشت. این موضوع بر تاثیر تیمارهای مختلف اعمال شده بر میزان بیان ژن‌های مورد بررسی، دلالت دارد. منحنی ذوب حاصل از همه نمونه‌ها، تکثیر مطلوب توالی هدف را در تیمارهای مختلف نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- نمونه‌ای از منحنی ذوب حاصل از تکثیر توالی هدف

اثر تیمارهای مختلف بر بیان نسبی ژن Tdc، ۳۰ روز پس از اعمال تنش رطوبتی: اثرات تیمارهای مختلف بر بیان نسبی ژن Tdc نسبت به گیاه شاهد، در شکل ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که ۳۰ روز پس از اعمال تنش کمبود آب، بیان ژن Tdc در شرایط تنش



شکل ۷- بیان نسبی ژن Str تحت تیمار با تنش کمبود آب و باکتری-های تقویت‌کننده رشد در شرایط نرمال و تنش نسبت به شاهد در ریشه گیاه پروانش، ۳۰ روز پس از اعمال تیمار رطوبتی

حروف *P.f*، *A.b* و *S* بترتیب نشان دهنده *P. fluorescens*، *A. brasilense* و شرایط تنش هستند.

*: معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد



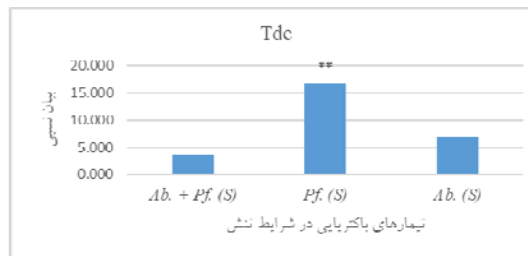
شکل ۸- بیان نسبی ژن Str تحت تیمار با باکتری‌های تقویت‌کننده رشد در شرایط تنش رطوبتی نسبت به شاهد تحت تنش در ریشه گیاه پروانش، ۳۰ روز پس از اعمال تیمار رطوبتی

حروف *P.f*، *A.b* و *S* بترتیب نشان دهنده *P. fluorescens*، *A. brasilense* و شرایط تنش هستند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش تأثیر هشت تیمار شامل تلفیق فاکتوریل دو گونه از باکتری‌های PGPR به صورت جداگانه و توأم با تنش رطوبتی، بر برخی صفات ریخت‌شناسی و نیز میزان بیان دو ژن کلیدی در دو شاخه مختلف مسیر بیوسنتزی انواع TIA، یعنی مسیر ایندولی (Tdc) و مسیر میانی (Str) در ریشه گیاه، ۳۰ روز پس از اعمال تیمار رطوبتی مورد بررسی قرار گرفت.

کمبود آب در جریان تولید گیاهان می‌تواند صدمات سنگینی به رشد و نمو و همچنین بر کمیت و کیفیت مواد مؤثره گیاهان دارویی وارد نماید (۳). در مطالعه حاضر،



شکل ۶- بیان نسبی ژن Tdc تحت تیمار با باکتری‌های تقویت‌کننده رشد در شرایط تنش رطوبتی نسبت به شاهد تحت تنش در ریشه گیاه پروانش، ۳۰ روز پس از اعمال تیمار رطوبتی

حروف *P.f*، *A.b* و *S* بترتیب نشان دهنده *P. fluorescens*، *A. brasilense* و شرایط تنش هستند.

** : معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

اثر تیمارهای مختلف بر بیان نسبی ژن Str، ۳۰ روز پس از اعمال تنش رطوبتی: مطابق با شکل ۷، به‌کارگیری تیمارهای باکتریایی میزان بیان ژن Str را نسبت به گیاه شاهد افزایش داد. تیمار با باکتری *P. fluorescens* و سپس *A. brasilense* بیشترین افزایش بیان ژن را بترتیب به میزان ۱۰/۳۴ و ۶/۲۳ برابر موجب شد که در سطح پنج درصد معنی‌دار بود. هنگامی‌که این دو باکتری در تیمار ترکیبی کنار یکدیگر قرار گرفتند میزان بیان ژن کمتر از زمانی که هر یک به تنهایی اعمال شدند، افزایش یافت. یعنی در شرایط عدم تنش هر یک از دو باکتری مورد استفاده به تنهایی بهتر از حالت ترکیبی عمل نمودند. همین تیمارها وقتی به مدت ۳۰ روز در شرایط تنش رطوبتی قرار گرفتند، کارایی تیمار باکتری *A. brasilense* نسبت به حالت ترکیبی کاهش پیدا کرد. اما باز هم *P. fluorescens* بیشترین افزایش بیان ژن (۵/۱۲) را در پی داشت. همچنین بیان ژن Str در شرایط تنش خشکی نسبت به گیاه شاهد کاهش غیرمعنی‌داری (۱/۳۶-) نشان داد.

شکل ۸ نیز افزایش بیان ژن Str را در تمام تیمارهای باکتریایی در شرایط تنش کمبود آب نسبت به شاهد تحت تنش نشان می‌دهد.

بررسی‌های گذشته نشان داده است که ریزوباکتری‌های تقویت‌کننده رشد گیاه اثرات سودمندی را بر رشد و نمو گیاه اعمال می‌کنند. مکانیسم‌های عمومی تقویت رشد گیاه توسط انواع PGPR عبارت از تثبیت نیتروژن، کاهش سطوح اتیلن، تولید فیتوهورمون‌ها، القای مقاومت به پاتوژن، انحلال مواد غذایی، کاهش سمیت آلاینده‌ها می‌باشد (۱۷ و ۴۶). نژادهای فلورسنت باکتری *Pseudomonas* و نیز *A. brasilense* که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفته‌اند، هر دو در شمار باکتری‌های PGPR بوده و در منابع مختلف از آن‌ها به عنوان مهم‌ترین و بزرگ‌ترین ریزوباکتری‌های تقویت‌کننده رشد یاد شده است (۱، ۳۰ و ۳۲). همانطور که از نتایج این پژوهش پیداست در میان تیمارهای باکتریایی، باکتری *A. brasilense* در مورد صفات ریشه‌ای، در شرایط عدم تنش کمبود آب، به خوبی عمل کرده و افزایش طول، حجم و سطح ریشه را در پی داشته است. این گونه باکتریایی در بهبود سیستم ریشه‌ای گیاه نیشکر از طریق افزایش ریشه‌های موئین، جانبی و نابجا موثر بوده است (۲۷). تیمار ارقام گندم نیز با دو سویه از باکتری *A. brasilense* در غلظت 10^4 cfu/ml و شرایط بدون تنش، وزن خشک ریشه را به طور معنی‌داری افزایش داد (۱۰). همچنین افزایش طول ریشه در لوبیای تلقیح شده با *A. brasilense* گزارش شده است (۲۱). همانطور که بیان شد، باکتری‌های PGPR در تنظیم تولید اتیلن و کاهش آن در گیاه نقش دارند و تنظیم تولید اتیلن در افزایش رشد طولی ریشه و تاثیر غیرمستقیم بر افزایش ریشه‌زایی موثر است (۱). طبق گزارش برخی از محققین استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد نقش قابل توجهی در افزایش رشد ریشه گیاهان دارد (۶). این باکتری‌ها نیز قادر به تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی از قبیل اکسین، سیتوکینین و جیبرلین هستند (۱۷ و ۳۰) و می‌توانند با تولید این فیتوهورمون‌های مختلف، آرایش و ساختار ریشه را تغییر داده و بر رشد و نمو گیاه اثر گذارند (۳۴). لازم به ذکر است که در پژوهش حاضر، در شرایط

تنش کمبود آب ارتفاع گیاه و حجم ریشه را نسبت به گیاه شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد ولی افزایش رشد طولی ریشه را به همراه داشت. افزایش رشد ریشه در اثر تنش کمبود آب، در گیاهانی مانند آفتابگردان (۳۶ و ۴۹) و پروانش (۳۰) گزارش گردیده است. یک سیستم ریشه‌ای قوی به ویژه در مراحل اولیه رشد، می‌تواند مزیت رشد سریع را برای گیاه فراهم آورد. چرا که آب موجود در لایه‌های سطحی خاک را که به راحتی از طریق تبخیر از دست می‌رود، جذب می‌نماید (۲۹). همچنین در مطالعه حاضر، با کاهش ارتفاع و افزایش رشد طولی ریشه، نسبت طول ریشه به ارتفاع گیاه افزایش یافت. در برخی مطالعات، تنش کمبود آب موجب کاهش مقادیر برخی از صفات رویشی گیاه پروانش از جمله ارتفاع گیاه شده است (۱۴ و ۳۷). هاشم‌آبادی در سال ۱۳۹۶ با مطالعه بر تاثیر نوع آب (آب شهر و آب چاه به صورت ساده و مغناطیس شده) و دور آبیاری بر گیاه پروانش، نشان داد که دورهای آبیاری تاثیر به‌سزایی در بهبود صفات رویشی و زایشی دارند، به طوری که با افزایش فاصله دور آبیاری، این صفات کاهش می‌یابند (۱۱). به طور کلی تنش کمبود آب، کارایی انتقال و تجمع مواد فتوسنتزی را کاهش داده و می‌تواند موجب کاهش رشد گیاه شود (۱۴). کاهش رشد در شرایط تنش ناشی از جلوگیری از تقسیم سلول، رشد سلول و یا هر دوی آن‌هاست. این اثرات ممکن است به دلیل تغییر در تعادل هورمون‌های گیاهی در اثر تنش باشد. چرا که مشخص شده تحت شرایط نامساعد محیطی، مقدار درون-زای هورمون‌های گیاهی دچار تغییرات اساسی می‌شود (۱۲). به گونه‌ای که افزایش در نسبت ریشه به ارتفاع، تحت شرایط تنش کمبود آب، به مقدار اسید آبسزیک ریشه‌ها و شاخه‌ها نسبت داده شده است (۲۶). پیشنهاد شده است که ABA می‌تواند به عنوان یک واسطه در پاسخ گیاهان به طیف وسیعی از تنش‌ها از جمله تنش کمبود آب عمل کند و همچنین گیاه را قادر می‌سازد تا در شرایط نامساعد محیطی زنده بماند (۲۲).

تنش، از کارایی تیمارهای باکتریایی در رابطه با صفات ریشه‌ای کاسته شد. از آنجا که نقش این باکتری‌های مفید، به عنوان باکتری‌های بیوکنترل موجود در منطقه ریشه، در ایجاد مقاومت سیستمیک به پاتوژن‌ها در گیاهان مختلف به اثبات رسیده است (۴۳، ۴۴ و ۴۷)، شاید بتوان گفت که ایفای این نقش و همچنین تاثیر بر بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی متابولیت‌های ثانویه، می‌تواند منجر به کاهش اثرشان بر صفات رویشی گیاه از جمله ارتفاع در پروانش به ویژه در شرایط بروز تنش گردد.

از نظر تاثیر تیمارهای مختلف بر بیان ژن‌های مورد بررسی، باکتری *P. fluorescens* بهتر از سایر تیمارها عمل نمود و در هر دو شرایط تنش و عدم تنش موجب افزایش معنی‌دار بیان هر دو ژن مورد بررسی نسبت به گیاه شاهد شد. دو ژن *Str* و *Tdc* در مطالعات گذشته نیز سابقه تنظیم بیان مشترک را داشته‌اند. به عنوان نمونه، در مطالعه *Pauw et al.* در سال ۲۰۰۴ این دو ژن در پاسخ به الیستورهای قارچی مانند عصاره مخمر، به صورت هماهنگ با هم تنظیم و بیان شدند (۴۱). *P. fluorescens* در مقایسه با شاهد تحت تنش نیز افزایش معنی‌دار بیان ژن *Str* را موجب گردید. به طور کلی، در مطالعه حاضر، تیمارهای باکتریایی *P. fluorescens* و *A. brasilense*، به طور جداگانه در مقایسه با تلقیح ترکیبی، بیان ژن‌ها را در شرایط بدون تنش و تحت تنش نسبت به گیاهان شاهد بدون تنش و تحت تنش افزایش دادند.

همانطور که بیان شد، نقش ریزوباکتری‌های غیر بیماری‌زا یا PGPR در ایجاد نوعی مقاومت به نام "مقاومت سیستمیک القایی" (ISR) Induced systemic resistance در گیاهان اثبات شده است (۱۶). ویژگی قابلیت دفاعی ISR به این صورت است که گیاهان سطوح جاسمونیک اسید را به عنوان علامتی از دفاع فعال افزایش می‌دهند. همچنین حساسیت گیاه را نسبت به مقادیر اتیلن بالا می‌برند. این مولکول‌های علامت‌رسان به نوبه خود فعالیت

مجموعه وسیعی از پاسخ‌های دفاعی را هماهنگ می‌کنند (۲، ۱۶ و ۴۴). یک پاسخ دفاعی مهم که به جاسمونات‌ها به عنوان مولکول‌های علامت‌رسان بستگی دارد، القای تجمع متابولیت‌های ثانویه می‌باشد (۵۳). نشان داده شده که کاربرد خارجی متیل جاسمونات (MeJA)، القای تولید متابولیت‌های ثانویه را در ۳۶ گونه گیاهی مختلف به دنبال داشته است (۴۶). جاسمونات‌ها تولید متابولیت‌های ثانویه را در سطح رونویسی و از طریق راه‌اندازی هماهنگ یک مجموعه از ژن‌های بیوستتزی القا می‌کنند. در مطالعه *Van der Fits and Memelink* در سال ۲۰۰۰ تیمار متیل جاسمونات، متابولیسیم TIA را در سوسپانسیون سلولی *C. roseus* تحریک نموده و افزایش بیان تمام ژن‌های مورد آزمون مسیر بیوستتزی TIA را در پی داشت (۵۰). در مطالعه مذکور عامل رونویسی Octadecanoid-derivative responsive Catharanthus AP2-domain protein 3 (ORCA3) در پاسخ به متیل جاسمونات فعال شده و بیان تعدادی از ژن‌های مسیر بیوستتزی از جمله ژن *Str* (استریکتوسیدین سنتتاز) را کنترل نمود. ORCA3 و فاکتور رونویسی مرتبط با آن به نام ORCA2 یک ناحیه متصل شونده به DNA-binding domain DNA از نوع عامل رونویسی اتیلن APETALA2/ethylene response factor (AP2/ERF) دارند. این دو عامل رونویسی در تعامل با یکدیگر پروموتور *Str* را از طریق اتصال اختصاصی توالی به "عامل پاسخ دهنده به الیستور و جاسمونات" (JERE) Jasmonate- and elicitor-responsive element که حاوی جعبه GCC می‌باشد، فعال می‌کنند. بیان ژن‌های ORCA به سرعت توسط متیل جاسمونات القا می‌شود که خود دال بر این است که عوامل ORCA سطح بیان خود را یا به‌طور خودکار و یا توسط یک یا چند عامل رونویسی در بالا دست ژن تنظیم می‌کنند. گزینه دوم، یعنی یک جریان رونویسی Transcriptional cascade که بیان ژن پاسخ دهنده به تنش را در گیاه تنظیم می‌کند، برای مسیر علامت‌دهی اتیلن و علامت‌دهی سرما نیز پیشنهاد شده

P. fluorescens و *A. brasilense* عامل فعال کننده ORCA3 تاثیرگذارتر بوده و در تیمار ترکیبی این دو باکتری طی مکانیسمی که مشخص نیست هر دو عامل فعال کننده و مهار کننده موثر بوده‌اند.

با توجه به اثبات وجود رابطه مثبت بین میزان بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی TIA و تجمع آلکالوئیدهای مرتبط با این ژن‌ها در گیاه پروانش (۱۸، ۲۵ و ۵۲) انتظار می‌رود با افزایش بیان دو ژن Tdc و Str، محصول این ژن‌ها و نیز محصولات نهایی مسیر بیوستتزی TIA از جمله مقدار آجمالیسین در ریشه گیاه پروانش افزایش یابد. همانطور که در مطالعه *Jaleel et al* در سال ۲۰۰۷ نیز مقدار آجمالیسین ریشه، به موجب تیمار گیاهان تحت تنش کمبود آب با باکتری *P. fluorescens* افزایش یافت.

همچنین، این احتمال وجود دارد که شدت تنش به‌کار رفته و نیز طولانی بودن مدت زمان اعمال تنش کمبود آب، موجب کاهش اثر برخی از تیمارها از جمله تنش بر بیان ژن‌های مورد بررسی شده باشد. بنابراین پیشنهاد می‌شود که آزمایش مشابهی با شدت تنش ملایم‌تر و طول زمان کمتر اعمال تنش، در گیاه پروانش انجام شود.

سپاسگزاری

با تشکر از کادر با محبت آزمایشگاه مرکزی دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج و آقایان مهندس پورصفر، مهندس سلیمانی و کلیه کسانی که در این کار ما را یاری نمودند.

است. در تحقیقی، عامل رونویسی WRKY در گیاه پروانش که به طور ویژه در ریشه‌ها و در پاسخ به فیتوهورمون‌هایی نظیر جاسمونات، جیبرلین و اتیلن بیان می‌شود، مورد مطالعه قرار گرفت. در این تحقیق نشان داده شد که افزایش بیان عامل رونویسی CrWRKY2 در پاسخ به متیل جاسمونات، در کشت ریشه‌های مویین پروانش، باعث افزایش بیان چندین ژن مسیر بیوستتزی TIA به ویژه Tdc شد. به علاوه سطح بیان عامل رونویسی فعال کننده ORCA3 و عامل مهار کننده ZCT را نیز افزایش داد (۴۸). القای همزمان عوامل رونویسی فعال کننده و مهار کننده ممکن است برای تغییر خاموش و روشن شدن ژن‌ها در پاسخ به محرک‌ها ضروری باشد (۷). در گزارشی نیز نشان داده شد که کاربرد متیل جاسمونات موجب افزایش بیان ژن‌های Tdc، G10h، Str در مسیر بیوستتزی TIA در گیاه پروانش می‌شود (۵۳). در مطالعه‌ای دیگر، کاربرد تیمار اتیلن تاثیر مثبتی را بر TIA گیاه پروانش در سطح رونویسی و متابولیتی داشت (۵۲).

با توجه به مطالب فوق، شاید بتوان استنباط نمود که با اعمال تیمار PGPR در گیاه پروانش، پاسخ جاسمونیک اسید فعال شده است. این پاسخ نیز به نوبه خود موجب افزایش بیان عامل رونویسی CrWRKY2 و متعاقباً عامل فعال کننده ORCA3 و عامل مهار کننده ZCT گردیده و به این ترتیب بر بیان ژن‌های مسیر بیوستتزی TIA تاثیر گذاشته است. از این منظر، می‌توان بیان نمود که نتایج این تحقیق با نتایج Suttipanta (۴۸) و Zhang *et al* (۵۳) هم-خوانی دارد. به گونه‌ای که در تیمار جداگانه

منابع

- ۱- احمدزاده، م. ۱۳۹۱. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی، باکتری-های پروبیوتیک گیاهی. انتشارات دانشگاه تهران ۴۹۰ صفحه.
- ۲- احمدزاده، م. ۱۳۹۲. کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی، مکانیسم-ها و سیستم‌های تنظیم کننده ژنتیکی. انتشارات دانشگاه تهران ۳۶۹ صفحه.
- ۳- بابایی، ک.، امینی دهقی، م.، مدرس ثانوی، س. ع. م. و جباری، ر. (۱۳۸۹). اثر تنش خشکی بر صفات مورفولوژیک، میزان پرولین و درصد تیمول در آویشن (*Thymus vulgaris* L.). فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. ۲۶ (۲): ۲۳۹-۲۵۱.

- ۹- غلامحسین‌پور، ز.، همتی، خ.، دورودیان، ح. ر.، قاسم‌نژاد، ع. و شرفی، ع. تأثیر سطوح مختلف نیتروژن بر عملکرد و غلظت آلکالوئیدهای وین‌بلاستین و وین‌کریستین در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* G. Don). مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۲۷ (۲): ۲۶۹-۲۷۵.
- ۱۰- قاسمی، ح.ر. و مستاجران، ا. (۱۳۹۷). بررسی اثر همیاری باکتری *Azospirillum brasilense* Sp7 (and Sp245) بر شاخص‌های رشد و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی دانه‌رست‌های گندم (*Triticum aestivum* L) در شرایط شوری. مجله پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران). ۳۱ (۳): ۶۲۹-۶۴۱.
- ۱۱- هاشم‌آبادی، د. (۱۳۹۶). تغییر فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز تحت تأثیر انواع آب و دور آبیاری در گیاه زیتنی پروانش. مجله علوم باغبانی ایران. ۴۸ (۱): ۴۹-۵۹.
- ۱۲- واجدی، س.ج.، ارادتمند اصلی، د. و محمدی ایچی، ر. (۱۳۹۰). اثرات جیبرلیک اسید بر شاخصه‌های جوانه‌نی گل‌رنگ تحت تنش خشکی. ششمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی. ۹ صفحه.
- ۱۳- Almagro, L., Fernández-Pérez, F. and Pedreño, M.A. (2015). Indole alkaloids from *Catharanthus roseus*: bioproduction and their effect on human health. *Molecules*. 20: 2973-3000.
- ۱۴- Amirjani, M. R. (2013). Effects of drought stress on the alkaloid contents and growth parameters of *Catharanthus roseus*. *ARPN Journal of Agricultural and Biological Science*. 8 (11): 745-750.
- ۱۵- Ardakani, S., Heidary, A., Tayebi, L. and Mohammadi, M. (2010). Promotion of cotton seedling growth characteristics by the development and use of new bioformulations. *International Journal of Botany*. 6: (2): 95-100.
- ۱۶- Beneduzi, A., Ambrosini, A. and Passaglia, L.M.P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. 35 (4): 1044-1051.
- ۱۷- Bhattacharyya, P.N. and Jha, D.K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biology and Fertility of Soils*. 32: 259-264.
- ۱۸- عزیزاده، ا. (۱۳۸۵). رابطه آب و خاک و گیاه. انتشارات آستان قدس رضوی. چاپ ششم. ۴۷۰ صفحه.
- ۱۹- بقائی راوری، س.، مسلم‌خانی، ک. و خلفتی‌بنا، ف. (۱۳۹۵): فیتوپلاسم‌های بیمارگر گیاهی. انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی. ۲۳۱ صفحه.
- ۲۰- پیوندی، م.، سید طالبی، س. م. و مجد، ا. (۱۳۹۵). تأثیر میدان مغناطیسی، محیط کشت و تنظیم‌کننده‌های رشد بر جوانه‌زنی بذر گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.). زیست‌شناسی تکوینی. ۹ (۱): ۶۹-۷۸.
- ۲۱- دهقانی بیدگلی، م. (۱۳۹۸). بررسی امکان افزایش عملکرد فیزیولوژیکی گیاه دارویی *Lippia citriodora* L. با استفاده از محرک‌های زیستی در شرایط تنش شوری. فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی. ۲۷ (۳): ۷۷-۸۸.
- ۲۲- شعبانی، م.، فارسی، م. و میرشمسی کاخکی، ا. (۱۳۹۳). بررسی اثر اتیلن بر بیان ژن‌های DAT, G10H, T16H و AVLBS در گیاه پروانش (*Catharanthus roseus* L.). ژنتیک نوین. ۹ (۲): ۱۵۱-۱۶۰.
- ۲۳- Dutta, A., Batra, J., Pandey-Rai, S., Singh, D., Kumar, S. and Sen, J. (2005). Expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic pathway genes corresponds to accumulation of related alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Planta*. 220 (3): 376-383.
- ۲۴- Elfeky, S. S., Osman, M.E.H., Hamada, S.M. and Hasan, A.M. (2007). Effect of salinity and drought on growth criteria and biochemical analysis of *Catharanthus roseus* shoot. *International Journal of Botany*. 3 (2): 202-207.
- ۲۵- Fukami, J., Ollero, F. J., Megías, M. and Hungria, M. (2017). *AMB Express*. 7 (153): 1-13.
- ۲۶- German, M. A., S. Burdman, O. Yaacov and J. Kigel. 2000. Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biol Fertil Soils*, 32:259-264
- ۲۷- Ghorbani Javid, M., Sorooshzadeh, A., Moradi, F., Modarres Sanavy, S.A.M., Allahdadi, I. (2011). The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*. 5(6):726-734.
- ۲۸- Ghorbanpour, M. and Hatami, M. (2013). PGPR strains affect seedling vigor index and seed secondary metabolites accumulation of black

- henbane under water stress. *Trakia Journal of Sciences*. 2: 135-143.
- 24- Goklany, Sh. (2007). Monitoring the expression of TIA pathway genes in *Catharanthus roseus* hairy root cultures under optimum elicitation conditions. Master's thesis, Northeastern University, Boston. Department of Chemical Engineering.
- 25- Goklany, Sh., Loring, R.H., Glick, J. and Lee-Parsons, C.W.T. (2009). Assessing the limitations to terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* hairy root cultures through gene expression profiling and precursor feeding. *Biotechnology Progress*. 25 (5): 1289- 1296.
- 26- Gonzalez, A.J., Larraburu, E.E. and Lorente, B.E. (2015). *Azospirillum brasilense* increased salt tolerance of Jojoba during in vitro rooting. *Industrial Crops Products*. 76: 41-48.
- 27- Gouda, S., Kerry, R.G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H.S. and Patra, K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*. 206: 131-140.
- 28- Gupta, S., Pandey-Rai, S., Srivastava, S., Naithani, S.C., Prasad, M. and Kumar, S. (2007). Construction of genetic linkage map of the medicinal and ornamental plant *Catharanthus roseus*. *Journal of Genetics*. 86 (3): 259- 268.
- 29- Jaleel, C.A., Gopi, R., Gomathinayagam, M., Panneerselvam, R. (2009). Traditional and non-traditional plant growth regulators alters phytochemical constituents in *Catharanthus roseus*. *Process Biochemistry*. 44: 205-209.
- 30- Jaleel, C.A., Manivannan, P., Sankar, B., Kishorekumar, A., Gopi, R., Somasundaram, R. and Panneerselvam, R. (2007). *Pseudomonas fluorescens* enhances biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus* under water deficit stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 60 (1): 7-11.
- 31- Jaleel, C.A., Murali, P.V., Gomathinayagam, M., Lakshmanan, G.M.A. and Panneerselvam, R. (2008). Water deficit stress effects on reactive oxygen metabolism in *Catharanthus roseus*; impacts on ajmalicine accumulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 62 (1): 105-111.
- 32- Karthikeyan, B., Jaleel, C.A. and Azooz, M.M. (2009). Individual and Combined Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on Biomass Yield and Ajmalicine Production in *Catharanthus roseus*. *Academic Journal of Plant Sciences*. 2 (2): 69-73
- 33- Karthikeyan, B., Joe, M.M., Jaleel, C.A. and Deiveekasundaram, M. (2010). Effect of root inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on plant growth, alkaloid content and nutrient control of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *National Croat*. 19 (1): 205-212.
- 34- Kloepper J.W., Gutierrez-Estrada, A. and McInroy, J.A. (2007). Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal Microbiol*. 53 (2):159-167.
- 35- Lata. B. (2007). Cultivation, mineral nutrition and seed production of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don in the temperate climate zone. *Phytochemistry Reviews*. 6: 403 - 41.
- 36- Manivannan, P., Jaleel, C.A., Sankar, B., Kishorekumar, A., Somasundaram, R., Alagu Lakshmanan, G.M. and Panneerselvam, R. (2007). Growth, biochemical modifications and proline metabolism in *Helianthus annuus* L. as induced by drought stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 59: 141-149.
- 37- Misra N. and Gupta A.K. (2006). Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. *Journal of Plant Physiology*. 163 (1): 11-18.
- 38- Mokhaberi, A., Ahmadi, J. and Mafakheri, S. (2013). The expression profile of D4H and DAT genes in *Catharanthus roseus* in response to drought, salinity and salicylic acid. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*. 2 (2): 38-46.
- 39- Oksman-Caldentey, K.M. and Inze, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in Plant Science*. 9 (9): 433-440.
- 40- Osman, M.E.H., Elfeky, S.S., El-Soud, K.A. and Hasan, A.M. (2007). Response of *Catharanthus roseus* shoots to salinity and drought in relation to vincristine alkaloid content. *Asian Journal of Plant Science*. 6 (8): 1223-1228.
- 41- Pauw, B., Hilliou, F.A.O., Martin, V.S., Chatel, G., Wolf, C.J.F., *et al.* (2004). Zinc finger proteins act as transcriptional repressors of alkaloid biosynthesis genes in *Catharanthus*

- roseus*. The Journal of Biological Chemistry. 297 (51): 52940–52948.
- 42- Pfaffi, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. Nucleic Acids Researches. 29 (9): 2002-2007.
- 43- Pieterse, C.M. J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A. and van Loon, L.C. (1996). Systemic Resistance in Arabidopsis Induced by Biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. The Plant Cell. 8: 1225-1237.
- 44- Pieterse, C.M.J., Johan, A., Pelt, V., Saskia, C.M., Wees, V., *et al.* (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: signaling and expression triggering. European Journal of Plant Pathology. 107: 51–61.
- 45- Sain, M. and Sharma, V. (2013). *Catharanthus roseus* (An anti-cancerous drug yielding plant) - A review of potential therapeutic properties. International Journal of Pure and Applied Bioscience. 1 (6): 139-142.
- 46- Sekar, S. and Kandavel, D. (2010). Interaction of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and endophytes with medicinal plants- new avenues for phytochemicals. Journal of Phytology. 2(7): 91-100.
- 47- Sindhu, S.S., Rakshia, Y.S. and Sahu, G. (2009). Biological control of soilborne plant pathogens with rhizosphere bacteria. Pest Technology. 3 (1): 10-21.
- 48- Suttipanta, N. 2011. Characterization of G10H promoter and isolation of WRKY transcription factors involved in *Catharanthus* terpenoid indole alkaloid biosynthesis pathway. Dissertation, University of Kentucky, USA. Plant Physiology. 157: 2081–2093.
- 49- Tahir, M.H.N., Imran, M. and Hussain, M.K. (2002). Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines for drought tolerance. International Journal of Agriculture and Biology. 3: 398–400.
- 50- Van der Fits, L. and Memelink, J. (2000) ORCA3, a jasmonate responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science. 289:295-297.
- 51- Van der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D. and Verpoorte, R. (2004). The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. Current Medicinal Chemistry. 11 (5): 607-628.
- 52- Wang, X., Pan, Y., Chang, B., Hu, Y., Guo, X. and Tang, Z. (2016). Ethylene-induced vinblastine accumulation is related to activate expression of downstream TIA pathway genes in *Catharanthus roseus*. Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International. 2016: 8 pages.
- 53- Zhang, H., Hedhili, S., Montiel, G., Zhang, Y., Chatel, G., Pré, M., *et al.* 2011. The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. Plant Journal. 67: 61–71.
- 54- Zhu, X., Zeng, X., Sun, Ch. and Chen, Sh. (2014). Biosynthetic pathway of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus*. Frontiers of Medicine. 8(3): 285–293.

Evaluation of water deficit stress and plant growth-promoting rhizobacteria effect on some of morphological traits and expression level of Tdc and Str at the root of *Catharanthus roseus*

Ahmadzadeh M.¹, Keshtkar A.H.¹, Moslemkhani C.² and Ahmadzadeh M.³

¹ Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran.

² Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran.

³ College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Daneshkadeh Ave., Karaj, I.R. of Iran.

Abstract

Priwinkel is one of the most useable medicinal plants. Increase the concentrations of TIAs in plant organs, by biotic and abiotic treatments, is an important breeding objective on *C. roseus*. In the current research, the effect of plant growth promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* and *Azospirillum brasilense* separately and in combination along with moisture treatment at two levels were tested in *C. roseus* as a factorial experiment based on randomized complete block design in three replications. The effect of treatments was studied at the flowering stage on some of morphological traits. Tdc and Str expressions were evaluated in the root of plant by qRT-PCR reaction. Water deficit significantly increased root length but it had no significant effect on the expression of these genes. Treatment with *A. brasilense* in normal conditions enhanced length, volume and surface of roots, also significantly increased Str key gene expression. *P. fluorescens* had a positive and significant effect on the expression of the studied genes under normal and stress conditions compared to the control plants, despite the decrease in the amount of morphological traits. In terms of genes expression, two bacterial species, separately showed better performance and increased the gene expression in both water treatments compared to control plants under normal and stress conditions. It is expected that by increase of Tdc and Str expressions, the product of these genes as well as the final products of TIAs biosynthetic pathway including ajmalicine will enhance at the root of periwinkle plant.

Key words: *Catharanthus roseus*, Plant growth-promoting rhizobacteria, qRT-PCR reaction, Terpenoid indole alkaloid, Water deficit stress