



مقاله پژوهشی

افزایش تحمل گیاهچه‌های مکزیکن لایم (*Citrus aurantifolia* Swingle) تلقیح شده با اندوفیت‌های *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* استخراج شده از جلبک‌های دریایی نسبت به تنش شوری
لیلا بقازاده دریایی^۱، داود صمصام‌پور^{۲*}، عبدالنبی باقری^۳، جلوه سهرابی‌پور^۴

DOI:10.22124/japb.2022.20908.1444

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۰

چکیده

اندوفیت‌ها نقش مهمی را در محافظت از گیاهان ایفا می‌کنند. در این مطالعه، از ترکیب اندوفیتی *Aspergillus niger* و *Bacillus aquimaris* OD14 به منظور ارتقا تحمل گیاهچه‌های مکزیکن لایم نسبت به تنش شوری استفاده شد. سه ماه پس از تلقیح، تنش شوری صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر (با سه تکرار) اعمال شد. پس از هشت هفته، صفات ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی و میزان جذب عناصر گیاهچه‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، ترکیب اندوفیتی باعث افزایش طول ساقه (۱۰۳/۶۴ درصد)، قطر تنه (۱۰۳/۰۴ درصد) تعداد برگ (۴۴۴/۴۱ درصد) و طول و عرض ریشه (به ترتیب ۲۳۲/۰۲ و ۴۱/۶۳ درصد) نسبت به شاهد شد. اندوفیت باعث افزایش ۷۶/۲۹ درصدی کلروفیل کل نسبت به شاهد شد. همچنین، جذب عناصر پتاسیم ریشه (۳۴/۹۵ درصد) و کلسیم شاخساره (۱۱۵/۱۵ درصد) را افزایش و جذب عناصر سدیم شاخساره (۲۹/۴۹ درصد) را نسبت به شاهد کاهش داد. ترکیب اندوفیتی توانست باعث کاهش معنی‌دار نشت الکترولیت‌ها (۶۵/۵۷ درصد) و افزایش میزان پرولین (۶۹/۳ درصد) در گیاهچه‌های تلقیح شده نسبت به شاهد شود. به طور کلی، اندوفیت‌های دریایی می‌توانند به عنوان گزینه مناسب برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش شوری مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: اندوفیت قارچی، اندوفیت باکتریایی، تنش شوری، جذب عناصر، پرولین.

- ۱- دکتری بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۲- دانشیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
- ۳- استادیار گروه تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.
- ۴- استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرعباس، ایران.

* نویسنده مسئول: Samsampoor@hormozgan.ac.ir

مقدمه

اسکومیست استخراج شده از دریا، گزارش شده است (Nenkep et al., 2010).

در مسیر کشاورزی پایدار، استفاده از میکروارگانیسم‌های اندوفیت به عنوان کودهای زیستی، باعث افزایش عملکرد و رشد گیاه می‌شود، اثرات مخرب زیست محیطی را ندارد، سلامت خاک بیشتر حفظ خواهد شد و روشی مقرون به صرفه است (Pal et al., 2015). اندوفیت‌ها می‌توانند با ایجاد همزیستی با گیاه میزبان، علاوه بر افزایش رشد گیاه، باعث افزایش تحمل تنش در گیاه نیز شوند (Saravanakumar and Samiyappan, 2007).

اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی در ریشه بسیاری از گونه‌های گیاهی کلونیزه می‌شوند و جذب مواد مغذی را طی فرآیندهایی مانند محلول‌سازی عناصر، در گیاه افزایش می‌دهند (Arnold and Lutzone, 2007; Mishra et al., 2015). همچنین، اندوفیت‌ها قادر به تولید هورمون‌های گیاهی و عوامل کاهنده بیماری‌ها هستند (Bibi et al., 2012; Mei et al., 2014).

با توجه به رشد جلبک‌ها در محیط‌های آبی با شوری بالا، گرما، سرما، عناصر سنگین

دریاها، منبع عظیمی از ترکیبات و مواد فعال زیستی منحصر به فرد هستند. اکوسیستم‌های دریایی دارای منابع مهمی از میکروارگانیسم‌ها هستند که با توجه به شرایط بسیار متفاوت محیط‌های آبی نسبت به محیط‌های خشکی، به نظر می‌رسد شکل آبی آنها دارای قابلیت‌های متفاوت‌تری نسبت به گونه‌های مشابه خشکی باشند (Bandari et al., 2016).

میکروارگانیسم‌های به دست آمده از محیط‌های دریایی، دارای متابولیت‌های فعال زیستی بسیاری هستند که از آنها برای ساخت عامل‌های ضدسرطانی، ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدالتهابی استفاده شده است (Bhadury et al., 2006; Newman and Hill, 2006). برخی از قارچ‌های موجود در محیط‌های دریایی، دارای چارچوب‌های کربنی طبیعی استثنایی هستند. از ترکیبات ساخته شده توسط این قارچ‌ها، به عنوان پیش‌سازهای داروها و همچنین عامل‌های محافظتی گیاهان استفاده می‌شود (Kalyani and Hemalatha, 2016). یکی دیگر از خواص قارچ‌های دریایی، خاصیت نماتدکشی آنها است. وجود متابولیت‌های ضد میکروبی و ضدنماتد از

آب شور یکی از مهم‌ترین مشکلات مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری محسوب می‌شود. بین پیری برگ (در اثر کاهش میزان کلروفیل) و نفوذپذیری غشا در غلظت‌های بالای نمک ارتباط تنگاتنگی وجود دارد (Dhindsa et al., 1981). گزارش شده است که شوری باعث کاهش میزان کلروفیل و فعالیت فتوسیستم دو در بسیاری از گیاهان می‌شود (Nishihara et al., 2003). کاهش جذب مواد غذایی در اثر وجود عناصر کلر و سدیم در محیط، یک فرآیند رقابتی شناخته شده در ریشه گیاهان تحت تنش است. در اثر شوری، جذب عناصر غذایی کاهش و جذب یون‌هایی مثل سدیم افزایش می‌یابد (Mahmoudi and Zoghalchali, 2015). تجمع یون‌های سمی چون، کلر و سدیم در سلول‌های برگ‌ها باعث سوختگی و ریزش آنها و کاهش رشد و فتوسنتز در گیاه می‌شود (Gimeno et al., 2009). از سازوکارهای گیاهان برای مقابله با شوری، تجمع اسید آمینه پرولین در بافت گیاه است که به نوبه خود، اثرات مخرب تنش را کاهش می‌دهد (Yokoi et al., 2002). بررسی میکروسکوپی برگ‌های تحت تنش نشان داد برگ‌ها ضخیم شدند (Zekri and Parsons, 1990). میزان سطح برگ کاهش یافت، سطح ریشه نسبت به شاخساره

و بیمارگرها، به نظر می‌رسد، اندوفیت‌های همزیست با جلبک‌ها نیز می‌توانند این توانایی را پیدا کنند که باعث افزایش تحمل به تنش شوری در گیاهان شوند، آنها را در برابر تنش شوری محافظت کنند و با تولید متابولیت‌ها و ترکیبات زیستی با ارزش باعث ارتقای صفات رشدی، بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی گیاهان شوند.

میکروارگانسیم‌های القا کننده رشد گیاهان (Plant Growth Promoting Rhizobacteria: PGPR) قادر هستند، از طریق تولید آنزیم‌ها (Hamilton and Bauerle, 2012)، متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات فعال زیستی، تولید هورمون‌ها گیاهی از جمله سیتوکینین، ایندول استیک اسید و جیبرلین، تولید سیدروفورها و قابل جذب کردن عناصر غذایی، باعث رشد گیاه و کاهش حساسیت به عوامل بیماری‌زا و تنش‌های غیرزنده (Waqas et al., 2015) و افزایش زیست‌توده گیاه شوند (Redman et al., 2011). همچنین، باعث افزایش جوانه‌زنی، سطح برگ، میزان کلروفیل، مقدار پروتئین‌های گیاهی، گسترده‌گی ریشه و کاهش اتیلن می‌شوند (Bhattacharyya, 2012).

از مهم‌ترین نشانه‌های تنش شوری و به دنبال آن تنش خشکی در مرکبات می‌توان به علائم برگ‌گی مانند لوله‌ای شدن، رنگ پریدگی، قهوه‌ای شدن و سوختگی برگ‌ها اشاره کرد. در شدت‌های بالاتر شوری و خشکی اغلب ریزش برگ، گل و یا میوه اتفاق می‌افتد و درخت دچار ضعف عمومی در قسمت‌های رویشی و همچنین افت سطح باردهی خواهد شد (Aboutalebi and Hassanzadeh, 2016).

از روش‌های نوینی که امروزه به عنوان یک روش جایگزین برای روش‌های سنتی گذشته معرفی شده است، می‌توان به استفاده از میکروارگانسیم‌های اندوفیت تحریک کننده رشد اشاره کرد (Dodd and Perez-Alfocea, 2012). این میکروارگانسیم‌ها، از طریق تولید ترکیبات ضد میکروبی و آنزیم‌های تجزیه کننده سلول‌ها، جلوی رشد قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا را می‌گیرند (Hardoim et al., 2015; Choudhary et al., 2016; Vaishnav et al., 2017). همچنین، گزارش شده است که این میکروارگانسیم‌های همزیست قادر هستند در سطوح مختلف تنش، با تولید ترکیبات طبیعی، از گیاه میزبان خود محافظت کنند و رشد آن را افزایش دهند (Vaishnav et al., 2017). استفاده از اندوفیت‌ها به منظور

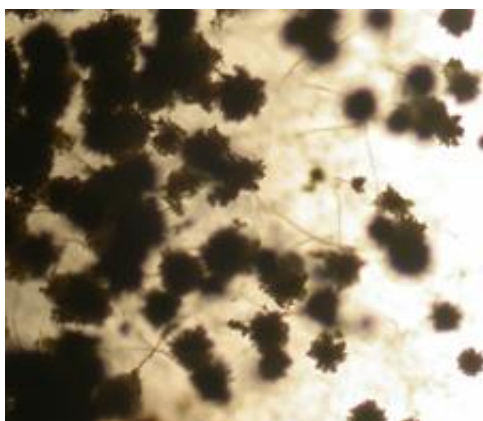
افزایش رشد داشت و نمک‌ها را در ریشه خود انباشته کرده بود و از انتقال آنها به بخش‌های هوایی، ممانعت می‌کرد (Moya et al., 1999). مرکبات از منابع مهم درآمد در بسیاری از کشورهای دنیا محسوب می‌شوند و نقش موثری در اقتصاد کشورهای تولید کننده دارند. در کشور ما نیز تولید مرکبات در بین میوه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و افراد بسیاری هستند که از تولید و فروش محصول آنها امرار معاش می‌کنند. خشکی و شوری، از متداول‌ترین و در عین حال مهم‌ترین تنش‌های غیرزنده موجود در گیاهان و از جمله مرکبات است که هر ساله خسارت قابل توجهی را به کشورهای مرکبات‌خیز وارد می‌آورد (Al-Yassin, 2005). جنس *Citrus* دارای گونه‌های متعددی از جمله مکزیکن لایم (لیموآب) با نام علمی *Citrus aurantifolia* Swingle است. این گیاه سالیان مدیدی است که در نواحی مرکزی، حاشیه دریای عمان، بندرعباس و بویژه در مناطق سرخون، میناب، رودان، دشت جیرفت، جهرم و ممسنی کشت می‌شود. شهرستان‌های رودان، میناب، بندرعباس و حاجی‌آباد از مناطق مهم تولید مکزیکن لایم در استان هرمزگان هستند.

کاهش اثرهای سوء شوری می‌تواند روش امیدوار کننده‌ای باشد که احتمالاً موجب ایجاد مکانیسم‌های سازشی می‌شود و یا دست کم باعث می‌شود گیاهان مواجه شده با تنش، رفتاری مشابه با گیاهان متحمل از خود نشان دهند. همچنین، نتایج کاربرد این روش در زمان کوتاهی قابل مشاهده و بررسی است. از این رو مطالعه حاضر با هدف ایجاد مقاومت به شوری در گیاهچه‌های مکزیکن لایم از طریق تلقیح اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی انجام شد.

Bacillus (MT420720) و باکتریایی *aquimaris* OD14 (با شماره دسترسی MT278260) از جلبک‌های خلیج فارس (به ترتیب از جزیره قشم و شهرستان بوشهر) استخراج شدند. جدایه باکتریایی به روش‌های ریخت‌شناسی، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA مورد شناسایی قرار گرفت. برای شناسایی جدایه قارچی از روش‌های ریخت‌شناسی، بررسی میکروسکوپی (شکل ۱) و مولکولی با استفاده از تکثیر نواحی حفاظت شده ITS1-4 استفاده شد. این جدایه‌ها برای ایجاد تحمل به تنش شوری در گیاهچه‌های مکزیکن لایم مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر اندوفیت‌های قارچی *Aspergillus niger* (با شماره دسترسی



شکل ۱: بررسی میکروسکوپی قارچ *Aspergillus niger* (بزرگنمایی $\times 400$). آرایش خوشه‌ای که مشخصه اصلی این جنس است به خوبی نمایان است.

به نسبت‌های ۲:۲:۱ به خوبی مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو (طب آزما تجهیز، ایران) شدند. تلقیح به روش اسپری برگ‌گی و تزریق یک میلی‌لیتر از مایه تلقیح به خاک اطراف ریشه انجام شد. تلقیح طی سه مرحله و با فاصله زمانی یک بار در هفته انجام شد (Ali et al., 2017). برای تلقیح، میزان تراکم سلولی باکتری‌ها 1×10^8 سلول در یک میلی‌لیتر محیط مایع و تراکم اسپورهای قارچی 1×10^6 سلول در یک میلی‌لیتر محیط مایع در نظر گرفته شد (Ali et al., 2017).

اندازه‌گیری ظرفیت زراعی گلدان‌ها

برای اندازه‌گیری ظرفیت زراعی گلدان‌ها (SWG) از روش Meggio و همکاران (۲۰۱۴) استفاده شد. ابتدا گلدان‌ها کاملاً آبیاری شدند، به طوری که آب از قسمت زهکش آنها جاری شد. سپس وزن تر گلدان‌ها اندازه‌گیری و یادداشت شد و بعد گلدان‌ها به مدت سه روز در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد درون آون خشک و وزن خشک آنها نیز اندازه‌گیری شد. برای محاسبه ظرفیت زراعی گلدان‌ها از رابطه ۱ استفاده شد (Meggio et al., 2014).

قبل از تلقیح، جدایه قارچی در محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) و جدایه باکتریایی در محیط کشت Nutrient Agar (NA) (Merck، آلمان) حاوی غلظت‌های مختلف نمک کشت شد و میزان تحمل به نمک در آنها مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ها از تحمل بالایی برخوردار بودند و برای تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

تهیه بذر و آماده‌سازی گیاهچه‌ها

برای انجام این پژوهش، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در گلخانه دانشگاه هرمزگان به اجرا درآمد. تیمارها شامل دو عامل شوری و اندوفیت بودند. عامل شوری، شامل چهار سطح کلرید سدیم (صفر، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر) و عامل اندوفیت، شامل ترکیب اندوفیت‌های قارچی *Bacillus* و *Aspergillus niger* و باکتریایی *aquimaris* OD14 بودند. گیاهچه‌های مکزیکن لایم به عنوان گیاه میزبان و حساس به شوری انتخاب شد. برای تهیه خاک بسترهای کشت بذرها و گیاهچه‌های به دست آمده، ماسه بادی، پیت ماس و کود پوسیده دامی به ترتیب

رابطه ۱:

$$SWG (\%) = [(FW - DW) / DW] \times 100$$

FW: وزن تر خاک (گرم)؛ DW: وزن خشک خاک (گرم).

گیاهچه‌ها در گلخانه دانشگاه هرمزگان با دمای ۳۵-۳۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۶۰ درصد نگهداری شدند. به گیاهچه‌های تلقیح شده سه ماه فرصت داده شد تا اندوفیت‌ها فرصت کافی برای رشد و تراکم درون گیاه داشته باشند و تغییرات قابل مشاهده در گیاه پدیدار شود. پس از گذشت سه ماه برای جلوگیری از وارد شدن تنش به گیاهچه‌ها، تنش شوری به صورت مرحله به مرحله اعمال شد. به این ترتیب که از شوری ۲۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر شروع و طی سه هفته به شوری سطح ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر رسانده شد. برای هر تیمار سه گیاهچه در نظر گرفته شد.

هشت هفته پس از اعمال آخرین سطح شوری در شرایط گلخانه‌ای، ابتدا یادداشت برداری‌های مزرعه‌ای شامل میزان رشد شاخساره، تعداد برگ و انشعاب، کلروفیل کل و نسبت Fv/Fm انجام شد و سپس گیاهچه‌های تیمار شده برای انجام بررسی‌های آزمایشگاهی برداشت شدند.

برداشت گیاهچه‌های تیمار شده

برداشت طی دو مرحله انجام گرفت، ابتدا نمونه‌های برگ برداشت و توزین شدند (از هر نهال حدود ۳ گرم برگ برداشت شد) و پس از قرار دادن درون فویل پست‌نویسی شده و انجماد در ازت مایع، سریعاً به یونولیت حاوی یخ منتقل شدند. در مرحله دوم، گیاهچه‌ها به طور کامل از خاک خارج و درون پلاستیک‌های مجزای شماره‌گذاری شده قرار داده شدند و به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه هرمزگان منتقل شدند.

میزان رشد شاخساره

در ابتدا و انتهای دوره تنش شوری، طول و قطر شاخساره بر حسب سانتی‌متر با استفاده از خط کش و کولیس اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری قطر تنه، فاصله چهار سانتی‌متری از سطح خاک در نظر گرفته شد.

طول و عرض ریشه

در انتهای اعمال تنش شوری، گیاهچه‌ها کاملاً از خاک خارج شدند و طول و عرض ریشه (گسترده‌گی ریشه) با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شدند.

تعداد برگ و انشعاب

تعداد برگ‌های توسعه یافته گیاه قبل و بعد از اعمال تنش شوری شمارش شد. همچنین، تعداد انشعابات گیاهچه‌ها نیز شمارش و ثبت شد.

نشت الکترولیت‌های غشای سلولی برگ‌ها

به منظور محاسبه نشت الکترولیت‌های (EL) سلولی در برگ‌ها، از برگ‌های شسته شده بدون رگبرگ پنج دیسک هم اندازه با قطر ۱ سانتی‌متر تهیه شد. دیسک‌ها درون فالكون‌های ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و به آنها ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد. فالكون‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور با ۱۲۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، هدایت الکتریکی (Electrical Conductivity: EC) آب حاوی دیسک‌ها با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج (HQ 40d, HACH, آمریکا) خوانده شد. سپس فالكون‌ها، به مدت ۲۰ دقیقه در درون اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر گرمادهی و سپس در دمای اتاق خنک شدند و دوباره هدایت الکتریکی آب درون آنها با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج خوانده شد. در نهایت با دو مقدار هدایت الکتریکی به دست آمده و با

استفاده از رابطه ۲ میزان نشت الکترولیت‌های سلولی محاسبه شد (Whitlow et al., 1992).

رابطه ۲:

$$EL (\%) = (EC_1 / EC_2) \times 100$$

EC₁: خوانش هدایت الکتریکی اولیه (میکروزیمنس بر سانتی‌متر)؛ EC₂: هدایت الکتریکی ثانویه (میکروزیمنس بر سانتی‌متر).

سنجش کلروفیل کل برگ

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل نمونه‌ها از دستگاه کلروفیل‌سنج (SPAD-502, Minolta، ژاپن) استفاده شد. در این روش مقدار کلروفیل کل از سه ناحیه مختلف برگ خوانده و میانگین آن محاسبه شد (Ling et al., 2011). این خوانش قبل از انجام نمونه برداری گیاهچه‌ها و درون گلخانه انجام گرفت. همچنین با استفاده از دستگاه کلروفیل‌سنج فلورسنت (Hansatech, Pocket PEA, انگلستان) نیز برای سنجش میزان حداکثر فعالیت فتوسیستم II (Fv/Fm) مورد استفاده قرار گرفت. بازده کلروفیل فلورسنت یا نسبت Fv/Fm یکی از شاخص‌های اندازه‌گیری میزان خسارت وارد شده به گیاه تحت شرایط تنش است. این شاخص عبارت است از حداکثر کارایی فتوشیمیایی فتوسیستم II که در سنجش‌های صفات رشدی گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد.

اضافه و به خوبی مخلوط شد. محلول پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد تا دو فاز مجزا تشکیل شود. از فاز رویی برای اندازه‌گیری پرولین استفاده شد. محلول رویی در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر (Cecil, CE2501, ژاپن) خوانده شد.

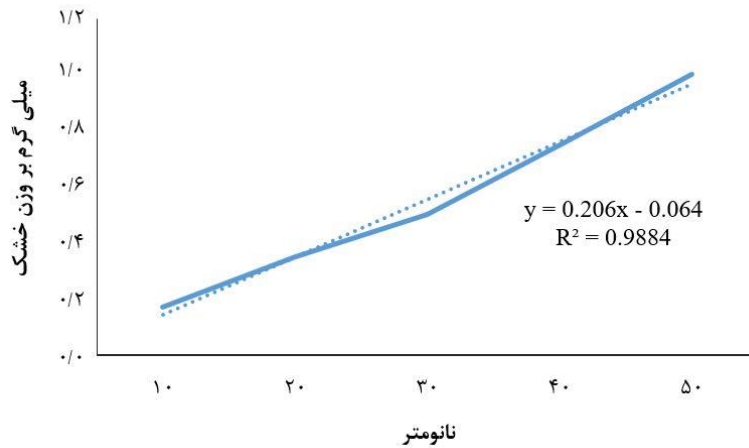
اندازه‌گیری عناصر پتاسیم، سدیم و کلسیم
برای اندازه‌گیری عناصر پتاسیم، سدیم و کلسیم موجود در برگ و ریشه گیاه تیمار شده نسبت به شاهد از روش Pratt و Chapman (۱۹۶۱) استفاده شد. ابتدا شاخساره و ریشه گیاه به طور مجزا در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. سپس ۰/۱ گرم از هر بافت گیاه به مدت ۲ ساعت درون کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد حرارت‌دهی شد تا خاکستر آنها به دست آید. به منظور هضم اسیدی خاکستر به دست آمده، به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۰/۲ نرمال اضافه و به مدت ۱ ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد خشک (آون)، قرار داده شدند. نمونه‌ها با استفاده از کاغذ صافی فیلتر و با آب دیونیزه به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. میزان عناصر پتاسیم، سدیم و کلسیم موجود در نمونه‌ها با استفاده از دستگاه فلم‌فتومتر (Elex6361،

این اندازه‌گیری‌ها نیز در گلخانه و قبل از برداشت نمونه‌های گیاهی انجام شد (Rivero et al., 2009).

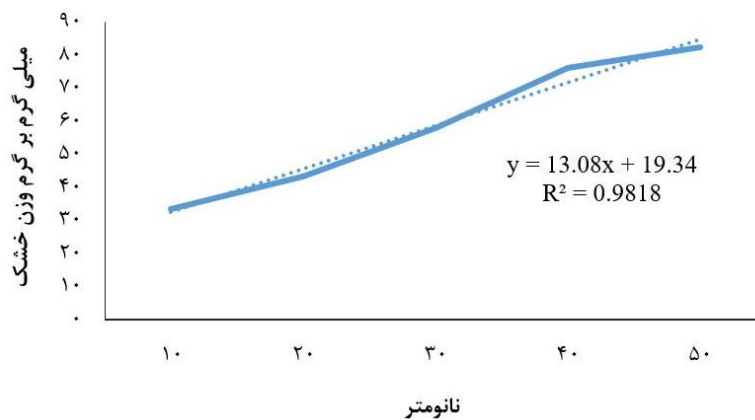
سنجش میزان اسید آمینه پرولین

برای خوانش پرولین ابتدا بافر استخراج سولفوسالیسیلیک ۳ درصد و معرف ناین هیدرین آماده شد. برای خوانش این ترکیب از روش Bates و همکاران (۱۹۳۷) استفاده شد. پس از تهیه بافر، ۰/۲ گرم از برگ در ۱۰ میلی‌لیتر بافر به خوبی حل شد. نمونه‌های به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Eppendorf, آلمان) شدند و از رانشین برای خوانش پرولین استفاده شد. برای آماده کردن محلول واکنش، درون یک فالكون ۱۰ میلی‌لیتری، ۲ میلی‌لیتر معرف ناین هیدرین با ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلایسال ترکیب و ۲ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده در مرحله قبل به آنها اضافه شد. مواد به خوبی با هم ترکیب و سپس به مدت ۱ ساعت در حمام بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت یک ساعت، واکنش با قرار دادن ظروف در حمام سرد متوقف شد. پس از خنک شدن محلول، مقدار ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر فالكون

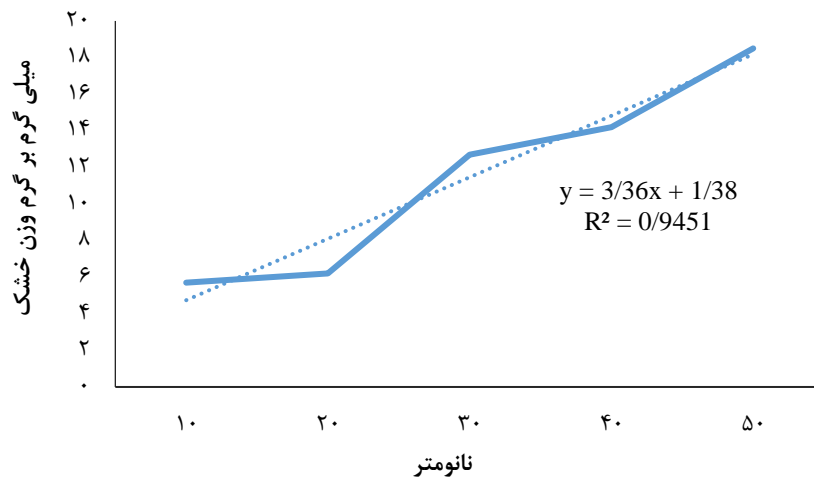
کالیبره و منحنی استاندارد هر عنصر رسم و با استفاده از معادله خط به دست آمده، مقادیر عناصر محاسبه شد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴).



شکل ۲: منحنی استاندارد عنصر کلسیم. در این معادله x مقدار جذب خوانده شده از دستگاه فلیم‌فتمتر و y مقادیر عناصر در بافت گیاه است.



شکل ۳: منحنی استاندارد عنصر پتاسیم. در این معادله x مقدار جذب خوانده شده از دستگاه فلیم‌فتمتر و y مقادیر عناصر در بافت گیاه است.



شکل ۴: منحنی استاندارد عنصر سدیم. در این معادله x مقدار جذب خوانده شده از دستگاه فلیم فتومتر و y مقادیر عناصر در بافت گیاه است.

بررسی میزان کلر موجود در برگ

برای اندازه‌گیری میزان کلر موجود در برگ، از نمونه برگ خشک شده استفاده شد. ۱۰۰ میلی‌گرم از برگ‌های خشک شده پودر و به درون فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شد. به هر نمونه ۱۰ میلی‌لیتر نیتریک اسید ۰/۵ مولار اضافه و به مدت یک ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. از ۱ میلی‌لیتر از روشن‌ترین برای خوانش میزان کلر موجود در برگ استفاده شد. خوانش با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۸۰ نانومتر انجام گرفت (Munns et al., 2010).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS انجام شد و از آزمون LSD در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0/05$) برای مقایسه میانگین‌ها استفاده شد. نمودارها نیز توسط Microsoft Excel 2016 رسم شدند.

نتایج

اثر شوری و اندوفیت بر صفات رشدی گیاه

اختلاف معنی‌داری بین سطوح تیمار شوری و اثر متقابل شوری و اندوفیت بر صفات، تعداد

برگ و انشعاب، طول و عرض ریشه گیاه مکزیکن لایم مشاهده شد (به ترتیب $P < 0/001$ و $P < 0/05$ ؛ جدول ۱). همچنین، اندوفیت اثر معنی داری بر طول ساقه و قطر تنه نشان داد ($P < 0/001$).

نتایج نشان دادند، در نمونه‌های شاهد با افزایش درجات شوری، طول و عرض ریشه، طول ساقه و قطر تنه کاهش یافت. اما در گیاهچه‌های تلقیح شده، افزایش معنی داری در صفات رشدی مورد بررسی در گیاه مشاهده شد. اندوفیت‌ها توانستند به طور معنی داری باعث بهبود صفات رشدی در گیاهچه‌های مکزیکن لایم تلقیح شده شوند. در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، اندوفیت باعث افزایش طول ساقه (۱۰۳/۶۴ درصد)، قطر تنه (۱۰۳/۰۴ درصد)، تعداد برگ و انشعاب (به ترتیب ۴۴۴/۴۱ و ۱۲۴/۸۶ درصد) و طول و عرض ریشه (به ترتیب ۲۳۲/۰۲ و ۴۱/۶۳ درصد) نسبت به نمونه شاهد شد (جدول ۲).

جدول ۱: نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه اثر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 روی صفات رشدی مکزیکن لایم تحت تنش شوری

منابع تغییر	طول ساقه	قطر تنه	تعداد برگ	تعداد انشعاب	طول ریشه	عرض ریشه	نسبت طول به عرض ریشه
شوری	۵۸/۱۵ ^{ns}	۰/۱۷ ^{ns}	۴۴۴/۱۱***	۵/۶۱*	۲۹۰/۴۵***	۲۳۴/۴۱***	۰/۱۷***
اندوفیت	۲۱۰۹/۳۷***	۳۷/۱۲***	۱۴۲۱۰/۶۶***	۱۱۲/۲***	۳۶۰۸/۸۵***	۲۱۹۶/۵***	۰/۰ ^{ns}
شوری × اندوفیت	۴۲/۴۸ ^{ns}	۰/۴۴*	۲۱۰/۷۷*	۲/۵۸*	۵۱۶/۱۴***	۱۰۲/۶۷***	۰/۲۹***
اشتباه	۳۷/۰۴	۰/۱۳	۴۱/۷۵	۱/۳۳	۷/۵۲	۸/۳۷	۰/۰۱
ارزش <i>F</i>	۹/۳	۳۹/۸۶	۵۵/۳۵	۱۸/۹۸	۱۱۴/۴۹	۵۴/۷۳	۱۸/۰۳
ضریب تغییرات	۲۱/۵۷	۸/۰۶	۱۶/۴۲	۲۰/۰۸	۷/۲۵	۸/۶۸	۱۱/۱۹

ns: فاقد معنی داری؛ * : معنی داری در سطح ۹۵ درصد ($P < 0/05$)؛ ***: معنی داری در سطح ۹۹/۹ درصد ($P < 0/001$).

جدول ۲: تاثیر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 روی صفات رشدی مکزیکن لایم تحت تنش شوری (میانگین \pm خطای استاندارد)

تیمارهای شوری (میکروزیمنس بر سانتی‌متر)	قطر تنه (میلی‌متر)	طول ساقه (سانتی‌متر)	تعداد برگ (عدد)	تعداد انشعاب (عدد)	طول ریشه (سانتی‌متر)	عرض ریشه (سانتی‌متر)
شاهد	۳/۵۸ \pm ۰/۰۷ ^d	۲۰/۰۰ \pm ۰/۰۱ ^e	۲۱/۰۰ \pm ۰/۰۰ ^e	۳/۶۶ \pm ۰/۰۶ ^d	۲۹/۵۰ \pm ۰/۰۷ ^d	۲۲/۰۰ \pm ۰/۰۲ ^e
اندوفیت	۵/۸۹ \pm ۰/۰۳ ^b	۴۵/۰۰ \pm ۰/۰۱ ^a	۸۰/۶۶ \pm ۰/۰۶ ^a	۸/۶۶ \pm ۰/۰۷ ^b	۴۲/۶۶ \pm ۰/۰۵ ^{bc}	۵۶/۳ \pm ۰/۰۷ ^a
شاهد	۳/۵۸ \pm ۰/۰۳ ^d	۱۷/۳۳ \pm ۰/۰۰ ^e	۱۳/۰۰ \pm ۰/۰۴ ^f	۲/۶۶ \pm ۰/۰۴ ^f	۲۶/۶۶ \pm ۰/۰۶ ^e	۲۲/۳۳ \pm ۰/۰۶ ^f
اندوفیت	۵/۴۰ \pm ۰/۰۴ ^c	۳۴/۶۶ \pm ۰/۰۱ ^c	۶۲/۶۶ \pm ۰/۰۷ ^{bc}	۶/۰۰ \pm ۰/۰۲ ^c	۳۸/۵۰ \pm ۰/۰۶ ^c	۴۴/۵۰ \pm ۰/۰۵ ^b
شاهد	۳/۴۳ \pm ۰/۰۷ ^{de}	۱۹/۳۳ \pm ۰/۰۵ ^{ef}	۱۴/۰۰ \pm ۰/۰۵ ^f	۳/۰۰ \pm ۰/۰۱ ^e	۲۳/۸۳ \pm ۰/۰۷ ^f	۲۲/۶۶ \pm ۰/۰۷ ^{fg}
اندوفیت	۶/۲۰ \pm ۰/۰۲ ^a	۳۱/۳۴ \pm ۰/۰۷ ^d	۴۶/۰۰ \pm ۰/۰۸ ^d	۱۰/۰۰ \pm ۰/۰۳ ^a	۴۵/۳۳ \pm ۰/۰۴ ^b	۳۹/۸۳ \pm ۰/۰۵ ^c
شاهد	۲/۹۶ \pm ۰/۰۴ ^f	۱۸/۶۶ \pm ۰/۰۲ ^f	۱۲/۰۰ \pm ۰/۰۵ ^f	۳/۶۶ \pm ۰/۰۴ ^d	۲۲/۳۳ \pm ۰/۰۴ ^{fg}	۲۲/۰۰ \pm ۰/۰۲ ^{fg}
اندوفیت	۶/۰۱ \pm ۰/۰۷ ^a	۳۸/۰۰ \pm ۰/۰۱ ^b	۶۵/۳۳ \pm ۰/۰۲ ^b	۸/۲۳ \pm ۰/۰۵ ^b	۷۳/۸۲ \pm ۰/۰۳ ^a	۳۱/۱۶ \pm ۰/۰۷ ^d

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).

فعالیت فتوسیستم II (نسبت Fv/Fm) اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.001$). اثر متقابل شوری و اندوفیت بر کلروفیل کل و نسبت Fv/Fm معنی‌دار بود (به ترتیب $P < 0.001$ و $P < 0.05$). در این پژوهش، افزایش شوری باعث کاهش کلروفیل کل در تمام سطوح شوری شد. نتایج نشان داد، همبستگی منفی بین سطوح شوری و مقادیر کلروفیل وجود دارد. در بیشترین سطح شوری، ترکیب اندوفیتی توانست باعث افزایش ۷۶/۲۹ درصدی کلروفیل کل و ۱۰/۴۴ درصدی Fv/Fm نسبت به نمونه شاهد شود (جدول ۴).

در شکل ۵، گسترش و رشد سیستم ریشه‌ای در گیاهچه‌های تلقیح شده مکزیکن لایم و نمونه شاهد تلقیح نشده با هم مقایسه شده‌اند. همان گونه که در این شکل دیده می‌شود، حتی در شرایط شوری، اندوفیت‌ها توانستند باعث ارتقا و بهبود سیستم ریشه‌ای در گیاهچه‌های مکزیکن لایم شوند.

اثر شوری و اندوفیت بر ظرفیت فتوسنتزی و صفات بیوشیمیایی

با توجه به نتایج آزمون تحلیل واریانس (جدول ۳)، در مقدار کلروفیل کل و حداکثر



شکل ۵: مقایسه اندام هوایی و ریشه‌های گیاهچه‌های مکزیکن لایم تلقیح شده با *Bacillus aquimaris* OD14 (B1) و *Aspergillus niger* (F1) نسبت به نمونه شاهد (N).

جدول ۳: نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه اثر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 روی ظرفیت فتوسنتزی و صفات بیوشیمیایی مکزیکن لایم تحت تنش شوری

منابع تغییر	کلروفیل کل	نسبت Fv/Fm	نشت یونی	پرولین
شوری	۲۲۵/۸۸***	۰/۰۰***	۸۰۳/۳۹***	۱۷۰۲/۷۹***
اندوفیت	۲۱۳۶/۲۷***	۰/۰۱***	۴۵۴۱/۱۳***	۵۰۰۳/۰۵***
شوری × اندوفیت	۴۳/۶۲***	۰/۰۰*	۳۷۴/۰۲***	۵۶/۳***
اشتباه	۰/۸۲	۰/۰۰	۱/۲۴	۱/۱۱
ارزش F	۵۱۰/۲۵	۲۱/۱۴	۹۲۴/۵۵	۱۳۱۵/۷۱
ضریب تغییرات	۱/۶۸	۲/۳۹	۳/۲۸	۲/۰۱

NS: فاقد معنی‌داری؛ * : معنی‌داری در سطح ۹۵ درصد ($P < 0.05$)؛ ***: معنی‌داری در سطح ۹۹/۹ درصد ($P < 0.001$).

جدول ۴: اثر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 روی ظرفیت فتوسنتزی و صفات بیوشیمیایی مکزیکن لایم تحت تنش شوری (میانگین \pm خطای استاندارد)

پرولین (میلی‌گرم بر گرم وزن تر)	نشت یونی (درصد)	Fv/Fm	کلروفیل کل	تیمارهای شوری (میکروزیمنس بر سانتی متر)	
۲۱/۷۶ \pm ۰/۰۶ ^f	۲۰/۹۴۰/۰۵ ^{de}	۰/۷۸۰/۰۵ ^b	۵۳/۹۳۰/۰۴ ^c	شاهد	۰
۴۴/۶۷ \pm ۰/۰۴ ^d	۱۴/۶۴۰/۰۲ ^f	۰/۸۰۰/۰۳ ^a	۶۶/۶۶۰/۰۰ ^a	اندوفیت	
۳۲/۶۴ \pm ۰/۰۶ ^e	۴۸/۴۵ \pm ۰/۰۲ ^c	۰/۷۴۰/۰۶ ^c	۴۸/۵۰۰/۰۴ ^d	شاهد	۲۰۰۰
۵۹/۳۶ \pm ۰/۰۲ ^c	۲۱/۶۳ \pm ۰/۰۴ ^{de}	۰/۷۹۰/۰۳ ^b	۶۵/۸۳۰/۰۲ ^a	اندوفیت	
۴۳/۸۴ \pm ۰/۰۳ ^d	۵۴/۶۴۰/۰۶ ^b	۰/۷۰۰/۰۵ ^d	۴۱/۴۱۰/۰۴ ^e	شاهد	۴۰۰۰
۷۲/۳۰۰/۰۱ ^b	۲۱/۶۴۰/۰۵ ^{de}	۰/۷۹۰/۰۴ ^b	۶۱/۱۳۰/۰۲ ^b	اندوفیت	
۵۳/۹۵۰/۰۶ ^c	۶۶/۹۵۰/۰۲ ^a	۰/۶۷ \pm ۰/۰۲ ^e	۳۳/۶۷۰ \pm ۰/۰۵ ^f	شاهد	۶۰۰۰
۹۱/۳۴۰ \pm ۰/۰۱ ^a	۲۳/۰۵۰ \pm ۰/۰۲ ^d	۰/۷۴۰/۰۳ ^c	۵۹/۳۶۰/۰۴ ^b	اندوفیت	

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0/05$).

باعث افزایش ۶۹/۳ درصدی میزان پرولین نسبت به شاهد شد (جدول ۴).

اثر اندوفیت و شوری بر جذب عناصر

با توجه به نتایج آزمون تحلیل واریانس (جدول ۵)، اثر اندوفیت بر میزان جذب عناصر معنی‌داری بود ($P < 0/001$). اثر متقابل شوری و اندوفیت بر جذب عناصر معنی‌دار بود ($P < 0/001$ ؛ جدول ۵). در مواجهه با تنش شوری، در بافت‌های شاخساره و ریشه گیاهچه‌های مکزیکن لایم، مقادیر عناصر سدیم و کلر افزایش و مقدار عنصر پتاسیم کاهش یافت. اما میزان

نتایج آزمون تحلیل واریانس مقدار نشت یونی برگ نشان داد اندوفیت و سطوح مختلف شوری اثر معنی‌داری داشت ($P < 0/001$ ؛ جدول ۳). در نمونه‌های شاهد و تیمار شده با افزایش سطح شوری، میزان نشت الکترولیت‌های برگ افزایش یافت (جدول ۴).

اندوفیت‌ها به طور معنی‌داری سطح اسید آمینه پرولین را در گیاهچه‌های تلقیح شده افزایش دادند ($P < 0/001$). در تمام سطوح شوری، اندوفیت باعث افزایش اسید آمینه پرولین نسبت به نمونه شاهد شد. در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، اندوفیت

افزایش و کاهش عناصر در نمونه‌های شاهد، شدیدتر از نمونه‌های تلقیح شده بود. در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، اندوفیت توانسته بود باعث کاهش ۳۷/۹۷ درصدی میزان کلر موجود در گیاهچه‌ها نسبت به نمونه شاهد شود. همچنین، اندوفیت توانست میزان سدیم ریشه و شاخساره را به ترتیب ۷/۴۸ و ۲۹/۴۹ درصد کاهش دهد. در این سطح شوری، در نمونه‌های تلقیح شده نسبت به شاهد، کلسیم ریشه و شاخساره و پتاسیم ریشه به ترتیب به میزان ۱۸/۱۸، ۱۵/۱۵ و ۳۴/۹۵ درصد افزایش یافت. اما پتاسیم ساقه به میزان ۰/۶ درصد نسبت به شاهد کاهش داشت (جدول ۶).

بحث

تنش شوری بر فعالیت‌های متابولیکی گیاه از جمله تقسیم سلولی تأثیرگذار است و باعث کاهش تقسیم سلول‌های جدید می‌شود. کاهش تقسیم سلولی می‌تواند در اثر جذب عناصر سمی مانند سدیم نیز اتفاق افتد که باعث ضخیم شدن دیواره سلولی، کاهش تقسیم سلولی و کاهش رشد شاخساره و ریشه می‌شود. در مطالعه حاضر تلقیح ترکیب اندوفیتی باکتریایی و قارچی، باعث افزایش تحمل گیاهچه‌ها نسبت به شوری و کاهش معنی‌دار اثرات سوء ناشی از تنش نسبت به نمونه‌های شاهد شد.

جدول ۵: نتایج آزمون تحلیل واریانس دوطرفه اثر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 روی جذب عناصر مکزیکن لایم تحت تنش شوری

منابع تغییر	کلر	سدیم ریشه	سدیم ساقه	پتاسیم ریشه	پتاسیم ساقه	کلسیم ریشه	کلسیم ساقه	نسبت سدیم به پتاسیم
شوری	۰/۰۳***	۱۴/۲۸***	۱۵/۸۶***	۱۷۹/۹۶***	۲۰۱/۳۵***	۰/۰۲***	۰/۰۷***	۰/۰۳***
اندوفیت	-۰/۰۲***	۳/۳۸***	۲۷/۶۴***	۲۵۳/۳۳***	۲۶/۰۲***	۰/۰۴***	۰/۱۳***	۰/۰۲***
شوری*اندوفیت	-۰/۰۰***	۱/۰۷***	۲/۴۳***	۲۷/۲۲***	۶۹/۷۹***	۰/۰۰***	۰/۰۳***	۰/۰۰***
اشتباه	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۲	۰/۴۵	۰/۳۶	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
ارزش F	۱۱۹۵/۶۱	۱۶۸۸/۱۶	۹۲/۷۳	۲۷۵/۴۶	۳۲۴/۴۹	۱۷۰/۵۲	۱۴/۹۵	۱۸۸/۸۱
ضریب تغییرات	۱/۸۹	۱/۴	۹/۳۹	۲/۵۶	۱/۷۵	۱/۸۳	۹/۶۶	۸/۱۳

NS: فاقد معنی‌داری؛ * : معنی‌داری در سطح ۹۹ درصد ($P < 0.01$)؛ ***: معنی‌داری در سطح ۹۹/۹ درصد ($P < 0.001$).

جدول ۶: اثر تلقیح اندوفیت قارچی *Aspergillus niger* و باکتریایی *Bacillus aquimaris* OD14 روی جذب عناصر مکزیکن لایم تحت تنش شوری (میانگین \pm خطای استاندارد)

تیمارهای شوری (میکروزیمنس بر سانتی متر)	کلر (mg/g DW)	سدیم (mg/g DW)		پتاسیم (mg/g DW)		کلسیم (mg/g DW)		Na/K (درصد)
		ساقه	ریشه	ساقه	ریشه	ساقه	ریشه	
شاهد	۰/۱۶۷ \pm ۰/۰۶ ^f	۲/۱۲ \pm ۰/۰۵ ^{cde}	۲۶/۲۲ \pm ۰/۰۷ ^c	۳۳/۳۴ \pm ۰/۰۳ ^d	۰/۴۵ \pm ۰/۰۶ ^{bc}	۰/۷۱ \pm ۰/۰۳ ^c	۰/۰۶۳ \pm ۰/۰۲ ^d	۰
اندوفیت	۰/۱۳۲ \pm ۰/۰۲ ^g	۲/۸۹ \pm ۰/۰۴ ^e	۱/۶۷ \pm ۰/۰۱ ^{de}	۳۸/۶۴ \pm ۰/۰۵ ^a	۴۳/۴۴ \pm ۰/۰۷ ^a	۰/۷۰ \pm ۰/۰۵ ^a	۰/۰۳۸ \pm ۰/۰۵ ^e	
شاهد	۰/۱۸۰ \pm ۰/۰۷ ^e	۴/۸۸ \pm ۰/۰۴ ^c	۴/۶۷ \pm ۰/۰۵ ^c	۲۵/۲۰ \pm ۰/۰۳ ^{cd}	۳۶/۲۳ \pm ۰/۰۲ ^{cd}	۰/۵۲ \pm ۰/۰۴ ^c	۰/۱۲۸ \pm ۰/۰۴ ^e	۲۰۰۰
اندوفیت	۰/۱۶۰ \pm ۰/۰۲ ^f	۳/۱۶۷ \pm ۰/۰۳ ^d	۱/۹۴ \pm ۰/۰۵ ^e	۳۰/۶۲ \pm ۰/۰۲ ^b	۴۰/۶۰ \pm ۰/۰۵ ^b	۰/۵۸ \pm ۰/۰۲ ^b	۰/۰۴۷ \pm ۰/۰۲ ^{de}	
شاهد	۰/۲۷۶ \pm ۰/۰۷ ^b	۵/۸۰ \pm ۰/۰۵ ^b	۵/۹۰ \pm ۰/۰۴ ^b	۲۴/۲۲ \pm ۰/۰۵ ^{cd}	۳۸/۲۲ \pm ۰/۰۴ ^c	۰/۵۰ \pm ۰/۰۴ ^c	۰/۱۵۴ \pm ۰/۰۳ ^{bc}	۴۰۰۰
اندوفیت	۰/۲۱۶ \pm ۰/۰۵ ^d	۴/۱۸ \pm ۰/۰۲ ^{cd}	۲/۴۸ \pm ۰/۰۵ ^d	۲۶/۴۶ \pm ۰/۰۳ ^c	۳۲/۲۳ \pm ۰/۰۷ ^d	۰/۵۶ \pm ۰/۰۳ ^b	۰/۰۷۶ \pm ۰/۰۲ ^d	
شاهد	۰/۳۹۵ \pm ۰/۰۴ ^a	۶/۶۸ \pm ۰/۰۲ ^a	۶/۷۸ \pm ۰/۰۷ ^a	۱۶/۴۲ \pm ۰/۰۳ ^e	۲۶/۲۳ \pm ۰/۰۴ ^e	۰/۴۴ \pm ۰/۰۱ ^d	۰/۲۶۰ \pm ۰/۰۷ ^a	۶۰۰۰
اندوفیت	۰/۲۴۵ \pm ۰/۰۳ ^c	۶/۱۸ \pm ۰/۰۶ ^{ab}	۴/۷۸ \pm ۰/۰۳ ^c	۲۲/۱۶ \pm ۰/۰۲ ^d	۲۶/۰۷ \pm ۰/۰۲ ^e	۰/۵۲ \pm ۰/۰۰ ^{bc}	۰/۱۸۳ \pm ۰/۰۴ ^b	

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($P < 0.05$).
 DW: وزن خشک؛ Na/K: نسبت سدیم به پتاسیم در شاخساره.

سبب کاهش مقدار فتوسنتز خواهد شد. کاهش فتوسنتز باعث کاهش رشد گیاه می‌شود. حداکثر ظرفیت فتوسنتزی یا همان نسبت Fv/Fm، عبارت است از حداکثر کارایی فیتوشیمیایی فتوسیستم II که در سنجش‌های صفات رشدی گیاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (Rivero et al., 2009). نسبت Fv/Fm در گیاه معمولا برای نشان دادن تاثیر تنش مورد بررسی قرار می‌گیرد. در شرایط طبیعی نسبت Fv/Fm در بیشتر گیاهان حدود ۰/۸ است. کاهش این نسبت اغلب به دلیل آسیب به فتوسیستم II رخ

با افزایش تعداد برگ و عرض ریشه در گیاه، تحمل گیاه از طریق بالا رفتن توان جذب مواد غذایی از خاک و همچنین افزایش ظرفیت فتوسنتزی در آن، افزایش خواهد یافت. اندوفیت‌ها توانستند باعث افزایش تعداد برگ و گسترش سیستم ریشه‌ای در گیاهچه‌های تحت شرایط شوری و غیرشوری نسبت به نمونه‌های شاهد شوند. شوری بر انتقال الکترون‌های فتوسنتزی تاثیر می‌گذارد و از فعالیت حداکثری فتوسیستم II جلوگیری می‌کند. کاهش مقدار کلروفیل

2006). در این مطالعه ترکیب اندوفیتی باعث کاهش ۶۵/۵۷ درصدی کاهش نشت یونی نسبت به نمونه شاهد شد.

از دلایلی که باعث کاهش جذب آب توسط گیاه تحت شرایط تنش شوری می‌شود، می‌توان به تجمع و افزایش یون‌های سدیم و کلر در گیاه در اثر افزایش شوری آب یا خاک و تاثیر آنها بر فرآیند تولید سلول‌های گیاهی اشاره کرد. تجمع این یون‌ها باعث سخت و ضخیم شدن دیواره سلولی و عدم تورژسانس و رشد سول‌ها می‌شود (Fricke and Peters, 2002). اندوفیت‌ها می‌توانند مقاومت گیاه را نسبت به جذب آب از محیط شور کاهش دهند. به دنبال جذب بهتر آب در گیاه، جذب عناصر غذایی نیز بهبود می‌یابد (Auge et al., 2001).

افزایش جذب یون‌های مضرى چون سدیم در اثر افزایش تنش شوری، باعث کاهش جذب عناصر ضروری در ساخت کلروفیل مانند منیزیم، فسفر و آهن می‌شود (Auge et al., 2001). از آنجایی که مکانیسم جذب عناصر کلسیم و پتاسیم شبیه به هم است، در صورت تجمع عنصر سدیم در محدوده ریشه گیاه، گیاه تمایل به جذب آن دارد و در این صورت پتاسیم کمتری را جذب می‌کند. یکی از عواملی که برای سنجش میزان تحمل گیاه نسبت به شوری در

می‌دهد. تنش شوری مراکز واکنش فعال را کاهش می‌دهد و از این طریق کارایی فتوسنتز کاهش پیدا می‌کند. مقدار بالای ۰/۷ در نسبت Fv/Fm، نشان بر سلامت گیاه و عدم وجود استرس فتوسنتزی است (Bu et al., 2012). این نسبت با وجود تنش کاهش می‌یابد که نشان دهنده کاهش حداکثر فعالیت فتوسیستم II است. این تغییرات کاهش می‌مکن است تحت تاثیر تغییرات مرکزی در فتوسیستم II باشد (Toth et al., 2005). در مطالعه حاضر، اندوفیت‌ها توانسته بودند به طور معنی‌داری باعث افزایش این نسبت در گیاهان تلقیح شده شوند.

در اعمال تنش شوری، اسید آمینه پرولین باعث کاهش نشت الکترولیت‌ها در گیاه تحت تنش می‌شود. پرولین از طریق افزایش پایداری غشای سلولی و کاهش جذب نمک باعث کم شدن نشت الکترولیت‌ها می‌شود؛ چرا که پرولین، باعث افزایش فعالیت آنزیم‌هایی چون کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه می‌شود. افزایش فعالیت این آنزیم‌ها باعث کاهش رادیکال‌های آزاد شده تحت شرایط تنش می‌شود، در نتیجه پایداری و استقامت غشا را افزایش می‌دهد و باعث کاهش نفوذپذیری سلول‌های برگی می‌شوند (Kaya et al.,

میزان سدیم بیشتر و بر عکس در شاخساره آنها سدیم کمتری انباشته می‌شود. هر چه نسبت سدیم به پتاسیم شاخساره کمتر باشد، گیاه در برابر تنش متحمل تر شده است. با افزایش تنش شوری، این نسبت افزایش یافت، اما میزان آن در نمونه‌های تلقیح شده نسبت به شاهد کمتر بود. در مطالعه انجام شده توسط Aboutalebi و Hassanzadeh (۲۰۱۶)، سدیم موجود در شاخساره گیاهچه‌های مکزیکن لایم تحت شرایط شوری و تیمار هیومیک اسید مورد بررسی قرار گرفت. آنها بیان کردند در شوری ۴۵۰۰ میلی‌موس بر سانتی‌متر و اعمال ۴۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم هیومیک اسید، مقدار سدیم شاخساره در این غلظت شوری بین ۱/۶۴-۱/۵۴ درصد بوده است (Aboutalebi and Hassanzadeh 2016) که این نتایج شباهت نزدیکی با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر داشت.

یکی از دلایل رشد بهتر گیاهچه‌ها و دوام بیشتر برگ‌ها تحت شرایط تنش شوری، وجود کلر کمتر در بافت برگ‌ها است. در این مطالعه ترکیب اندوفیتی توانست میزان کلر شاخساره را تا ۳۷/۹۷ درصد نسبت به نمونه شاهد کاهش دهد. بیشترین کلر موجود در برگ متعلق به نمونه شاهد در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر

نظر گرفته می‌شود، نسبت سدیم به پتاسیم شاخساره است. گیاهان متحمل، قادر به جذب پتاسیم بیشتری نسبت به سدیم هستند و تجمع و انباشت سدیم در اندام‌های هوایی آنها کمتر از گیاهان حساس به شوری است (Garcia-Sanchez et al., 2002; Garcia-Legaz et al., 2008). یون پتاسیم باعث پایداری pH پتانسیل اسمزی و فشار تورژسانسی در بین سلول‌های گیاهی می‌شود. همچنین پتاسیم نقش اساسی در فعال کردن آنزیم‌های دخیل در متابولیسم و تولید پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها بازی می‌کنند (Page and Di Cera, 2006). علاوه بر این، یون پتاسیم به تنظیم اسمزی سلول‌های گیاهان تحت تنش کمک می‌کند. کاهش جذب سدیم باعث افزایش جذب پتاسیم می‌شود. این امر یک مکانیسم دفاعی گیاهان در برابر تنش شوری است. گیاهان متحمل‌تر، پتاسیم بیشتر و سدیم کمتر در بافت‌های هوایی خود انباشته می‌کنند. این گیاهان متحمل با انباشته کردن سدیم در ریشه خود، از انتقال آنها به اندام‌های هوایی جلوگیری می‌کنند. یکی از شاخص‌های تشخیص گیاهان متحمل به شوری نسبت به گیاهان حساس، بررسی میزان نسبت سدیم به پتاسیم ریشه است. در گیاهان متحمل، در شرایط تنش شوری، در بافت ریشه آنها،

در بین اندام‌های شاخساره و ریشه تقریباً به یک اندازه بودند. به طور مثال در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر مقدار یون سدیم موجود در شاخساره و ریشه نمونه شاهد به ترتیب ۶/۶۸ و ۶/۷۸ میلی‌گرم در گرم وزن خشک بود. این در حالی است که، نمونه‌های تلقیح شده دارای مقدار کمتری سدیم در بافت ریشه نسبت به شاخساره بودند (۶/۱۸ و ۴/۷۸ میلی‌گرم در گرم وزن خشک به ترتیب در ریشه و شاخساره). تجمع سدیم در ریشه و عدم تحرک آن به اندام‌های هوایی گیاه یکی از نشانه‌های متحمل شدن گیاهچه‌ها است. یکی از دلایل مهم تحمل تنش شوری، تقویت سیستم ریشه‌ای و گسترش ریشه‌های مویین است. ثابت شده است در گونه‌های مقاوم، یون‌های سدیم به عنوان یون‌های سمی، به واکوئل برگ‌ها منتقل و انباشته می‌شوند (Ashraf and McNeilly, 2004). با این حال، اگر یون‌های سدیم در واکوئل‌های سلولی به دام بیفتند، حل‌شونده‌های طبیعی باید درون سیتوپلاسم انباشه شوند تا فشار اسمزی درون واکوئل‌ها به تعادل برسد. از جمله ترکیباتی که در این امر دخیل هستند و در سیتوپلاسم تجمع پیدا می‌کنند، می‌توان به پرولین اشاره کرد (Munns and Tester, 2008). با افزایش شوری، میزان تولید پرولین

سانتی‌متر بود (۰/۳۹۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک)، این در حالی بود که میانگین تعداد برگ در گیاهچه‌های شاهد در انتهای اعمال تنش شوری، به ۱۰ برگ رسید.

به نظر می‌رسد وجود کلسیم در آب آبیاری می‌تواند رشد مرکبات را در شرایط تنش شوری بهبود ببخشد (Zekri and Parsons, 1990). کلسیم، جذب، انتقال و تجمع سدیم در برگ‌ها را کاهش می‌دهد و باعث افزایش غلظت پتاسیم در بافت‌های ریشه و شاخساره می‌شود (Hepaksoy, 2000). در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، بیشترین و کمترین مقدار کلسیم ساقه به ترتیب مربوط به نمونه‌های تلقیح شده و شاهد بود. گیاهچه‌های تلقیح شده دارای کلر کم در بافت برگ، سدیم کم در بافت ریشه و شاخساره، پتاسیم کم در شاخساره و کلسیم بالا در بافت شاخساره بودند.

در مطالعه حاضر مشاهده شد تحت شرایط شوری، یون سدیم ریشه، با افزایش مقدار شوری، افزایش یافت. بیشترین مقدار سدیم ریشه و شاخساره در شوری ۶۰۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر، در نمونه‌های شاهد مشاهده شد. در نمونه‌های شاهد بین سدیم ریشه و شاخساره تعادل برقرار بود، به صورتی که مقادیر اندازه گیری شده یون سدیم در سطوح مختلف شوری

به دست آمده از این مطالعات نشان دادند میکروارگانسیم‌های اعمال شده توانسته بودند باعث بهبود صفات فیزیوژنیک در گیاه میزبان شوند و محتوی نسبی آب برگ و ظرفیت آنتی اکسیدانی گیاه را افزایش دهند که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر شباهت نزدیکی دارد.

در مجموع، این مطالعه نشان داد مکزیکن لایم گیاهی حساس به تنش شوری است، اما تلقیح گیاهچه‌ها با اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی توانست نتایج خوبی را فراهم کند. افزایش شوری باعث کاهش رشد در گیاهچه‌های شاهد شد. همچنین ترکیب اندوفیتی باعث ارتقا صفات رشدی نسبت به نمونه شاهد شد. طبق منابع موجود، اندوفیت قارچی *A. niger* و باکتری‌های جنس *Bacillus* از مهم‌ترین و اصلی‌ترین جنس‌های استخراج شده از اکوسیستم‌های دریایی و ماکرو جلبک‌ها هستند. بیشتر متابولیت‌های به دست آمده از اندوفیت‌های قارچی دریایی نیز از گونه *A. niger* است. این قارچ دارای تحمل بالایی نسبت به وجود غلظت‌های مختلف نمک کلرید سدیم در محیط کشت است. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر، اندوفیت‌های قارچی و باکتریایی این قابلیت را دارند که به عنوان گزینه‌ای مناسب برای افزایش تحمل گیاهان نسبت به تنش‌های

در گیاهچه‌ها چه در نمونه‌های شاهد و چه در نمونه‌های تلقیح شده، افزایش پیدا کرد، با این وجود مقدار پرولین تولید شده در نمونه‌های تلقیح شده به طور معنی‌داری از نمونه‌های شاهد بیشتر بود. اندوفیت توانسته بود باعث افزایش ۶۹/۳ درصدی میزان پرولین در گیاهچه‌های مکزیکن لایم شود. پرولین اسمولیتی خنثی است که از ساختارهای سلولی محافظت می‌کند و باعث پایداری آنزیم‌ها می‌شود (Kishor et al., 2005). همچنین پرولین در بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی از جمله پایداری ساختارهای سلولی، جاروبرگری رادیکال‌های آزاد و نقش بافری درون سلول تحت شرایط تنش شرکت دارد (Shahid et al., 2011).

در مطالعات پیشین از باکتری *Bacillus* و قارچ *Aspergillus niger* برای اهدافی چون افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش شوری، افزایش رشد گیاه، افزایش محصول، افزایش میزان جذب نیتروژن، به عنوان بیوکنترل و بیوکود مورد استفاده قرار گرفته است (Mukherjee and Sen, 1998; Qiao et al., 2014; Radhakrishnan et al., 2017; Jin et al., 2019; Victor et al., 2019; Sun et al., 2020; Hindersah et al., 2021).

محیطی از جمله شوری و خشکی مطرح شوند. این موضوع می‌تواند به عنوان یک روش مناسب در جهت ایجاد کشاورزی پایدار و دوست‌دار محیط زیست در کاهش اثرات منفی کودهای شیمیایی مطرح شود. در بین منابع موجود، منبعی در مورد کاربرد اندوفیت‌های همزیست با جلبک‌های دریایی برای تلقیح به گیاهان خشکی یافت نشد و می‌توان گفت این پژوهش اولین مورد استفاده از آنها برای تلقیح گیاهان خشکی زی بوده است. با نتایجی که از این پژوهش به دست آمده است می‌توان از این اندوفیت‌ها برای

تلقیح دیگر گیاهان برای مقابله با تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاهان استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا جا دارد از دانشگاه هرمزگان و آزمایشگاه و اداره محیط زیست استان هرمزگان تقدیر و تشکر نماییم. همچنین از خانم مهندس رام، آقای دکتر ربیعی و آقای مهندس خسروی که در نمونه‌برداری و پیشبرد پروژه همکاری صمیمانه داشتند، کمال تشکر را داریم.

منابع

- Aboutalebi A. and Hassanzadeh H. 2016.** Effect of humic acid on some vegetative traits and ion concentrations of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) seedlings under salt stress. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 3(2): 255–264.
- Ali A., Shahzad R., Khan A.L., Halo B.A., Al-Yahyai R., Al-Harrasi A., Al-Rawahi A. and Lee I.J. 2017.** Endophytic bacterial diversity of *Avicennia marina* helps to confer resistance against salinity stress in *Solanum lycopersicum*. *Journal of Plant Interactions*, 12(1): 312–322.
- Al-Yassin A. 2005.** Adverse effects of salinity on *Citrus*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 7(4): 668–680.
- Arnold A.E. and Lutzoni F. 2007.** Diversity and host range of foliar fungal endophytes: Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3): 541–549.
- Ashraf M. and McNeilly T. 2004.** Salinity tolerance in *Brassica oilseeds*. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2): 157–174.
- Auge R.M., Stodola A.J., Tims J.E. and Saxton A.M. 2001.** Moisture retention properties of a mycorrhizal soil. *Plant and Soil*, 230(1): 87–97.
- Bandari Z., Mozamian E. and Azarpira N. 2016.** Investigating the cytotoxic effects of Persian Gulf marine *Actinomycetes* protease on blood cancer cell line. *Basic and Clinical Cancer Research*, 8(4): 3–14.
- Bates L.S., Waldren R.P. and Teare I.D. 1973.** Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39(1): 205–207.
- Bhadury P., Mohammad B.T. and Wright P.C. 2006.** The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(5): 325–337.
- Bhattacharyya P.N.J. 2012.** Plantgrowth-promotingrhizobacteria (PGPR): Emergencein agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28: 1327–1350.
- Bibi F., Yasir M., Song G.C., Lee S.Y. and Chung Y.R. 2012.** Diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on oomycetous plant pathogens. *Plant Pathology Journal*, 28(1): 20–31.
- Bu N., Li X., Li Y., Ma C., Ma L. and Zhang C. 2012.** Effects of Na₂CO₃ stress on photosynthesis and

- antioxidative enzymes in endophyte infected and non-infected rice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78: 35–40.
- Chapman H.D. and Pratt P.P. 1961.** *Methods of Analysis for Soils, Plants and Waters.* University of California Publications, USA. 309P.
- Choudhary D.K., Kasotia A., Jain S., Vaishnav A., Kumari S., Sharma K.P. and Varma A. 2016.** Bacterial-mediated tolerance and resistance to plants under abiotic and biotic stresses. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(1): 276–300.
- Dhindsa R.S., Plumb-Dhindsa P.A.M.E.L.A. and Thorpe T.A. 1981.** Leaf senescence: Correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1): 93–101.
- Dodd I.C. and Perez-Alfocea F. 2012.** Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany*, 63(9): 3415–3428.
- Fricke W. and Peters W.S. 2002.** The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology*, 129(1): 374–388.
- Garcia-Legaz M.F., Lopez-Gomez E., Beneyto J.M., Navarro A. and Sanchez-Blanco M.J. 2008.** Physiological behavior of loquat and anger rootstocks in relation to salinity and calcium addition. *Journal of Plant physiology*, 165(10): 1049–1060.
- Garcia-Sanchez F., Jifon J.L., Carvajal M. and Syvertsen J.P. 2002.** Gas exchange, chlorophyll and nutrient contents in relation to Na⁺ and Cl⁻ accumulation in ‘Sunburst’ mandarin grafted on different rootstocks. *Plant Science*, 162(5): 705–712.
- Gimeno V., Syvertsen J.P., Nieves M., Simon I., Martinez V. and Garcia-Sanchez F. 2009.** Additional nitrogen fertilization affects salt tolerance of lemon trees on different rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 121(3): 298–305.
- Hamilton C.E. and Bauerle T.L. 2012.** A new currency for mutualism? Fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. *Fungal Diversity*, 54(1): 39–49.
- Hardoim P.R., Van Overbeek L.S., Berg G., Pirttila A.M., Compant S., Campisano A., Doring M. and Sessitsch A. 2015.** The hidden world within plants: Ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(3): 293–320.

- Hepaksoy S. 2000.** Effect of salinity on *Citrus*. *Anadolu Journal of Aegean Agricultural Research Institute*, 10(1): 52–72.
- Hindersah R., Rahmadina I., Harryanto R., Suryatmana P. and Arifin M. 2021.** *Bacillus* and *Azotobacter* counts in solid biofertilizer with different concentration of zeolite and liquid inoculant. The 2nd International Conference on Agriculture and Bio-industry. IOP Conference Series, Indonesia: Earth and Environmental Science, 667: 1–6.
- Jin N., Liu S.M., Peng H., Huang W.K., Kong L.A., Wu Y.H., Chen Y.P., Ge F.Y., Heng Jian H. and De-Liang Peng D.L. 2019.** Isolation and characterization of *Aspergillus niger* NBC001 underlying suppression against *Heterodera glycines*. *Scientific Reports*, 9: 1–13 (591).
- Kalyani P. and Hemalatha K.P.J. 2016.** Review paper-marine microbial bioactive compounds. *International Journal of Engineering Sciences and Research Technology*, 5(11): 124–133.
- Kaya M.D., Okçu G., Atak M., Cikili Y., Kolsarici O. 2006.** Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European journal of Agronomy*, 24(4): 291–295.
- Kishor P.K., Sangam S., Amrutha R.N., Laxmi P.S., Naidu K.R., Rao K.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P. and Sreenivasulu N. 2005.** Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88(3): 424–438.
- Ling Q., Huang W. and Jarvis P. 2011.** Use of a SPAD-502 meter to measure leaf chlorophyll concentration in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, 107(2): 209–214.
- Mahmoudi M. and Zoghalchali H.B. 2015.** The effects of humic substances on some physiological properties of *Citrus sinensis* cv. Thomson navel under lime condition. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences*, 9(1): 132–135.
- Meggio F., Prinsi B., Negri A.S., Simone Di Lorenzo G., Lucchini G., Pitacco A., Failla O., Scienza A., Cocucci M. and Espen L. 2014.** Biochemical and physiological responses of two grapevine rootstock genotypes to drought and salt treatments. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20(2): 310–323.
- Mei C., Lara-Chavez A., Lowman S. and Flinn B. 2014.** The use of endophytes and mycorrhizae in switch grass biomass production. P: 67–108. In: Luo H. and Wu Y.

- (Eds.). Compendium of Bioenergy Plants. CRC Press, USA.
- Mishra S., Singh A., Keswani C., Saxena A., Sarma B.K. and Singh H.B. 2015.** Harnessing plant-microbe interactions for enhanced protection against phytopathogens. P: 111–125. In: Arora N.K. (Ed.). Plant Microbes Symbiosis: Applied Facets. Springer, India.
- Moya J.L., Primo-Millo E. and Talon M. 1999.** Morphological factors determining salt tolerance in *Citrus* seedlings: The shoot to root ratio modulates passive root uptake of chloride ions and their accumulation in leaves. *Plant, Cell and Environment*, 22(11): 1425–1433.
- Mukherjee K. and Sen B. 1998.** Biological control of fusarium wilt of muskmelon by formulations of *Aspergillus niger*. *Israel Journal of Plant Sciences*, 46(1): 67–72.
- Munns R. and Tester M. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology*, 59: 651–681.
- Munns R., Wallace P.A., Teakle N.L. and Colmer T.D. 2010.** Measuring soluble ion concentrations (Na^+ , K^+ , Cl^-) in salt-treated plants. P: 371–382. In: Sunkar R. (Ed.). Plant Stress Tolerance. Humana Press, USA.
- Nenkep V.N., Yun K., Li Y., Choi H.D., Kang J.S. and Son B.W. 2010.** New production of haloquinones, bromochlorogentisylquinones A and B, by a halide salt from a marine isolate of the fungus *Phoma herbarum*. *The Journal of Antibiotics*, 63(4): 199–201.
- Newman D.J. and Hill R.T. 2006.** New drugs from marine microbes: The tide is turning. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7): 539–544.
- Nishihara E., Kondo K., Parvez M.M., Takahashi K., Watanabe K. and Tanaka K. 2003.** Role of 5-aminolevulinic acid (ALA) on active oxygen-scavenging system in NaCl-treated spinach (*Spinacia oleracea*). *Journal of Plant Physiology*, 160(9): 1085–1091.
- Page M.J. and Di Cera E. 2006.** Role of Na^+ and K^+ in enzyme function. *Physiological Reviews*, 86(4): 1049–1092.
- Pal S., Singh H.B., Farooqui A. and Rakshit A. 2015.** Fungal biofertilizers in Indian agriculture: Perception, demand and promotion. *Journal of Eco-Friendly Agriculture*, 10(2): 101–113.
- Qiao J.Q., Wu H.J., Huo R., Gao X.W. and Borriss R. 2014.** Stimulation of plant growth and biocontrol by *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42 engineered for improved action. *Chemical and*

- Biological Technologies in Agriculture, 1: 1–14 (12).
- Radhakrishnan R., Hashem A. and Abd Allah E.F. 2017.** *Bacillus*: A biological tool for crop improvement through bio-molecular changes in adverse environments. *Frontiers in Physiology*, 8: 1–14 (667).
- Redman R.S., Kim Y.O., Woodward C.J., Greer C., Espino L., Doty S.L. and Rodriguez R.J. 2011.** Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: A strategy for mitigating impacts of climate change. *PLOS One*, 6(7): 1–10 (e14823).
- Rivero R.M., Shulaev V. and Blumwald E. 2009.** Cytokinin-dependent photorespiration and the protection of photosynthesis during water deficit. *Plant Physiology*, 150(3): 1530–1540.
- Saravanakumar D. and Samiyappan R. 2007.** ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5): 1283–1292.
- Shahid M.A., Pervez M.A., Balal R.M., Mattson N.S., Rashid A., Ahma R., Ayyub C.M. and Abbas T. 2011.** Brassinosteroid (24-epibrassinolide) enhances growth and alleviates the deleterious effects induced by salt stress in pea (*Pisum sativum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 5(5): 500–510.
- Sun B., Gu L., Bao L., Zhang S., Wei Y., Bai Z., Zhuang G. and Zhuang X. 2020.** Application of biofertilizer containing *Bacillus subtilis* reduced the nitrogen loss in agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 148: 1–47 (107911).
- Toth S.Z., Schansker G., Kissimon J., Kovacs L. and Strasser R.J. 2005.** Biophysical studies of photosystem II-related recovery processes after a heat pulse in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, 162(2): 181–194.
- Vaishnav A., Varma A., Tuteja N. and Choudhary D.K. 2017.** Characterization of bacterial volatiles and their impact on plant health under abiotic stress. P: 15–24. In: Choudhary D., Sharma A., Agarwal P., Varma A. and Tuteja N. (Eds.). *Volatiles and Food Security*. Springer, Singapore.
- Victor K., Okoth S., De Boevre M. and De Saeger S. 2019.** Biocontrol of *Aspergillus* and *Fusarium* mycotoxins in Africa. *Benefits and Limitations of Toxins*, 11(2): 1–9 (109).
- Waqas M., Khan A.L., Hamayun M., Shahzad R., Kang S.M., Kim J.G. and Lee I.J. 2015.** Endophytic fungi promote plant

- growth and mitigate the adverse effects of stem rot: An example of *Penicillium citrinum* and *Aspergillus terreus*. *Journal of Plant Interactions*, 10(1): 280–287.
- Whitlow T.H., Bassuk N.L., Ranney T.G. and Reichert D.L. 1992.** An improved method for using electrolyte leakage to assess membrane competence in plant tissues. *Plant Physiology*, 98(1): 198–205.
- Yokoi S., Bressan R.A. and Hasegawa P.M. 2002.** Salt stress tolerance of plants. *JIRCAS Working Report*, 23(1): 25–33.
- Zekri M. and Parsons L.R. 1990.** Calcium influences growth and leaf mineral concentration of *Citrus* under saline conditions. *Horticulture Science*, 25(7): 784–786.



Research Paper

Increased tolerance of Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) seedlings to salinity stress when inoculated with endophytes *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* extracted from seaweed

Leila Baghazadeh Daryaii¹, Davood Samsampour^{2*}, Abdoolnabi Bagheri³, Jelveh Sohrabipour⁴

Received: November 2021

Accepted: February 2022

Abstract

Endophytes play an important role in protecting plants. In this study, endophytic combination of *Aspergillus niger* and *Bacillus aquimaris* OD14 was used to improve tolerance of Mexican lime seedlings to salinity stress. Three months after inoculation, salinity stress of 0, 2000, 4000 and 6000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ was applied. After 8 weeks, morphological, biochemical and elements absorption traits of seedlings were evaluated. The results showed that in 6000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ water salinity, endophytic compound increased stem length (103.64%), trunk diameter (103.04%), number of leaves (444.41%) and root length and width (232.02% and 41.63% respectively). Endophyte increased 76.29% of total chlorophyll content compared to control. Also, the uptake of root potassium (34.95%) and shoot calcium (115.15%) increased and the uptake of sodium elements was decreased (29.49%) compared to control. Endophytic combination could significantly reduce ion leakage (65.57%) and increase proline content (69.3%) in inoculated seedlings compared to control. In general, marine endophytes can be used as a suitable option to increase plant tolerance to salinity.

Key words: *Fungal Endophyte, Bacterial Endophyte, Salinity Stress, Element Uptake, Proline.*

1- Ph.D. in Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products, Hormozgan University, Bandar Abbas, Iran.

2- Associate Professor in Horticultural Science Department, Agriculture and Natural Resources College, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

3- Assistant Professor in Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

4- Assistant Professor in Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Abbas, Iran.

*Corresponding Author: Samsampoor@hormozgan.ac.ir